

Таким образом, L-аргинин, АГ и NaHS как изолированно, так и сочетано уменьшают нарушения прооксидантно-антиоксидантного баланса, вызванные действием ЛПС. Введение же РАГ как самостоятельно, так и в комбинации с L-аргином характеризуется противоположным эффектом – снижает АОЗ и усиливает свободнорадикальное окисление. Газотрансмиттеры NO и H<sub>2</sub>S оказывают влияние на кислородсвязывающие свойства крови, в частности повышают СГК. Модификация кислородсвязывающих свойств крови, осуществляемая через различные механизмы при участии NO и H<sub>2</sub>S, имеет значение для кислородного обеспечения организма и механизмов формирования прооксидантно-антиоксидантного состояния при введении ЛПС.

#### **Библиографический список**

1. T. Tofas, D. Draganidis, Ch.K. Deli, K. Georgakouli, I.G. Fatouros, A.Z. Jamurtas. Exercise-Induced Regulation of Redox Status in Cardiovascular Diseases: The Role of Exercise Training and Detraining // *Antioxidants* (Basel). 2020. Vol. 9, № 1.
2. M. Védrine, C. Berthault, C. Leroux, M. Répérant-Ferter, Ch. Gitton, S. Barbey, P. Rainard, F. B. Gilbert, P. Germon. Sensing of Escherichia coli and LPS by mammary epithelial cells is modulated by O-antigen chain and CD14 // *PLoS One*. 2018. Vol. 13, № 8.
3. M. Zhang, R. Qiao, J. Hu. Engineering metal-organic frameworks (MOFs) for controlled delivery of physiological gaseous transmitters // *Nanomaterials* (Basel). 2020. Vol. 10, № 6.
4. K. R. Olson. Hydrogen sulfide as an oxygen sensor // *Antioxidants and redox signaling*. 2015. Vol. 22, № 2. P. 377-397.

УДК 616.36-008.6-002-092:612.014.464

*М.Н. Ходосовский, В.В. Зинчук*

#### **УЧАСТИЕ ЭРИТРОПОЭТИНА В КОРРЕКЦИИ NO-СИНТАЗНОЙ ФУНКЦИИ ПРИ ИШЕМИИ-РЕПЕРФУЗИИ ПЕЧЕНИ**

**Аннотация.** Изучен механизм защитного действия эритропоэтина при ишемии-реперфузии печени. Установлено,

что однократное введение эритропоэтина перед ишемией печени существенно снижает уровень продуктов перекисного окисления липидов, улучшает показатели антиоксидантной защиты и увеличивает суммарное содержание нитрат/нитритов в крови в конце реперфузионного периода. Ингибирование эндогенного синтеза монооксида азота с помощью L-NAME снижает защитный эффект эритропоэтина.

**Ключевые слова:** монооксид азота, эритропоэтин, реперфузия, печень, крысы.

*M.N. Khodosovsky, V.V. Zinchuk*

#### **THE INVOLVEMENT OF ERYTHROPOIETIN IN IMPROVEMENT OF NO-SYNTASE FUNCTION DURING HEPATIC ISCHEMIA-REPERFUSION**

**Abstract.** The mechanism of the protective action of erythropoietin in liver ischemia-reperfusion was studied. It has been established that a single administration of erythropoietin before liver ischemia significantly reduces the level of lipid peroxidation products, improves antioxidant protection and increases the total content of nitrate / nitrite in the blood at the end of the reperfusion period. Inhibition of endogenous nitrogen monoxide synthesis by L-NAME reduces the protective effect of erythropoietin.

