

Министерство здравоохранения Республики Беларусь

УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ
«ГРОДНЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ»

Кафедра патологической физиологии им. Д. А. Маслакова

М. Н. ХОДОСОВСКИЙ

**УЧАСТИЕ ГАЗОТРАНСМИТТЕРОВ В КОРРЕКЦИИ
РЕПЕРФУЗИОННЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ ПЕЧЕНИ**

Монография

Гродно
ГрГМУ
2017

УДК 612.127.2:616.36-005.4-005.2
ББК 28.707.2+54.135.1
Х 69

Рекомендовано Редакционно-издательским советом ГрГМУ
(протокол № 9 от 9 июня 2017 г.).

Автор: доц. каф. патологической физиологии им. Д. А. Маслакова,
канд. мед. наук, М. Н. Ходосовский.

Рецензенты: д-р мед. наук, проф. каф. фармакологии и физиологии
УО «ГрГАУ» М. Г. Величко;
зав. каф. фармакологии УО «ГрГМУ», д-р биол. наук
В. И. Козловский.

Ходосовский, М. Н.

Участие газотрансммиттеров в коррекции реперфузионных
Х69 повреждений печени : монография / М. Н. Ходосовский. – Гродно :
ГрГМУ, 2017. – 212 с.
ISBN 978-985-558-883-3.

В монографии рассматривается одна из актуальных проблем современной патофизиологии – коррекция механизмов транспорта кислорода и окислительных повреждений при синдроме ишемии-реперфузии печени. Представлены данные о влиянии донаторов оксида азота, сероводорода и монооксида азота на механизмы транспорта кислорода и окислительные повреждения при моделировании синдрома ишемии-реперфузии печени у экспериментальных животных. Издание будет полезно хирургам, гепатологам, трансплантологам, научным сотрудникам.

Никакая часть этой книги не может быть воспроизведена в любой форме или любыми средствами, электронными или механическими, включая фотографирование, магнитную запись или иные средства копирования или сохранения информации без письменного согласия автора.

УДК 612.127.2:616.36-005.4-005.2
ББК 28.707.2+54.135.1

ISBN 978-985-558-883-3

© Ходосовский М. Н., 2017
© ГрГМУ, 2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	6
ВВЕДЕНИЕ	7
Глава 1	
МЕХАНИЗМЫ РЕПЕРФУЗИОННЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ ПЕЧЕНИ И СПОСОБЫ ИХ КОРРЕКЦИИ	11
1.1. Механизмы реперфузионных повреждений печени	12
1.2. Основные подходы к коррекции постишемических повреждений печени	25
1.3. Роль газотрансммиттеров в развитии окислительных повреждений	31
Глава 2	
ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ДОНАТОРОВ ОКСИДА АЗОТА ДЛЯ КОРРЕКЦИИ ПОСТИШЕМИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ В ПЕЧЕНИ	46
2.1 Влияние нитроглицерина на параметры кислородтранспортной функции крови и прооксидантно- антиоксидантного баланса при ишемии-реперфузии печени у кроликов	48
2.2. Влияние нитропруссиды натрия на параметры кислородтранспортной функции крови и прооксидантно- антиоксидантного баланса при ишемии-реперфузии печени у кроликов	59
Глава 3	
ВЛИЯНИЕ ДОНАТОРОВ МОНООКСИДА УГЛЕРОДА И СЕРОВОДОРОДА НА КИСЛОРОДЗАВИСИМЫЕ ПРОЦЕССЫ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ СИНДРОМА ИШЕМИИ-РЕПЕРФУЗИИ ПЕЧЕНИ У КРЫС	70
3.1 Изменение параметров кислородтранспортной функции крови, прооксидантно-антиоксидантного состояния и морфофункционального состояния печени при ишемии- реперфузии в условиях введения донатора монооксида углерода	72

3.2 Коррекция механизмов транспорта кислорода и окислительных повреждений печени при ишемии-реперфузии с помощью донатора сероводорода	83
--	----

Глава 4

РОЛЬ ГАЗОТРАНСМИТТЕРОВ В ЗАЩИТНОМ ЭФФЕКТЕ N ₁ -МЕТИЛНИКОТИНАМИДА ПРИ ИШЕМИИ-РЕПЕРФУЗИИ ПЕЧЕНИ	94
--	----

4.1 Влияние N ₁ -метилникотинамида на кислородсвязывающие свойства крови, кислотно-основное и прооксидантно-антиоксидантное состояние при ишемии-реперфузии печени	94
---	----

4.2 Роль газотрансммиттеров в механизме протективного влияния 1-метилникотинамида на печень при синдроме ишемии-реперфузии	102
--	-----

Глава 5

КОРРЕКЦИЯ РЕПЕРФУЗИОННЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ ПЕЧЕНИ МЕЛАТОНИНОМ И ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМА ЕГО ПРОТЕКТИВНОГО ДЕЙСТВИЯ	112
---	-----

5.1 Влияние разных доз мелатонина на активность свободно-радикальных процессов и систему транспорта кислорода при ишемии-реперфузии печени	112
--	-----

5.2 Роль монооксид азота в механизме протективного действия мелатонина при реперфузии печени	115
--	-----

Глава 6

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМА ПРОТЕКТИВНОГО ДЕЙСТВИЯ ЭРИТРОПОЭТИНА ПРИ ИШЕМИИ-РЕПЕРФУЗИИ ПЕЧЕНИ	122
--	-----

6.1 Влияние разных доз эритропоэтина на параметры кислородтранспортной функции крови и прооксидантно-антиоксидантный баланс при синдроме ишемии-реперфузии печени	123
---	-----

6.2 Вклад сероводорода в механизм протективного действия эритропоэтина при ишемии-реперфузии печени ..	134
--	-----

Глава 7

ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМА ЗАЩИТНОГО ДЕЙСТВИЯ ГИПОКСИЧЕСКОГО ПРЕКОНДИЦИОНИРОВАНИЯ НА ПЕЧЕНЬ ПРИ СИНДРОМЕ ИШЕМИИ-РЕПЕРФУЗИИ	144
7.1 Влияние гипоксического preconditionирования на параметры кислородтранспортной функции крови и окислительные повреждения при ишемии-реперфузии печени у кроликов	145
7.2 Вклад монооксида углерода в протективный эффект гипоксического preconditionирования при синдроме ишемии-реперфузии печени	153
Заключение	160
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	168
ПРИЛОЖЕНИЯ	195

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АлАТ	аланин-аминотрансфераза
АсАТ	аспартат-аминотрансфераза
АФК	активные формы кислорода
ГИФ	гипоксией индуцируемый фактор
ГП	гипоксическое preconditioning
ДК	диеновые конъюгаты
ИРП	ишемия-реперфузия печени
ИЛ	интерлейкин
КДО	кривая диссоциации оксигемоглобина
КО	ксантиноксидаза
КТФ	кислородтранспортная функция крови
МДА	малоновый диальдегид
1-МНА	N ₁ -метилникотинамид
ОШ	основания Шиффа
ПАГ	Dl-пропаргилглицин
ПОЛ	перекисное окисление липидов
СГК	сродство гемоглобина к кислороду
ЭПО	эритропоэтин
ABE	реальный избыток оснований (actual base excess)
СО	монооксид углерода
CORM-3	трикарбонил хлорорутениума (II) глицинат
GSH	восстановленный глутатион
HbCO	карбоксигемоглобин
H ₂ S	сероводород
HCO ₃ ⁻	бикарбонат плазмы
NaHS	гидросульфид натрия
NO	монооксид азота
NOx	суммарное содержание нитритов/нитратов
MetHb	метгемоглобин
pO ₂	парциальное напряжение кислорода крови
p50	pO ₂ крови при 50% насыщении гемоглобина кислородом
pCO ₂	парциальное напряжение углекислого газа крови
SBC	стандартный бикарбонат плазмы (standard bicarbonate)
SBE	стандартный избыток оснований (standard base excess)
TCO ₂	общий CO ₂ плазмы (total CO ₂)
TNF-α	фактор некроза опухолей альфа

ВВЕДЕНИЕ

Восстановление кровотока в ишемизированной ткани рассматривается как сложный комплекс адаптивных и патологических реакций, результатом взаимодействия которых может быть как восстановление функции органа, так и тяжелые ее нарушения, вплоть до гибели отдельных клеточных элементов или органа в целом (синдром ишемии-реперфузии) [Guan L. Y. et al., 2014]. Синдром ишемии-реперфузии печени (ИРП) является ключевым патофизиологическим механизмом дисфункции органа после трансплантации, резекций, а также геморрагического шока с последующим восстановлением потерянной крови. С каждым годом в Беларуси увеличивается количество выполненных трансплантаций органов. Так, за 2008 г. было сделано всего 8 трансплантаций (почки), тогда как в 2015 г. наши врачи провели 445 операций по пересадке органов: 333 из них – почки, 72 – печени, 33 – сердца, пять – поджелудочной железы и две – легких [Костюкевич Н., 2016]. Трансплантация печени является «золотым стандартом» в лечении пациентов с разными заболеваниями органа в терминальной стадии [Руммо О. О., 2015]. Вместе с тем ранняя дисфункция трансплантата является частым осложнением данной операции и составляет, по данным ряда авторов, от 9,6 до 31,9% случаев, причем первичное нефункционирование трансплантированной печени наблюдается с частотой от 0,9 до 7,2%, последнее в 50% случаев приводит к госпитальной смертности реципиентов [Руммо О. О., 2015; Bolondi G. et al., 2016].