**Keywords:** nitric oxide, erythropoietin, reperfusion, liver, rats.

#### **Введение**

В последние годы интенсивно разрабатываются новые способы preconditionирования, которые базируются на способности некоторых соединений запускать схожие с ишемическим preconditionированием механизмы адаптации к ишемии и последующей за ней реперфузии. Одним из таких соединений считают эритропоэтин (ЭПО). Известно, что гипоксия/ишемия – основной фактор повышения синтеза ЭПО в организме. Долгое время данный гликопротеин считали ответственным за механизмы долговременной адаптации к условиям гипоксии. В последние годы показано, что ЭПО обладает защитным эффектом при краткосрочном использовании на разных моделях ишемии/гипоксии органов [1, 2]. Выяснено, что рецепторы к ЭПО имеются в нервных

клетках, кардиомиоцитах, эпителии лёгких, эндотелии сосудов и др. [1]. Более того, некоторые из тканей способны синтезировать данный гликопротеин. Цитопротективный эффект краткосрочного использования ЭПО связывают со способностью этого гликопротеина ингибировать механизмы апоптоза, подавлять экспрессию провоспалительных цитокинов, активность процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ), улучшать функцию эндотелия и микроциркуляцию в тканях [3, 4].

Цель исследования – выяснить вклад монооксида азота в механизм защитного действия эритропоэтина при ишемии-реперфузии печени (ИРП) у крыс.

#### Методика

Опыты выполнены на 34 взрослых белых крысах-самцах, массой 280-360 г, выдержанных в стандартных условиях вивария. Под комбинированным наркозом (тиопентал натрия – 30 мг/кг, в/б, калипсол – 100 мг/кг, в/м) ишемию печени вызывали наложением сосудистого зажима на *a. hepatica propria* и *v. portae* (маневр Прингла) в течение 30 минут, реперфузионный период длился 120 минут. В конце эксперимента осуществляли забор смешанной венозной крови из правого предсердия и тканей печени для оценки параметров прооксидантно-антиоксидантного и функционального состояния печени. Все оперативные вмешательства осуществляли в условиях адекватной анальгезии в соответствии с нормами, принятыми этической комиссией по гуманному обращению с животными Гродненского государственного медицинского университета.

Животных разделили на 4 группы: 1 группа (n=9) – контрольная; во 2 группе (n=8) моделировали ИРП; в 3 группе (n=9) за 30 мин перед ИРП крысам вводили рекомбинантный человеческий эритропоэтин альфа (ЭПО, INTAS, 1000 МЕ/кг), в 4-й группе (n=8) введение ЭПО комбинировали с неселективным ингибитором NO-синтазы – метиловым эфиром N<sub>ω</sub>-нитро-L-аргинина (L-NAME, Sigma, 10 мг/кг, за 60 мин до ИРП). Изменение уровня монооксида азота нами оценивалось по суммарному содержанию нитрат/нитритов (NOx) в плазме крови спектрофотометрическим методом с использованием реактива Грисса.

Для восстановления нитратов в нитриты применяли металлический кадмий.

Изучали следующие показатели прооксидантно-антиоксидантного состояния: диеновые конъюгаты (ДК), малоновый диальдегид (МДА), основания Шиффа (ОШ), восстановленный глутатион (GSH),  $\alpha$ -токоферол, ретинол и активность каталазы. Содержание ДК в биологическом материале определяли методом ультрафиолетовой спектрофотометрии при длине волны 233 нм, типичной для конъюгированных диеновых структур гидроперекисей липидов. Уровень МДА (ТБК-активных продуктов) оценивали по взаимодействию с 2'-тиобарбитуровой кислотой (ТБК), которая при нагревании в кислой среде приводит к образованию триметинового комплекса розового цвета. Содержание ОШ определяли по интенсивности флюоресценции хлороформного экстракта при длинах волн возбуждения и эмиссии 344 нм и 440 нм, соответственно. Концентрацию  $\alpha$ -токоферола и ретинола изучали методом флуориметрического определения по интенсивности флюоресценции гексанового экстракта. В качестве стандарта использовались  $\alpha$ -токоферол и ретинол фирмы "Sigma". Содержание GSH в биологическом материале определяли по методу, в основе которого лежит реакция взаимодействия SH-групп глутатиона с 5,5'-дителиобис(2-нитробензойной кислотой), способной поглощать свет при длине волны 412 нм. Каталазная активность в биологическом материале оценивалась спектрофотометрическим методом, основанном на способности перекиси водорода образовывать с солями молибдена стойко окрашенный комплекс.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием t-критерия Стьюдента, критериев Вилкоксона или Манна-Уитни, в зависимости от нормальности распределения выборок. Достоверными считали различия при  $p < 0,05$ .

### **Результаты и их обсуждение**

Установлено, что у крыс 2 группы ИРП приводила к росту ДК и ОШ в плазме смешанной венозной крови в конце экспериментов по отношению к контролю в 4,2 ( $p < 0,001$ ) и в 8,7 ( $p < 0,001$ ) раза, соответственно. При этом у животных 2 группы

понижалась концентрация  $\alpha$ -токоферола и ретинола на 14,4% ( $p < 0,001$ ) и 30,4% ( $p < 0,001$ ), соответственно. Активность каталазы эритроцитов в конце реперфузионного периода у крыс 2 группы снижалась на 57,5% ( $p < 0,001$ ). Схожие изменения исследуемых параметров прооксидантно-антиоксидантного баланса имелись в печени в конце реперфузионного периода. Следует отметить, что у животных 2 экспериментальной группы наблюдалось понижение суммарного содержания NOx в крови на 49,6% ( $p < 0,05$ ) по отношению к контрольным крысам 1 группы.

В группе животных, получавших с ЭПО (3 группа) наблюдалось улучшение большинства исследуемых параметров. Так, уровень ДК и ОШ в эритроцитах по отношению к животным, которым препарат не вводили, снижался на 62,9% ( $p < 0,001$ ) и 39,2% ( $p < 0,001$ ) соответственно. Содержание ДК и ОШ в печени в конце реперфузии по отношению к крысам, у которых моделировали только ИРП, падало на 78,0% ( $p < 0,001$ ) и 73,9% ( $p < 0,001$ ) соответственно. Одновременно улучшались изучаемые параметры антиоксидантной системы в крови и тканях печени у крыс, получавших ЭПО, по отношению к животным 2 группы. Так, в печени в конце реперфузии уровни  $\alpha$ -токоферола, ретинола и активность каталазы у животных 3 группы не отличались от контрольных, а содержание GSH эритроцитов повышалось на 20,7% ( $p < 0,05$ ) по отношению к контролю. Следует отметить, что у животных 3 группы наблюдалось повышение суммарного содержания NOx в крови по отношению к крысам 1 и 2 опытных групп. Результаты исследования указывают, что введение крысам ЭПО способствует улучшению прооксидантно-антиоксидантного баланса и NO-синтазной функции при ИРП.

Применение ЭПО в условиях ингибирования синтеза NO с помощью L-NAME (4 группа) ухудшало параметры прооксидантно-антиоксидантного состояния крови и печени после ишемии. Так, уровень ДК и ОШ в плазме крови в конце реперфузионного периода у животных, получавших ЭПО в комбинации с L-NAME, по отношению к группе, в которой при ИРП вводили только ЭПО, повышался на 43,6% ( $p < 0,05$ ) и 36,7% ( $p < 0,01$ ), соответственно. Содержание  $\alpha$ -токоферола и ретинола в плазме крови на 120 минуте реперфузии у крыс, получавших ЭПО вместе с L-NAME, по отношению к группе, в которой при ИРП про-

водили инфузию только ЭПО, снижалось на 4,9% ( $p < 0,05$ ) и 17,0% ( $p < 0,01$ ), соответственно.

В условиях ингибирования NO-синтазной функции у крыс, получавших ЭПО при ИРП, понижалась также активность каталазы эритроцитов в смешанной венозной крови на 53,6% ( $p < 0,001$ ). Схожая динамика изменения показателей прооксидантно-антиоксидантного состояния имела в печени экспериментальных животных. Показано, что суммарное содержание нитрат/нитритов смешанной венозной крови у крыс при комбинированном использовании ЭПО и L-NAME понижалось на 63,7% ( $p < 0,001$ ) по отношению к животным, у которых ИРП моделировали только с ЭПО.