В механизмах реперфузионных повреждений печени участвуют окислительный стресс, воспаление, апоптоз, нарушения микроциркуляции и механизмов транспорта кислорода [Зинчук В. В., Ходосовский М. Н., 2006; Jaeschke H., Woolbright B. L., 2012]. Важной причиной развития реперфузионных повреждений считается усиление процессов радикалообразования, нарушение баланса между генерацией активных форм кислорода (АФК) и факторами антиоксидантной защиты, т.е. окислительный стресс. Возникающий в процессе ишемии и последующей реперфузии дисбаланс между потребностью ткани в кислороде и его доставкой создаёт условия для усиленного образования свободных радикалов и активации процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ), ведущих в конечном счёте к повреждению клеточных и

субклеточных мембранных структур [Li J. et al., 2015]. Кислород-связывающие свойства крови могут существенно влиять на развитие данного дисбаланса при ишемии-реперфузии печени, причем снижение сродства гемоглобина к кислороду усиливает его, тогда как увеличение – ослабляет [Зинчук В. В., Ходосовский М. Н., 2006]. Вместе с тем восстановление кислородного снабжения в ишемизированных тканях является абсолютно необходимым условием восстановления их функции. Хотя в настоящее время имеется достаточно большой спектр методов коррекции, синдром ишемии-реперфузии печени остается проблемой медицинской науки. Ни один из методов или их комбинаций не обеспечивает гарантированной защиты от реперфузионного повреждения с последующей дисфункцией органа и гибелью пациента [Guan L.Y. et al., 2014]. Очевидно, механизмы данного синдрома до конца не выяснены и нуждаются в дальнейшем исследовании. Поэтому внимание большинства ученых в данной области исследований (Европа, США, Канада, Япония, Китай и др.) сосредоточилось на поиске методов и средств коррекции постишемических повреждений органа.

Открытие в последние годы биологических эффектов сероводорода (H_2S) и монооксида углерода (CO) послужило толчком для исследования многих физиологических и патологических процессов с позиций новой концепции механизма межклеточной сигнализации, включавшей до этого классическую активацию через рецепторы или ионные каналы мембран [Moody B. F., Calvert J. W., 2011]. Термин «газотрансмиттер» был введен для характеристики газов, которые действуют как высвобождаемые нейронами трансммиттеры. Монооксид азота (NO), CO и H_2S объединены под понятием «газотрансмиттеры». Все они являются небольшими молекулами газов, свободно проходят через мембраны клеток и не взаимодействуют со специфическими мембранными рецепторами, синтезируются эндогенно с помощью ферментов и их синтез может регулироваться организмом, имеют определенные специфические функции при физиологических концентрациях и их эффекты имеют свое специфическое клеточное и молекулярное предназначение. В настоящее время роль NO при синдроме ишемии-реперфузии печени является недостаточно ясной. С одной стороны, как вазодилататор, монооксид азота может улучшать процессы микроциркуляции, снижать миграцию лейкоцитов

и вызываемые ими повреждения органа при реперфузии [Guan L.Y. et al., 2014]. С другой же, как свободнорадикальная молекула, NO способен потенцировать окислительный стресс, образовывать мощные окислители (пероксинитрит), что может усугублять развитие реперфузионных повреждений [Hines I. N. et al., 2011; Gao L. et al., 2016]. Не в полной мере изученными остаются эффекты донаторов оксида азота на системные механизмы транспорта кислорода при ИРП, хотя известно, что NO и гемоглобин способны образовывать разные формы (нитрозогемоглобин, нитрозилгемоглобин, метгемоглобин), каждая из которых обладает модифицирующими эффектами на сродство к кислороду [Зинчук В. В., Глуткина Н. В., 2013]. Учитывая важную патогенетическую роль последнего при ИРП [Зинчук В. В., Ходосовский М. Н., 2006], представляется необходимым изучить влияние донаторов NO на параметры кислородтранспортной функции (КТФ) крови, прооксидантно-антиоксидантного состояния печени при ишемии-реперфузии, что позволит выявить новые свойства данного газотрансмиттера.

Вторым соединением, отнесенным к газотрансмиттерам, является монооксид углерода – CO (угарный газ), который долгое время считался исключительно токсическим веществом. Однако в 60-х годах 20 века было показано, что CO образуется в организме в результате распада гемоглобина под воздействием фермента гем-оксигеназы. Вплоть до 90-х годов CO считался побочным продуктом метаболизма, однако затем были установлены его нейротрансмиттерные свойства, способность вызывать вазодилатацию, уменьшать агрегацию тромбоцитов, что послужило основанием для отнесения данного соединения к классу газотрансмиттеров. В настоящее время установлено, что введение донаторов CO при гипотермическом хранении трансплантатов печени улучшает их жизнеспособность после пересадки органа у крыс [Lee L.Y. et al., 2011]. Показано также, что донаторы CO при ИРП снижают активность каспаз, провоспалительных цитокинов и экспрессию молекул межклеточной адгезии на эндотелиальных клетках, что может уменьшать степень тяжести реперфузионных повреждений органа [Wei Y. et al., 2010]. В целом последние исследования показали определенный цитопротективный эффект небольших концентраций экзогенного CO. Однако большинство исследователей сосредоточили свое внимание на внутриклеточ-

ных процессах данного эффекта, не учитывая системных механизмов, в первую очередь высокий аффинитет CO к гемоглобину. Известно, что 80% эндогенного CO транспортируется в крови именно в связи с гемоглобином, что может существенно влиять на кислородсвязывающие свойства, состояние которых определяет условия доставки кислорода тканям и их метаболизм.

Третьей молекулой, отнесенной к классу газотрансмиттеров, является сероводород [Wang R., 2003]. Установлено, что H₂S синтезируется практически во всех тканях, а наибольшие его концентрации обнаруживаются в мозге, сердце, сосудах, печени и почках. В печени H₂S синтезируется из L-цистеина под влиянием фермента цистатионин-γ-лиазы. Как и CO, H₂S обладает нейротрансмиттерными свойствами, способностью к вазодилатации, уменьшает агрегацию тромбоцитов. Кроме того, H₂S легко вступает в реакцию с активными формами кислорода и азота, восстанавливает активность ферментов благодаря сульфгидратации, влияет на клеточную пролиферацию, ангиогенез [Wang R., 2003; Улащик В.С., 2012]. Установлено, что при ишемии-реперфузии печени H₂S повышает активность внутриклеточных антиоксидантов, индуцирует продукцию белков теплового шока (HSP-90), подавляет апоптоз, провоспалительные факторы, что способствует уменьшению реперфузионных повреждений органа [Jha S. et al., 2008]. Вместе с тем известно, что, взаимодействуя с гемоглобином, H₂S образует сульфгемоглобин, который может изменять положение кривой диссоциации гемоглобина. Однако состояние КТФ крови, как и в случае с CO, осталось неизученным. Поскольку газотрансмиттеры образуются в результате метаболизма, представляется важным изучить их роль в механизмах защитного действия других метаболитов, таких как мелатонин и эритропоэтин при ИРП во взаимосвязи с изменением КТФ крови.

Таким образом, комплексное изучение влияния донаторов NO, CO и H₂S на параметры кислородтранспортной функции крови, прооксидантно-антиоксидантного состояния печени при ишемии-реперфузии позволит выявить новые свойства данных соединений.

Глава 1

МЕХАНИЗМЫ РЕПЕРФУЗИОННЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ ПЕЧЕНИ И СПОСОБЫ ИХ КОРРЕКЦИИ

В последние годы резекция печени и ее трансплантация широко применяется в клинической практике для лечения печеночной патологии. Вместе с тем постишемические/реперфузионные расстройства остаются главной причиной первичного нефункционирования трансплантированной печени или печеночной недостаточности после резекций [Guan L.Y. et al., 2014; Bolondi G. et al., 2016]. Данные повреждения снижают возможности использования донорской печени и применения обширных резекций органа. Реперфузионные повреждения печени могут быть разделены на «тепловые» и «холодовые». Тепловые повреждения развиваются при нормальной температуре тела и наблюдаются после продолжительных операций по поводу резекции части печени с использованием методов общей сосудистой окклюзии (маневр Прингла, *Pringle maneuver* и др.). Кроме того, тепловые реперфузионные повреждения могут возникать в печени после шоковых состояний, инфаркта миокарда, острой дыхательной недостаточности, кровопотери, травматических повреждений и сепсиса [Weigand K. et al., 2012]. Данные повреждения не имеют стадийности, в отличие от холодовых, сопровождаются одновременным запуском всего комплекса патологических реакций, приводящих к дисфункции органа. Холодовые повреждения при ИРП возникают при трансплантации органа, если используют метод «холодового» хранения печени. В последнем случае реперфузионные повреждения тканей печени имеют раннюю (до 6 ч) и позднюю стадии. Ранняя стадия повреждений является следствием стремительного изменения условий кислородного снабжения и развития окислительного стресса, тогда как поздняя – продукцией цитокинов и хемокинов с последующей инфильтрацией паренхимы печени лейкоцитами [Jaeschke H., Woolbright B. L., 2012; Guan L.Y. et al., 2014]. Несмотря на это, тепловые и холодовые реперфузионные повреждения печени имеют много общего и являются комплексом схожих патофизиологических процессов. Клинически реперфузионные повреждения печени проявляются повышением активности печеночных ферментов в крови – аланин аминотрансферазы (АлАТ), аспартат аминотрансферазы (АсАТ) и др.,

общего билирубина, билиарными стриктурами в органе, воспалением, некрозом, апоптозом и тяжелой недостаточностью органа [Weigand K. et al., 2012; Jaeschke H., Woolbright B. L., 2012].

В настоящее время восстановление кровотока в ишемизированной печени рассматривается как сложный комплекс адаптивных и патологических реакций, результатом взаимодействия которых могут быть как восстановление функции органа, так и тяжелые ее нарушения, вплоть до гибели клеточных элементов путем некроза или апоптоза. Множество молекулярных путей и клеточных механизмов, таких как анаэробный метаболизм, редокс-состояние, ионный дисбаланс, повреждение митохондрий, дисфункция эндотелия, активация клеток Купфера, нейтрофилов, лимфоцитов, цитокины и хемокины, протеинкиназы вовлекаются и тесно взаимодействуют друг с другом при синдроме ИРП [Guan L.Y. et al., 2014]. Неудивительно, что, несмотря на широкое изучение данной проблемы в мире, универсальные методы коррекции реперфузионных повреждений печени практически отсутствуют. Разработка новых эффективных методов предупреждения и коррекции реперфузионных повреждений печени остается актуальной проблемой современной медицины. Только глубокое и всестороннее понимание механизмов повреждений при ИРП, использование новых принципов воздействия на системные механизмы, регулирующие кислородзависимые процессы в острый постишемический период, могут стать основой для решения данной проблемы.

1.1. Механизмы реперфузионных повреждений печени

Ишемия. Ишемия печени является следствием окклюзии афферентных сосудов с целью уменьшения кровопотери при выполнении резекций и трансплантации органа [Suyavaran A., Thirunavukkarasu C., 2017]. Снижение кровотока через печень и ее ишемия могут наблюдаться при шоковых состояниях, когда артериальное давление длительное время находится на низком уровне [Allan P. F. et al., 2011]. Повреждения, вызываемые ишемией, обычно связывают с гипоксией и энергодефицитом, которые могут привести к некрозу [Knudsen A. R. et al., 2016]. Некроз – это вид незапрограммированной клеточной гибели в ответ на повреждение цитоплазматической мембраны, при которой клетки

подвергаются отеку и разрушению, что ведет к очаговой деструкции тканей и значительной воспалительной реакции [Guicciardi, M. E. et al., 2013]. Некротические изменения в органе наступают при продолжительности ишемии, превышающей критический период. Печень, как орган с высокой метаболической активностью, является крайне чувствительной к дефициту O_2 . Постишемические расстройства в печени определяются уже после 20 минут её ишемии [Martens J. C. et al., 2015]. Вместе с тем, обладая высокой способностью к адаптации за счет бескислородных путей метаболизма, критический период ишемии для этого органа составляет около 60-65 минут [van Riel W. G. et al., 2016]. Более того, авторами показано, что орган с исходно неповрежденными гепатоцитами может успешно выдерживать ишемию продолжительностью до 90 минут, тогда как наличие патологии в печени сокращает период обратимости нарушений до 50 минут.

Установлено, что моделирование у экспериментальных животных 60-минутной ишемии печени приводит к некрозу гепатоцитов, который высоко коррелирует с активностью аланинаминотрансферазы (АлАТ) в крови, – известного маркера повреждений при ИРП [Esposti D. D. et al., 2010; Knudsen A. R. et al., 2016; Olt-hof P. B. et al., 2017]. Дефицит кислорода приводит к компенсаторному переходу тканей на анаэробный гликолиз, энергетическая эффективность которого составляет около 5,6% от аэробного. Продуктами анаэробного гликолиза являются молочная и пирувиноградная кислоты, что приводит к развитию метаболического ацидоза в клетках [Guan L. Y. et al., 2014]. Ишемия такого крупного органа, как печень, приводит к накоплению большого количества недоокисленных продуктов (в т.ч. и кетоновых тел), что вызывает общий метаболический ацидоз в организме после ишемии [Kim J. S. et al., 2012]. В свою очередь избыток ионов водорода может ингибировать ферменты гликолиза, что формирует порочный круг энергодефицита при ишемии печени. Когда клетки печени не могут поддерживать минимально необходимую продукцию аденозин-5'-трифосфата (АТФ) с помощью анаэробных механизмов, в них усиливается распад имеющейся АТФ с накоплением гипоксантина, нарушается работа Na^+/K^+ -АТФазы, что ведет к невозможности поддержания внутриклеточных ионных концентраций [Lemasters J. J. et al., 2009]. В результате нарушения мембранного АТФ-зависимого ионного транспорта

происходит повышение внутриклеточных концентраций Na^+ и Ca^{2+} и развивается цитотоксический отёк, дистрофия и некроз с участием лизосомальных ферментов, активность которых при ацидозе возрастает [Peralta C. et al., 2013; Knudsen A. R. et al., 2016].

Тканевая ишемия активирует семейства протеинкиназ, которые воздействуют на специфические транскрипционные факторы, усиливающие экспрессию провоспалительных генов. В результате образуются ферменты (протеин киназа C, индуцибельная NO-синтаза, фосфолипаза A_2 , циклоксигеназа-2) и молекулы межклеточной адгезии (ICAM-1, E-селектин) [Abu-Amara, M. et al., 2010], которые способствуют развитию местного воспаления [Jaeschke H., Woolbright B. L., 2012]. Высвобождение из поврежденных гепатоцитов цитоплазматических ферментов и субклеточных фрагментов приводит к активации синтеза ключевых провоспалительных цитокинов – фактора некроза опухолей- α (TNF- α), интерлейкина-1 и -6 (ИЛ-1, ИЛ-6), γ -интерферона (INF- γ), что приводит к миграции лейкоцитов в паренхиму печени и к развитию вторичного повреждения иммунокомпетентными клетками [Jaeschke H., Woolbright B. L., 2012; Olthof P. B. et al., 2017]. Важную роль в этом механизме играют клетки Купфера, ингибирование которых оказывало протективный эффект при ИПП [Li J. Y. et al., 2009]. Кроме того, гипоксия вызывает усиление восстановительного карбоксилирования в митохондриях, что ведет к увеличению генерации АФК, которые могут активировать клетки Купфера, ядерный транскрипционный фактор каппа В (NF- κB) и усиливать продукцию TNF- α , ИЛ-1, а также активность многих провоспалительных генов [Jiang L. et al., 2016]. Генерация АФК в митохондриях при гипоксии повышается, так как возрастает доля одноэлектронного восстановления кислорода, сродство которого к убихинону выше, чем к цитохромоксидазе С [Fuhrmann D. C., Brüne B., 2017]. Повышение проницаемости митохондриальной мембраны при дефиците АТФ и под влиянием АФК способствует высвобождению цитохрома С и активации p53 с последующей апоптотической гибелью клеток печени [Hines, I. N. et al. 2011; Kim H. J. et al. 2015]. Остановка кровотока в печени при ишемии может активировать процессы свертывания крови, что в последующем при реперфузии способствует микроциркуляторным расстройствам, феномену «no-reflow» и пролонгации гипоксиче-

ского состояния органа после восстановления кровотока по магистральным печеночным сосудам [Nastos C. et al., 2014].

Вместе с тем ишемия является индуктором многих внутриклеточных протеинкиназных каскадов, отвечающих за адаптацию тканей к гипоксии. Использование коротких периодов ишемии перед основным периодом легло в основу метода ишемического preconditionирования, который позволяет увеличить устойчивость органов при критических периодах ишемии [Song X. et al., 2012; Robertson F. P. et al., 2016]. Ишемия препятствует убиквитинизации и протесомальному разрушению субъединицы 1α гипоксией индуцируемого фактора (ГИФ- 1α), который отвечает за активацию многих проадаптивных генов, таких как гены гликолиза, ангиогенеза, антиоксидантных ферментов, Nrf2, FOXO3, NO-синтазы, гемоксигеназы-1 и др. [Knudsen A. R. et al., 2010; Song X. et al., 2012; Cho S. et al., 2015; Zhao R. et al., 2016]. Гипоксия приводит к усилению процесса митофагии и ремоделированию дыхательной цепи митохондрий с целью поддержания трансмембранного потенциала и продукции АТФ в них в условиях дефицита кислорода [Go K. L. et al., 2015; Fuhrmann D. C., Brüne B., 2017]. Активация NF- κ B при ишемии может стимулировать экспрессию антиоксидантных и антиапоптотических факторов, что препятствует гибели клеток печени при реперфузии [Hines, I. N. et al. 2011].

Парадоксально, но недостаток O_2 в клетках способствует увеличению образования в них АФК. Источником повышенной генерации свободных радикалов при ишемии являются дыхательная цепь транспорта электронов митохондрий и NO-синтаза [Shi S., Xue F., 2016]. Накопление восстановленных переносчиков в дыхательной цепи при ишемии создает условия для «утечки электронов» и повышенной генерации АФК в митохондриях [Hu Q. et al., 2015]. Наиболее активными местами генерации O_2^{*-} и H_2O_2 являются NADH-дегидрогеназный комплекс I и цитохром- bc_1 комплекс III электрон-транспортной цепи митохондрий, т.к. сродство кислорода к убихинону выше, чем к конечной цитохромоксидазе с [Murphy, M. P., 2009]. Кроме того, показано, что активность антиоксидантных ферментов при ишемии понижается, являясь дополнительным фактором развития окислительного стресса как при ишемии, так и при реперфузии [Jiang Q. et al., 2016].

Реперфузия. Возобновление артериального кровотока и кислородного снабжения является необходимым условием для восстановления функции ишемизированного органа. Если период ишемии длится дольше критического, ткани погибают и выполнение функции становится невозможным. Поэтому восстановление кровотока обычно рассматривают как положительный факт, способствующий улучшению функционирования органа после периода сосудистой окклюзии. Вместе с тем именно приток богатой кислородом крови является пусковым механизмом развития реперфузионных повреждений, приводящих к дисфункции или гибели клеток после ишемии [Olthof P. V. et al., 2015]. Выраженность реперфузионных нарушений зависит от длительности, глубины и температурного режима ишемии, так как данные аспекты определяют уровень накопления гипоксантина, лактата, скорость конверсии ксантиндегидрогеназы в ксантиноксидазу, активацию клеток Купфера, степень нарушения ионных градиентов и повышения проницаемости мембран митохондрий [Peralta C. et al., 2013; Go K. L. et al., 2015]. В первые минуты реперфузии поступление в орган богатой кислородом крови вызывает всплеск образования АФК, повышение проницаемости митохондрий, окислительный стресс, активацию клеток Купфера, дисфункцию эндотелия, что может впоследствии приводить к гибели клеток результате некроза или апоптоза [Murphy M. P. et al., 2009; Nastos C. et al., 2014; Go K. L. et al., 2015]. Поскольку большинство механизмов реперфузионного повреждения прямо или косвенно связаны с окислительным стрессом, данный вопрос следует осветить подробнее.