Вместе с тем следует отметить, что протективный эффект ЭПО при ИРП в условиях ингибирования NO-синтазной функции полностью не блокировался. Так, уровень ДК и ОШ у животных, получавших ЭПО в комбинации с L-NAME, в конце реперфузии в плазме крови был ниже, чем у крыс при моделировании только ИРП, на 32,2% ( $p < 0,01$ ) и 40,9% ( $p < 0,001$ ), соответственно. Содержание  $\alpha$ -токоферола и ретинола в плазме крови на 120 минуте реперфузии у крыс, получавших ЭПО вместе с L-NAME, по отношению к группе, в которой выполняли только ИРП, было выше на 6,9% ( $p < 0,05$ ) и 10,5% ( $p < 0,01$ ), соответственно.

Таким образом, протективный эффект ЭПО при ИРП на показатели прооксидантно-антиоксидантного состояния в условиях ингибирования NO-синтазной функции снижается. Данный факт свидетельствует об участии газотрансмиттера NO в механизме защитного действия ЭПО при ИРП. Однако, учитывая, что протективный эффект ЭПО при ИРП в условиях ингибирования NO-синтазной функции полностью не блокируется, можно предположить наличие других механизмов влияния данного гликопротеина, способствующих коррекции окислительных повреждений при ишемии-реперфузии печени.

#### **Библиографический список**

1. Захаров, Ю. М. Неэритропоэтические функции эритропоэтина / Ю. М. Захаров // Росс. физиол. журнал им. И. М. Сеченова. 2007. Т.93, № 6. С. 592- 608.

2. Ходосовский, М. Н. Влияние эритропоэтина на кислородтранспортную функцию крови и прооксидантно-антиоксидантное состояние при ишемии-реперфузии печени / М. Н. Ходосовский, В. В. Зинчук // Росс. физиол. журнал им. И.М. Сеченова. 2014. Т. 100, № 5. С. 592-601.

3. Liu, Q. S. Erythropoietin pretreatment exerts anti-inflammatory effects in hepatic ischemia/reperfusion-injured rats via suppression of the TLR2/NF- $\kappa$ B pathway / Q. S. Liu [et al.] // Transplant. Proc. 2015. Vol. 47, № 2. P. 283-289.

4. Meng, H. Erythropoietin activates Keap1-Nrf2/ARE pathway in rat brain after ischemia / Meng H. [et al.] // Int. J. Neurosci. 2014. Vol. 124, № 5. P. 362-368.

УДК. 612.1;591.11;577.353

*Е.Л. Волкова, А.В. Муравьев, Н.В. Кислов, В.Л. Комлев*

#### СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ РАЗНЫХ СИГНАЛЬНЫХ КАСКАДОВ НА МОДЕЛИ МИКРОРЕОЛОГИЧЕСКИХ ОТВЕТОВ ЭРИТРОЦИТОВ

**Аннотация.** Целью настоящего исследования было изучение влияния активации/ингибирования элементов внутриклеточных сигнальных путей эритроцитов на эластичность их мембран и деформируемость клеток в целом. В опытах *in vitro* было продемонстрировано, что инкубация человеческих эритроцитов с препаратами, обладающими тирозинкиназной активностью, приводит к изменению эластичности мембран и деформируемости клеток в целом. При этом препараты-стимуляторы активности тирозинкиназ (ТПК) достоверно, на 12-19% ( $p < 0.05$ ) повышали деформируемость эритроцитов (ДЭ), тогда как ингибитор ТПК сунитиниб не повлиял достоверно на ДЭ.

Анализ роли звеньев аденилатциклазного сигнального каскада в изменениях эластичности мембран эритроцитов, свидетельствовал об их участие в ответе эритроцитов на стимулирование/ингибирование элементов этого сигнального пути, включая мембранные рецепторы, аденилатциклазу, цАМФ и