Окислительный стресс. Окислительный стресс – это состояние, при котором антиоксидантная система не способна контролировать повышенное образование АФК, что приводит к усилению свободнорадикальных процессов и повреждению ими липидов клеточных и субклеточных мембран, ферментов, структурных белков и даже ДНК [Granger D. N., Kvietys P. R., 2015]. В целом процесс свободнорадикального повреждения может закончиться для клетки гибелью различными механизмами, включая некроз или апоптоз. Даже временная клеточная и органная дисфункция в процессе кислородной атаки при реперфузии является опасным состоянием для всего организма, особенно для органов, играющих важную роль в процессах жизнеобеспечения. Печень

как орган, выполняющий основную функцию детоксикации в организме, постоянно подвергается окислительному стрессу и обладает мощной системой антиоксидантной защиты [Bolondi G. et al., 2016]. Вместе с тем как орган, высокочувствительный к нехватке O_2 , при ИРП легко подвергается окислительному стрессу, который является ключевым патофизиологическим механизмом при синдроме ИРП [Weigand K. et al., 2012; Liu B. et al., 2015].

Нарушение прооксидантно-антиоксидантного состояния при ИРП происходит путем избыточного образования свободных радикалов разными механизмами: ферментативным – активацией ксантиноксидазы (КО), NADPH-оксидаз, ферментами дыхательной цепи митохондрий, индуцибельной NO-синтазы и неферментативным – спонтанная дисмутация или участие в реакциях с металл-содержащими протеинами переменной валентности, в т.ч. с гемоглобином [Elias-Miró M. et al., 2013; Granger D. N., Kvietys P. R., 2015]. Участие гемоглобина в поддержании прооксидантно-антиоксидантного равновесия будет обсуждено ниже (см. раздел 1.3). В данном разделе рассмотрим другие пути генерации АФК. Установлено, что в печени в течение первых минут после реперфузии повышается уровень АФК, таких как супероксид анион (O_2^{*-}), гидропероксид водорода (H_2O_2) и гидроксильный радикал (OH^*) [Weigand K. et al., 2012]. Источником АФК в органе после ишемии могут быть клетки Купфера, гепатоциты, мигрировавшие нейтрофилы и даже эндотелий синусоидов [Jegatheeswaran S. et al., 2011; Jaeschke H., Woolbright B. L., 2012; Weigand K. et al., 2012]. При этом активация клеток Купфера и гепатоцитов происходит практически сразу, тогда как миграция нейтрофилов и «респираторный взрыв» требуют обычно нескольких часов.

Все клетки печени могут повышать продукцию свободных радикалов кислорода в системе гипоксантин/КО, а также вследствие увеличения «утечки электронов» в дыхательной цепи митохондрий [Jaeschke H., Woolbright B. L., 2012; Li J. et al., 2015]. КО (EC 1.17.3.2) образуется в клетках печени при ишемии из ксантиндегидрогеназы, а ее субстрат – гипоксантин – является продуктом деградации пуриновых оснований. Активность КО регулируется напряжением кислорода на посттрансляционном уровне, о чем свидетельствуют исследования, демонстрирующие обратную связь между напряжением O_2 и активностью фермента [Poss W. B. et al., 1996]. Ряд провоспалительных цитокинов, таких

как ИЛ-1, ИЛ-6, TNF- α , способны повышать экспрессию КО [Cantu-Medellin N., Kelley E. E., 2013]. При реперфузии КО с участием O_2 и NAD^+ образует ксантин и O_2^{*-} , который спонтанно дисмутирует в H_2O_2 [Granger D. N., Kvietys P. R., 2015]. КО может катализировать дальнейшее превращение ксантина в мочевую кислоту с образованием тех же АФК. Применение аллопуринола – ингибитора КО – существенно снижает образование АФК и повреждения печени при реперфузии [Messiha B. A. et al., 2015]. Важно отметить, что КО может проявлять нитритредуктазную активность, восстанавливая нитриты и нитраты до NO [Cantu-Medellin N., Kelley E. E., 2013]. Установлено, что восстановление нитритов и нитратов в NO с помощью КО усиливается при гипоксии и ацидозе [Maia L. B. et al., 2015], что может рассматриваться как защитная реакция на гипоксию с целью вазодилатации и увеличения притока кислорода к тканям. Вместе с тем одновременная генерация O_2^{*-} и NO способна привести к образованию мощного окислителя – пероксинитрита ($ONOO^{*-}$), способного повреждать липиды, белки и ДНК клеток печени при ИРП [Gao L. et al., 2016]. Однако ингибирование КО аллопуринолом нивелирует защитный эффект донаторов NO при ИРП, что может указывать на важность нитритредуктазной активности фермента для коррекции реперфузионных нарушений [Granger D. N., Kvietys P. R., 2015]. Таким образом, роль КО в развитии окислительного стресса при ИРП остается до конца не ясной.

Существенное значение в окислительном стрессе при ИРП играет цепь тканевого дыхания митохондрий [Hu Q. et al., 2015]. Митохондрии в норме используют 1-2% потребляемого кислорода на образование АФК, в первую очередь O_2^{*-} . Повышение уровня восстановленных переносчиков в дыхательной цепи при ишемии частично блокирует процессы окисления в начальной фазе реперфузии, что создает условия для повышенной генерации АФК в митохондриях при восстановлении притока O_2 [Murphy, M. P., 2009; Hu Q. et al., 2015]. Как при ишемии, так и при реперфузии печени комплекс I и комплекс III электрон-транспортной цепи митохондрий являются ключевыми местами «утечки электронов» и генерации O_2^{*-} в митохондриях [Murphy, M. P., 2009]. Показано, что генерация АФК при ИРП способна повреждать сами ферменты дыхательной цепи митохондрий, усугубляя энергодефицит при реперфузии [Kim J. S. et al., 2012], замыкая пороч-

ный круг патогенеза данного синдрома. АФК повышают проницаемость митохондриальной мембраны, снижают трансмембранный ионный потенциал, повышают внутримитохондриальный уровень кальция, что приводит к разобщению окислительного фосфорилирования, отеку митохондрий, высвобождению из них цитохрома *c* и запуск механизмов апоптоза [Go K. L. et al., 2015]. Примечательно, что от того, какой процесс преобладает при ИРП – снижение продукции АТФ или выход цитохрома *c* – зависит механизм гибели клетки путем некроза или апоптоза, соответственно [Weigand K. et al., 2012].

Еще одним источником АФК в клетках печени может быть активация NADPH-оксидаз клеток Купфера и мигрировавших нейтрофилов [Jaeschke H., Woolbright B. L., 2012]. Последние поддерживают окислительный стресс в позднюю фазу реперфузионного повреждения, тогда как АФК купферовских клеток являются индукторами многих патологических реакций в раннюю фазу [Peralta C. et al., 2013]. Активация клеток Купфера и их АФК, цитокины и протеазы могут изменять активность редокс-чувствительных факторов транскрипции (NF- κ B и др.), усиливая продукцию АФК в эндотелиоцитах и гепатоцитах [Weigand K. et al., 2012]. Считают, что α -TNF, высвобождаемый клетками Купфера, может вызывать гибель гепатоцитов и эндотелия синусоидов при реперфузии механизмами некроза и/или апоптоза [Li J. Y. et al., 2009]. Клетки Купфера активируются при ИРП системой комплемента, играя важную роль в механизме раннего повреждения органа, т.к. генерируемые ими АФК могут разрушать ГИФ-1 α и нивелировать его защитные эффекты [Abu-Amara M. et al., 2010; Chen K. et al., 2017]. Процесс активации этих клеток при ИРП может охватить весь орган даже при долевой ишемии печени, которая часто используется при выполнении частичной резекции печеночной ткани [Abu-Amara M. et al., 2010; Jaeschke H., Woolbright B. L., 2012]. Под воздействием АФК в звездчатых макрофагоцитах происходит активация инфламмосом и NF- κ B, что ведет к образованию мощных провоспалительных цитокинов – ИЛ-1 и TNF- α , которые являются хемоаттрактантами для нейтрофилов и способствуют миграции последних в паренхиму печени при реперфузии [Qiao Y. L. et al., 2014; Kim H. Y. et al., 2015; Fuhrmann D. C., Brüne B., 2017]. Мигрировавшие нейтрофилы обладают мощной системой поверхностных

NADPH-оксидаз, которые являются основным инструментом «респираторного взрыва» в этих клетках, т.е. резкого увеличения потребления кислорода с целью генерации O_2^{*-} и других АФК [Woolbright B. L., Jaeschke H., 2015]. Более того, наличие миелопероксидазы в нейтрофилах способствует образованию гипохлорит-аниона (OCl^-) и гипохлорной кислоты ($HOCl$), которые являются сильными окислителями и способны неспецифически повреждать ткани [Jiang Q. et al., 2016]. В целом повышенная генерация АФК в печени не прекращается спустя часы после начала реперфузии и может стать триггерным механизмом для системного воспалительного ответа, приводящего к полиорганной недостаточности, которая часто вовлекает легкие, сердце и даже почки [Liu B., Qian J. M., 2015].

Под влиянием цитокинов (ИЛ-1, $TNF-\alpha$, $INF-\gamma$) и АФК в клетках Купфера, гепатоцитах и нейтрофилах при ИРП может активироваться индуцибельная форма NO-синтазы, которая является источником значительных количеств NO [Ngo B. T. et al., 2013]. NO может быстро взаимодействовать с O_2^{*-} , образуя мощный окислитель – $ONOO^{*-}$, прямо повреждающий липиды, белки и ДНК, что способно потенцировать окислительный стресс в синусоидах и паренхиме в раннем реперфузионном периоде при ИРП [Abu-Amara M. et al., 2012; Ngo B. T. et al., 2013; Zhang Y. Q. et al., 2017]. Последующее образование пероксиазотистой кислоты ($ONOOH$) и ее спонтанный распад приводит к появлению нитрит-радикала ($\cdot NO_2$) и $OH\cdot$, что позволило называть данный свободнорадикальный процесс «нитрозирующим стрессом», а $ONOO^{*-}$, $ONOOH$, $\cdot NO_2$ – активными формами азота [Zheng N. et al., 2017].

При повышенной генерации АФК и активные формы азота взаимодействуют как с биологическими молекулами (белками, липидами, ДНК), так и друг с другом, дисмутируя и вступая в реакции аннигиляции, тем самым снижая уровень свободнорадикальных процессов [Kalyanaraman B., 2013]. Поэтому важным показателем окислительного стресса является состояние параметров антиоксидантной защиты. Основными факторами антиоксидантной защиты клеток считают антиоксидантные ферменты: супероксиддисмутазу (СОД), глутатион-пероксидазу и каталазу, а также восстановленный глутатион (GSH) и α -токоферол [Shi S., Xue F., 2016; Cannistrà M. et al., 2016]. Существуют три формы

СОД: цитоплазматическая Cu/ZnСОД, митохондриальная MnСОД и внеклеточная СОД [Granger D. N., Kvietys P. R., 2015]. СОД катализует реакцию дисмутации O_2^{*-} в перекись водорода, которая затем подвергается распаду на кислород и воду под влиянием каталазы или глутатионпероксидазы. Показано, что ИРП ведет к снижению активности СОД и концентрации GSH в гомогенате печени на фоне повышения активности процессов ПОЛ [Deng W. S. et al., 2016]. Использование авторами мелатонина дозозависимо восстанавливало активность СОД, содержание GSH, понижало концентрацию малонового диальдегида (МДА) и уровень маркеров поражения печени – АлАТ и АсАТ. Установлено, что активность глутатион-пероксидазы при ИРП также снижается при одновременном повышении активности миелопероксидазы и уровня МДА [Jiang Q. et al., 2016]. В работе Akbari G. et al. показано снижение активности СОД, каталазы и глутатионпероксидазы при ИРП у крыс [Akbari G. et al., 2017]. Таким образом, при ИРП наблюдается общее снижение антиокислительного потенциала, что в условиях повышенной генерации АФК способствует усилению окислительного и нитрозирующего стресса.

Повреждения тканей при ИРП могут быть обусловлены как прямым токсическим действием АФК, активных форм азота, НОС1 на белки, ДНК, липиды, так и не прямым – через активацию провоспалительных генов, индукцию апоптоза и др. [Jaeschke H., Woolbright B. L., 2012]. Благодаря цепному механизму, ПОЛ является наиболее повреждающим процессом при развитии окислительного стресса. Наиболее вероятные инициаторы ПОЛ – $OH^{\bullet}$ и продукт протонирования O_2^{*-} – гидропероксильный радикал ($HO_2^{\bullet}$), которые отбирают протоны водорода в β -положении двойных связей полиненасыщенных жирных кислот клеточных мембран, превращая последние в радикалы жирных кислот ($L^{\bullet}$). Взаимодействуя с O_2 , $L^{\bullet}$ образует пероксил-радикал жирной кислоты ($LOO^{\bullet}$), который стремится отнять протон водорода у следующей ненасыщенной жирной кислоты, восстанавливаясь до гидроперекиси жирной кислоты ($LOOH$). Потерявшая протон водорода жирная кислота превращается в $L^{\bullet}$ и цепочка реакций может продолжаться вплоть до полного разрушения биологической мембраны [Arauz J. et al., 2016]. Смещение двойной связи в $LOOH$ приводит к образованию первичных продуктов ПОЛ – диеновых конъюгатов (ДК). $LOOH$ является нестойким соединением.

ем и подвергается окислению, что приводит к образованию вторичных продуктов ПОЛ – ненасыщенных альдегидов, в т.ч. малонового диальдегида (МДА). Продуктами взаимодействия МДА с аминокислотами являются основания Шиффа (ОШ). Повышение даже одного показателя ПОЛ рассматривается как нарушение прооксидантно-антиоксидантного баланса и указывает на развитие окислительных повреждений [Биленко М. В., 1989]. В конечном счете повышенная продукция свободных радикалов приводит к снижению уровня структурных антиоксидантов (токоферол, ретинол) и истощению ферментативных антиокислительных систем (СОД, каталаза, глутатионпероксидаза), что способствует снижению контроля свободнорадикальных процессов ПОЛ биологических мембран [Granger D. N., Kvietys P. R., 2015; Liu B., Qian J. M., 2015]. Последнее повышает их проницаемость для натрия и кальция, что приводит к клеточному отеку и активации кальций-зависимых лизосомальных ферментов и гибели клеток путем некроза. Кроме того, повреждение митохондриальных мембран гепатоцитов и выход цитохрома *c* в цитозоль может усиливать процессы апоптоза в печени при ишемии-реперфузии [Li J. et al., 2015]. Так, окислительный стресс ведет к усилению апоптоза и снижению количества эндотелиоцитов в сосудах, обеспечивающих тканевую кровоток, и развитию тромбоза, что усиливает нарушения микроциркуляции в печени [Liu B., Qian J. M., 2015].

Апоптоз. Апоптоз, или «самоубийство клеток» – это жестко регулируемый, энергетически-зависимый процесс, сопровождающийся активацией синтеза эндонуклеаз *de novo*, приводящий к расщеплению дезоксирибонуклеиновых кислот (ДНК) на множество фрагментов размером 180-200 пар оснований (bp) [Guicciardi, M. E. et al., 2013]. Апоптозные клетки морфологически характеризуются вакуолизацией цитоплазмы, ядерной и цитоплазматической конденсацией и последующим разрывом ядерной мембраны и формированием множественных фрагментов конденсированного ядерного материала в цитоплазме (апоптозные тельца). Митохондрии при этом повреждаются в меньшей степени. Апоптоз обычно встречается в отдельных клетках и служит физиологическим механизмом удаления старых, повреждённых или аномальных клеток. Апоптозные клетки поглощаются макрофагами без высвобождения протеолити-

ческих ферментов и сопутствующего воспаления [Quesnelle K. M. et al., 2015].

Известно, что апоптоз является первичным механизмом гибели клеток при различных патологических состояниях. Экспериментально подтвержден факт участия апоптоза в патогенезе реперфузионных повреждений печени [Guan L.Y. et al., 2014]. Ключевым индуктором апоптоза при реперфузии печени идентифицировано семейство нелизосомальных цитоплазматических Ca^{2+} -зависимых протеаз [Quesnelle K. M. et al., 2015]. Установлено, что повреждение митохондрий и АФК могут быть индукторами апоптоза [Weigand K. et al., 2012]. Установлена апоптотическая гибель клеток в перипортальных областях в раннем периоде реперфузии, которая распространялась затем на среднедольковые участки [Sasaki H. et al., 1998]. Авторы указывают на потенциальную роль АФК и окислительного стресса, которые могут инициировать механизмы апоптоза. В другой работе [Kohli, V. et al., 1999] на модели 30- и 60-минутной 70% ишемии печени крыс с последующей реперфузией в течение 24 ч установлено, что апоптозу подвергаются как эндотелиальные клетки синусоидов, так и гепатоциты. В эндотелиальных клетках синусоидов программируемая гибель клеток проявляется раньше, чем в гепатоцитах, но только после начала реперфузии, а не во время ишемии. Апоптоз становится также более значительным с увеличением времени реперфузии и при более длительных сроках ишемии. Так, количество подвергавшихся апоптозу эндотелиальных клеток синусоидов и гепатоцитов после 60 мин. ишемии составило через 60 мин. реперфузии 22% и 2%, а через 24 ч реперфузии – 53 и 48%, соответственно [Kohli, V. et al., 1999]. Развитие апоптоза гепатоцитов при ИРП наблюдается одновременно с инфильтрацией в паренхиму органа нейтрофилов, а индукция механизмов апоптоза в печени при реперфузии может идти при участии α -TNF [Quesnelle K. M. et al., 2015].

В работе [Kato Y. et al., 2001] исследовали топографию окислительного стресса *in situ* по конверсии нитросинего тетразолия в синий формазан на изолированной печени, которые подвергали 30 или 60 минутам ишемии. Авторы установили, что окислительному стрессу на 30-й минуте реперфузии подвергаются гепатоциты перипортальных участков. Затем на 60-й минуте реперфузии окислительный стресс распространялся на средне-

дольковые участки. Сравнивая топографию гибели клеток, определяемой *in situ* трипановым синим, со степенью окислительного стресса установили, что гибель гепатоцитов при реперфузии совпадает с максимальной выраженностью окислительного стресса и располагается в перипортальных участках. Эндотелиальные клетки синусоидов подвергаются окислительному стрессу преимущественно в центрлобулярных и среднедольковых отделах на 12-й минуте реперфузии, а их гибель на 30-й минуте реперфузии в перипортальной зоне и среднедольковых отделах выражена слабо [Kato Y. et al., 2001]. Характерно, что использование аллопуринола как ингибитора КО в данной работе уменьшало окислительный стресс и гибель гепатоцитов в перипортальных регионах. Установлено, что количество эндотелиальных клеток и гепатоцитов, подвергшихся апоптотическим изменениям после выполнения гепатэктомии, было значительно меньшим у пациентов, которым перед окклюзией афферентных сосудов проводили preconditionирование [15]. Локализация клеток, подвергшихся апоптозу, и окислительного стресса преимущественно в перипортальных областях указывает на кислородзависимый характер данного механизма гибели клеток печени при реперфузии.

Транспорт кислорода. Поскольку основной всплеск генерации АФК при реперфузии зависит от поступления O_2 после ишемии, в условиях реоксигенации большое значение в развитии повреждений печени имеет состояние КТФ крови, а именно, сродство гемоглобина к кислороду (СГК), изменения которого могут существенно влиять на степень окислительного стресса при ИРП [Зинчук В. В. и др., 2002]. Кислородсвязывающие свойства крови могут существенно влиять на развитие дисбаланса между способностью тканей к полноценной утилизации кислорода и его доставкой при ИРП, причем снижение сродства гемоглобина к кислороду (СГК) усиливает его, тогда как увеличение – ослабляет [Зинчук В. В., Ходосовский М. Н., 2006]. Снижению СГК может способствовать метаболический ацидоз, образование нитрозилгемоглобина, индукция системного воспалительного ответа в организме после ишемии печени. Увеличение потока O_2 в ишемизированные ткани печени при реперфузии усиливает дисбаланс между восстановленными переносчиками электронов дыхательной цепи митохондрий и их акцепторами, что способствует повышению генерации АФК. Повышение генерации АФК сопро-

воздается снижением продукции оксида азота (NO), по-видимому, вследствие снижения функции NO-синтазы в эндотелии синусоидов [Weigand K. et al., 2012]. Так как NO является вазодилататором, снижение его уровня ухудшает процессы микроциркуляции, вызывает феномен *no-reflow* и усиливает реперфузионные повреждения печени [Phillips L. et al., 2009]. Потенцирование окислительного стресса правосторонним сдвигом кривой диссоциации оксигемоглобина (КДО) является ведущим патогенетическим механизмом участия КТФ крови в развитии реперфузионных повреждений печени [Зинчук В. В., Ходосовский М. Н., 2006]. Вместе с тем восстановление кислородного снабжения в ишемизированных тканях является абсолютно необходимым условием восстановления их функции. Поэтому внимание большинства ученых в данной области исследований (Европа, США, Канада, Япония и в последнее время Китай) сосредоточилось на поиске методов и средств коррекции постишемических повреждений органа.

1.2. Основные подходы к коррекции постишемических повреждений печени

Большинство существующих способов коррекции синдрома ишемии-реперфузии печени можно разделить на 4 большие группы.

Первая группа – фармакологические препараты: антиоксиданты (N-ацетилцистеин, α -токоферол, каталаза, глутатион и др.), противовоспалительные средства (ингибиторы системы комплемента, клеток Купффера, ИЛ-1, TNF- α), иммуносупрессанты (сиролимус), вазодилататоры (донаторы и прекурсоры оксида азота, аналоги простациклина, вазодилатирующий пептид), ингибиторы апоптоза (Z-DEVD-FMK – ингибитор каспаз 3 и 7), ингибиторы ферментов (протеаз, НАДН-оксидазы, циклооксигеназы-2, ксантиноксидазы), гормоны и гормоноподобные вещества (метилпреднизолон, мелатонин, эритропоэтин) [Schmidt R. et al., 2010; Vardanian A.J. et al., 2008; Sasaki M. et al., 2007; Jaeschke H., Woolbright B. L., 2012]. Недостатком этой группы является селективность воздействия препарата на определенный механизм, а не на комплекс факторов, вызывающих синдром ишемии-реперфузии. Кроме того, многие из препаратов, обладая защит-

ным действием в экспериментальных исследованиях, не показали значительного протективного эффекта в клинике. Так, в большинстве экспериментальных исследований, в которых для коррекции реперфузионных повреждений печени использовали N-ацетилцистеин, был получен протективный эффект (снижение активности трансаминаз, улучшение микроциркуляции, окислительного стресса и др.), однако в большинстве клинических испытаний при трансплантации печени разницы между пациентами, получавшими и не получавшими препарат, не выявлено [Jegatheeswaran S., Siriwardena A. K., 2011].

Вторая группа – специальные перфузионные растворы для сохранения трансплантируемых донорских органов: раствор Висконсинского университета (University of Wisconsin (UW) solution), перфторан [Lopez-Andujar R. et al., 2009]. Раствор Висконсинского университета часто дополняют фармакологическими препаратами, так как он недостаточно эффективен при реперфузии печени [Ishima Y. et al., 2013]. Достоинством перфторана является его способность эффективно выполнять газотранспортную функцию в условиях гипотермического хранения органов и последующей трансплантации [Reznik O. N. et al., 2008]. Однако данные растворы не применяются при резекциях печени и не используются у реципиентов в реперфузионном периоде, когда запускается большинство патологических механизмов синдрома ишемии-реперфузии.

Третья группа методов – генная терапия, пока представляет экспериментальный интерес, поскольку токсичность векторов (аденовирусы) и трудности в регуляции экспрессии в нужное время и в нужном месте не позволяют их использовать в клинике [Gurusamy K. S. et al., 2010]. Кроме того, роль некоторых генов в патогенезе синдрома ишемии-реперфузии печени остается до конца не выясненной и противоречивой.

Четвертая группа – хирургические манипуляции – имеют большое практическое значение. Это ишемическое preconditionирование и postconditionирование печени. Фактически хирург имитирует короткие периоды ишемии и реперфузии (по 5-10 мин.), накладывая и снимая сосудистый зажим на афферентные сосуды печени, до или после основного периода ишемии. Показано, что данные методы повышают устойчивость гепатоцитов к ишемии путем активации разных механизмов: улучшение

метаболизма, микроциркуляции, ингибирование провоспалительных цитокинов, апоптоза и др. [Zhang W. X. et al., 2009]. Установлено, что ишемическое preconditionирование печени способно снижать активность процессов перекисного окисления липидов, выраженность лейкоцитарной инфильтрации и апоптоза в реперфузионном периоде, что улучшает функционирование органа после ишемии [Alchera E. et al., 2010]. Предполагают, что механизм защитного эффекта данного способа связан с повышением продукции NO и улучшением условий микроциркуляции в органе, активацией белков теплового шока, снижением продукции провоспалительных и проапоптотических цитокинов, увеличением синтеза гипоксией индуцируемого фактора 1 (ГИФ-1) [Alchera E. et al., 2010; Song X. et al., 2012]. В наших экспериментах на кроликах с 10-минутным периодом ишемического preconditionирования печени показана ключевая роль кислородтранспортной функции крови в реализации защитного эффекта данного метода (уменьшение ацидоза, повышение кислородсвязывающих свойств крови) при реперфузии органа [Ходосовский М. Н., 2016]. В целом данная группа методов характеризуется более комплексным воздействием на механизмы реперфузионного повреждения печени, однако требует увеличения продолжительности оперативных вмешательств.

Несмотря на достаточно большой спектр методов коррекции, синдром ишемии-реперфузии печени остается проблемой медицинской науки. Ни один из методов или их комбинаций не обеспечивает гарантированной защиты от реперфузионного повреждения с последующей дисфункцией органа и гибелью пациента. По-видимому, механизмы данного синдрома до конца не выяснены и нуждаются в дальнейшем исследовании. Новые знания закономерности течения этого патологического процесса позволят разработать более эффективные способы коррекции реперфузионных повреждений, основанные на системном воздействии на разные уровни функциональной организации биологических систем в условиях ишемии-реперфузии, что является актуальной проблемой современной медицины и фармации.

Никотинамид (НА, витамин РР) относится к витаминам группы В. Он является субстратом для биосинтеза NAD⁺, регулирует ферментативную активность окислительно-восстановительных процессов, подавляет клеточную пролифера-

цию, принимает участие в репарации ДНК и модификации путей регуляции экспрессии генов и клеточной смерти. Утверждают также, что НА обладает антитератогенным эффектом [Hoshino J. et al., 1984]. В условиях дефицита НА может синтезироваться в тканях из триптофана. При декомпенсированном дефиците витамина PP развивается пеллагра, главными признаками которой являются дерматит, поражения желудочно-кишечного тракта (диарея) и слабоумие (деменция).

1-Метилникотинамид (МНА) является одним из главных метаболитов НА, синтезируемого главным образом в печени под действием фермента никотинамид-N-метилтрансферазы (никотинамид: S-аденозилметионин метилотрансфераза; EC 2.1.1.1), который затем метаболизируется в N1-метил-2-пиридон-5-карбоксамид и N1-метил-4-пиридон-3-карбоксамид под действием клеточных оксидаз [Mateuszuk L. et al., 2009]. Считается, что метаболиты НА могут выполнять важные физиологические функции. Установлено значительное влияние МНА на скорость синтеза ДНК и регуляцию клеточной пролиферации [Seifert R. et al., 1984; Hoshino J. et al., 1982]. МНА является аналогом предшественника нуклеотидных кофакторов ряда оксидоредуктаз, способным замещать молекулы никотинамида в реакциях формирования NAD^+ и NADPH^+ *in vivo*, что ведет к избирательному подавлению окислительного фосфорилирования в митохондриях [Кузнецов Д. А. и др., 2006]. Показан защитный эффект МНА при введении цитотоксических концентраций никотинамида (1-10 мМ). Считают, что данное действие может быть связано с торможением синтеза NAD^+ и последующим уменьшением потери внутриклеточной АТФ [Hoshino J. et al., 1984]. Модификация молекулы МНА путем замены одного из атомов водорода гидроксиметильной группой приводит к образованию соединения, обладающего также антибактериальными свойствами [Adamiec M. et al., 2006]. Показан значительный эффект МНА, связанный с его противовоспалительными свойствами, при использовании доз в 100 раз меньших, чем дозы никотинамида с таким же эффектом. Свойства МНА подтверждены в клинических исследованиях при лечении дерматозов и ожогов кожи, реализуемые через его взаимодействия с гликозаминогликанами на поверхности эндотелия кровеносных сосудов, уменьшающие адгезию провоспалительных клеток и

препятствующие проникновению их в ткани с различными дерматологическими заболеваниями [Gebicki J. et al., 2003].

Влияние МНА может реализовываться через эндотелий-зависимые механизмы (циклооксигеназу-2 и простациклин) [Chlopicki S. et al., 2007; Bryniarski K. et al., 2008; Jakubowski A. et al., 2016]. Установлено, что МНА вызывает дозозависимое уменьшение тромбоза в артериальных сосудах, ингибирование агрегации тромбоцитов и увеличение фибринолиза одновременно с повышением в плазме уровня метаболита простациклина – 6-кето-ПГ F1 α [Mogielnicki A. et al., 2008]. В исследованиях *in vivo* и *in vitro* показано, что МНА в дозе 2 г/кг уменьшает содержание NAD⁺ в мышечной ткани и печени, а также соотношение NAD⁺/NADPH в эритроцитах, увеличивает уровень H₂O₂, продукцию АФК и развитие окислительного стресса [Zhou S. S. et al., 2009].

Использование никотинамида предотвращает ухудшение эндотелийзависимой вазодилатации в аорте, генерацию пероксинитрита и развитие окислительного стресса [Mujumdar V. S., et al., 2001]. Никотинамид снижает также перистальтику подвздошной кишки и ингибирует вызванное фенилэфрином сужение сосудов, в то время как при использовании МНА таких эффектов не наблюдается [Ruddock M.W., Hirst D.G., 2007]. В то же время показано, что МНА оказывает мощный гастропротективный эффект при стрессовом воздействии, уменьшая окислительные повреждения и улучшая микроциркуляцию ткани [Brzozowski T. et al., 2008], проявляет также нейропротективное действие при гипергомоцистеинемии [Slomka M. et al., 2008], ишемических и гипоксических повреждениях головного мозга, регулируя активность матриксных металлопротеаз [Dragun P. et al., 2008]. Показана связь между активностью никотинамид-N-метилтрансферазы в жировой ткани и повышением уровня гомоцистеина, который снижается после использования МНА [Riederer M. et al., 2009]. Активность никотинамид-N-метилтрансферазы и эндогенная концентрация МНА увеличиваются по мере ухудшения эндотелиальной функции, сопровождающейся повышением активности GSH-Px [Mateuszuk L. et al., 2009], что оказывает защитное действие на сосуды, обеспечивая регуляторную роль в уменьшении тромбообразования и воспалительного процесса в сердечно-сосудистой системе [Chlopicki S. et al., 2007]. Применение МНА

на протяжении 8 недель также уменьшает развитие окислительного стресса и предотвращает ухудшение NO-зависимой вазодилатации сосудов при сахарном диабете [Watała C. et al., 2009].

Инъекция ЛПС приводит к активации свободнорадикальных процессов и снижению параметров антиоксидантной системы в крови и тканях, тогда как после введения МНА содержание диеновых конъюгатов и концентрация малонового диальдегида уменьшается в аорте, сердце, легких, печени и почках [Шульга Е. В., Зинчук В. В., 2009]. В крови также отмечается уменьшение активности процессов перекисного окисления липидов после применения МНА и ЛПС: концентрация диеновых конъюгатов уменьшается на 33,2% ($p < 0,05$) в плазме и на 8,9% ($p < 0,05$) – в эритроцитах. Одновременно наблюдается повышение уровня факторов антиоксидантной защиты во всех тканях после введения МНА, что проявляется в увеличении концентрации α -токоферола в аорте на 23,1%, ($p < 0,05$) в сердце – на 57,2% ($p < 0,05$), а также в повышении активности каталазы на 45,6% ($p < 0,05$) в сердце, на 104,5% ($p < 0,05$) в легких, на 49,9% ($p < 0,05$) в печени и на 43,1% ($p < 0,05$) в почках по отношению к группе животных, получавших только ЛПС. Отмечается увеличение содержания α -токоферола в плазме на 20,9% ($p < 0,05$) и снижение активности каталазы в эритроцитах на 22,9% ($p < 0,05$) по отношению к группе кроликов, которым вводили только ЛПС [Шульга Е. В., Зинчук В. В., 2009]. При исследовании концентрации гомоцистеина в плазме крови установлено, что предварительное введение МНА снижает его уровень на 44,3% ($p < 0,05$) в сравнении с группой животных, получавших только ЛПС [Шульга Е. В., Зинчук В. В., 2009]. Показано, что МНА снижает в крови уровень трансаминаз, α -TNF и ИЛ-4, что оказывает протективный эффект на печень при моделировании острого гепатита с помощью конкавалина А [Jakubowski A. et al., 2016].

Учитывая выявленные противовоспалительные и антиокислительные свойства МНА, представляется целесообразным рассмотреть возможности использования данного соединения для коррекции такого состояния, как синдром ИРП, сопровождающегося нарушением прооксидантно-антиоксидантного баланса и развитием окислительного стресса.

1.3. Роль газотрансмиттеров в развитии окислительных повреждений

Открытие в последние годы биологических эффектов монооксида углерода (CO) и сероводорода (H₂S) послужило толчком для исследования многих физиологических и патологических процессов с позиций новой концепции механизма межклеточной сигнализации, включавшей до этого классическую активацию через рецепторы или ионные каналы мембран [Moody B. F., Calvert J. W., 2011]. Термин «газотрансмиттер» был введен для характеристики газов, которые действуют как высвобождаемые нейронами транскмиттеры. Оксид азота (NO), CO и H₂S объединены под понятием «газотрансмиттеры». Все они являются небольшими молекулами газов, свободно проходят через мембраны клеток и не взаимодействуют со специфическими мембранными рецепторами, синтезируются эндогенно с помощью ферментов и их синтез может регулироваться организмом, имеют определенные специфические функции при физиологических концентрациях и их эффекты имеют свое специфическое клеточное и молекулярное предназначение. В настоящее время роль NO при синдроме ишемии-реперфузии печени является недостаточно ясной. С одной стороны, как вазодилататор оксид азота может улучшать процессы микроциркуляции, снижать миграцию и адгезию лейкоцитов и вызываемые ими повреждения органа при реперфузии [Guan L.Y. et al., 2014]. С другой же стороны, как свободнорадикальная молекула NO способен потенцировать окислительный стресс, образовывать мощные окислители (пероксинитрит), что может усугублять развитие реперфузионных повреждений [Hines I. N. et al., 2011; Gao L. et al., 2016]. Учитывая способность NO взаимодействовать с гемоглобином [Grau M. et al., 2016], представляется важным рассмотреть данный вопрос подробнее.

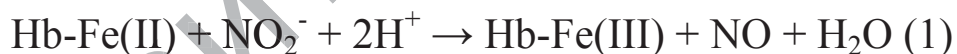
Монооксид азота. Транспорт газов кровью проявляется в переносе как O₂ и CO₂, так и NO. Причем данный газотрансмиттер диффундирует преимущественно внутрь эритроцитов. Оказавшись в просвете сосудов, оксид азота мгновенно реагирует с HbO₂ (скорость реакции ~10⁷ моль/сек) с образованием метгемоглобина и NO₂⁻. Однако биодоступность NO сохраняется благодаря его производным (нитрозогемоглобин, нитрозилгемоглобин), имеет важное функциональное значение. Данные производ-

ные гемоглобина служат альтернативным источником образования NO в крови при его дефиците [Salhany J. M., 2013; Зинчук В. В., Глуткина Н. В., 2013]. Установлено наличие собственных механизмов синтеза NO в эритроцитах, судя по накоплению конечных продуктов его метаболизма – $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$. Так, в 2006 г. Kleinbongard P. et al. выявили в эритроцитах особые протеины, расположенные на внутренней стороне плазматической мембраны и обладающие NO-синтазной активностью, сопоставимой с аналогичным ферментом в эндотелиальных клетках. Показано, что протеины с NO-синтазной активностью обеспечивает существенные регуляторные функции как для самих эритроцитов (изменение сродства к кислороду, деформируемости), так и для тромбоцитов, эндотелия и гладкомышечных клеток сосудов [Ozüyaman B. et al., 2008].

NO-синтазная активность в эритроцитах, определяемая по специфическому превращению L-аргинина в цитруллин, составляет $0,3 \pm 0,1$ пмоль/пг белка/мин, что сравнимо с активностью в культуре эндотелиальных клеток ($0,7 \pm 0,1$ пмоль/пг белка/мин) [Kleinbongard P. et al., 2006; Ozüyaman B. et al., 2008]. Умеренная физическая нагрузка значительно увеличивает NO-синтазную активность эритроцитов за счет активации протеинкиназы B (Akt), что одновременно улучшает деформируемость форменных элементов крови [Suhr F. et al., 2012], а значит и снабжение тканей кислородом. Улучшение деформируемости эритроцитов подтверждено в опытах при инкубации крови в течение 30 минут с розувастатином (20 нг/мл), что одновременно сопровождалось повышением активности эритроцитарной NO-синтазы (с $3,76 \pm 2,98$ до $24,88 \pm 4,35$, $p < 0,02$ усл. ед.) и концентрации нитритов в плазме (с $55,8 \pm 7,9$ до $98,2 \pm 12,4$ ммоль/л) [Ludolph B. et al., 2007]. Улучшение деформируемости эритроцитов происходит за счет S-нитрозилирования α - и β -спектрина форменных элементов крови [Grau M. et al., 2016].

Регуляция активности эритроцитарной NO-синтазы имеет ряд схожих механизмов с таковым в эндотелии. Данная NO-синтаза также зависит от внутриклеточной концентрации кальция и фосфорилируется с помощью фосфатидилинозитол-3-киназы. Однако из-за отсутствия в эритроцитах ядра, эндоплазматического ретикулума и комплекса Гольджи механизмы активации фермента, расположенного вблизи липидных рафтов на внутренней по-

верхности мембран, значительно ограничены. Установлено, что продукция NO эритроцитами резко возрастает при добавлении в среду L-аргинина (субстратный механизм) [Kleinbongard P. et al., 2006]. В целом механизм активации эритроцитарной NO-синтазы представляется следующим образом: повышение давления сдвига на мембрану эритроцита приводит к открытию кальциевых каналов и увеличению его внутриклеточной концентрации, последний, взаимодействуя с кальмодулином, повышает его аффинитет к эритроцитарной NO-синтазе и ослабляет ингибирующие влияния кавеолина-1 и флотиллина, что и активирует фермент [Ulker P. et al., 2011]. Снижение внутриэритроцитарной концентрации Ca^{2+} ведет к ослаблению связи с кальмодулином и повышению взаимодействия с кавеолином-1 и флотиллином, ингибируя активность эритроцитарной NO-синтазы [Ozüyaman B. et al., 2008]. Альтернативным механизмом повышения активности эритроцитарной NO-синтазы считают влияние ацетилхолина на поверхностные рецепторы мембран эритроцитов с последующим фосфорилированием серина в положении 1177 под влиянием фосфатидилинозитол-3-киназы [Carvalho F. A. et al., 2006]. Кроме того, показано, что образование NO в эритроцитах может происходить путем восстановления нитритов с помощью гемоглобина (неферментативный механизм) [Bonaventura C. et al., 2013; Bizjak D. A. et al., 2015].



Данная реакция может иметь огромное функциональное и физиологическое значение, так как наряду с высвобождением NO идет устранение двух протонов водорода, что крайне важно для компенсации ацидоза при ишемии. Показано, что неферментативный путь синтеза NO эритроцитами в ответ на гипоксию значительно усиливается в эритроцитах при сердечно-сосудистой патологии, когда одновременно нарушена их деформируемость [Grau M. et al., 2016]. При этом авторы отмечают снижение активности эритроцитарной NO-синтазы при углублении гипоксии у таких пациентов. Возможно, неферментативное восстановление нитритов в NO у эритроцитов с плохой деформируемостью выполняет роль компенсаторного механизма по увеличению до-

ставки кислорода тканям за счет образования нитрозилированного гемоглобина (Hb-Fe(II)NO) и снижения СГК.



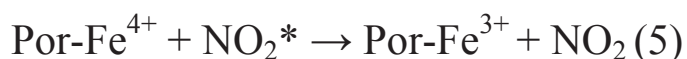
При этом биодоступность NO сохраняется, так как реакция является обратимой. Образование Hb-Fe(II)NO стабилизирует Т-конформацию гемоглобина и уменьшает СГК [Bonaventura C. et al., 2013], что особо важно для тканей, испытывающих дефицит кислорода. В капиллярах легких при оксигенации гемоглобина NO теряет электрон и перемещается на β -глобиновую цепь, соединяется с цистеином 93, образуя S-нитрозогемоглобин (SNO-Hb) [Ozüyaman B. et al., 2008]. Высвобождение NO из эритроцита идет с участием анионообменника AE1, который, соединяясь с SNO-Hb, способствует высвобождению NO наружу и одновременно способствует деоксигенации гемоглобина [Pawloski J. R. et al., 2001]. Такая внутриклеточная кислородзависимая природа образования и высвобождения NO способствует гипоксической вазодилатации в микроциркуляторном русле [Weinberg J. A. et al., 2016]. Перестройка третичной структуры гемоглобина и модификация железопорфирина, вызванные присоединением NO, обуславливают конформационные изменения апобелка в областях ближайшего белкового окружения гема и субъединичных контактов, ослабление кооперативных взаимодействий в тетрамерах, уменьшая СГК [Bonaventura C. et al., 2013]. Участие NO в R/T конформационных переходах гемоглобина в процессе циркуляции крови делают данный газ аллостерическим регулятором СГК, регулируя доставку кислорода тканям. Кроме того, взаимодействие NO с гемоглобином может изменять редокс-потенциал эритроцитов.

Показано, что гемоглобин может участвовать как в про-окислительных реакциях с образованием АФК, так и выступать в роли гасителя последних [Reeder B. J., 2010; Lu N. et al., 2014]. Так, образование промежуточных оксиферрильной ($\text{Fe}^{4+}=\text{O}$) или пероксиферрильной ($\text{Por}^{*+}-\text{Fe}^{4+}=\text{O}$) форм гемопротеина с участием перекиси водорода приводит к антиоксидантной активности гемоглобина:





Характерно то, что восстановление феррильной формы (Por-Fe^{4+}) гемоглобина может протекать с превращением нитрит-радикала (NO_2^*) в нитрит, что также является антиокислительным эффектом гемоглобина [Lu N. et al., 2014]:



Одновременно гемоглобин в процессе оксигенации/деоксигенации может участвовать в ряде прооксидантных реакций. Так, при высоком напряжении O_2 оксигемоглобиновая связь протонируется, что может вести к окислению гемма в трехвалентную форму и высвобождению пероксид радикала ($^*\text{OOH}$), тогда как при низком pO_2 молекулы воды могут занимать кислород-лиганд в гемоглобине, а кратковременное взаимодействие с O_2 приводит к образованию супероксид-аниона (O_2^{*-}) [Bonaventura C. et al., 2013]:

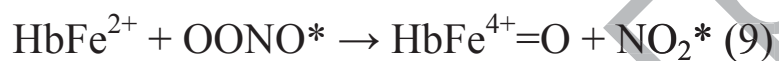


Кроме того, взаимодействие $\text{Por-Fe}^{4+}=\text{O}$ с H_2O_2 также может стать источником супероксид-анион радикала [Rifkind J. M., Nagababu E., 2013]:



NO взаимодействует с O_2^{*-} с образованием пероксинитрита (ONOO^*), который может быть не только сильным окислителем, повреждающим биомолекулы эритроцитарной мембраны, но и модификатором свойств гемоглобина. Так, в мембране эритроцитов, подвергшихся действию пероксинитрита, методом атомно-силовой микроскопии выявлены изменения микро- и макроструктуры, что свидетельствует о нарушении механических свойств мембранной поверхности клеток и может лежать в основе изменения микроциркуляции при нитрозилирующем стрессе [Старо-

дубцева М. Н. и др., 2006]. Однако основной мишенью пероксинитрита в эритроците является гемоглобин. Скорость взаимодействия $\text{ONOO}^{\cdot-}$ с HbO_2 и Hb на три порядка выше, чем таковая у перекиси водорода [Exner M., Herold S., 2000]. В результате взаимодействия пероксинитрита с окси- или дезоксигемоглобином могут образовываться другие свободные радикалы ($\text{NO}_2^{\cdot-}$, $\text{O}_2^{\cdot-}$, $^{\cdot}\text{OH}$) и метгемоглобин, потенцирующие окислительный стресс [Стародубцева М. Н. и др., 2003; Romero N., Radi R., 2005; Rifkind J. M., Nagababu E., 2013]. Вместе с тем, пероксинитрит окисляет гемоглобин через образование промежуточных феррильной ($\text{Fe}^{4+}=\text{O}$) или перферрильной ($\text{Por}^{*+}-\text{Fe}^{4+}=\text{O}$) форм гемоглобина, что можно рассматривать как реакции элиминации данного мощного окислителя [Exner M., Herold S., 2000].



Образовавшийся нитрит анион, взаимодействуя с феррильной формой гемоглобина, может оказывать антиокислительный эффект, восстанавливая гемоглобин до трехвалентной формы, одновременно повышая активность енолазы эритроцитов путем нитрования тирозина 191 [Lu N. et al., 2014]. Таким образом, гемоглобин может обеспечивать защиту от пероксинитрита, выполняя функцию внутриклеточного антиоксиданта, что уменьшает вероятность образования его высоких концентраций и, следовательно, его повреждающего действия. Являясь источником нитритов, реакции взаимодействия NO с гемоглобином могут служить мощным фактором посттрансляционной модификации белков, активации/ингибирования внутриклеточных сигнальных каскадов, что изменяет функцию эффекторных тканей-мишеней данного газотрансммиттера [Speckmann B., et al. 2016]. Так, нитриты, участвуя в реакциях с дезоксигемоглобином, являются потенциальным региональным и системным вазодилататором, активатором апоптоза, ингибитором синтеза простагличина и т.д. [Kim-Shapiro D. B., Gladwin M. T., 2014; Speckmann B., et al. 2016]. Существует определенная связь между SGK и процессами его аутоокисления и окислительной модификации [Зинчук В. В., Глуткина Н. В., 2013]. Гемоглобин выступает в роли редокс-активного соединения, формируя псевдопероксидазный каталитический цикл, возникающий между Fe^{3+} и Fe^{4+} при поглощении гемогло-

бином H_2O_2 . Возможная роль кислородсвязывающих свойств крови в модифицировании механизмов клеточной сигнализации: недостаток кислорода ведет к изменению редокс-состояния гемоглобина (HbFe^{3+} и HbFe^{4+}), что в свою очередь увеличивает экспрессию таких протеинов, как фосфорилирование гипоксически индуцибельного фактора-1 α и гемоксигеназы [Yeh L. H., Alayash A. I., 2003]. Гемоглобин, регулируя содержание NO в том или ином регионе организма, формирует определенный уровень прооксидантно-антиоксидантного состояния. При нормальных физиологических условиях, когда количество образуемого NO невелико, прооксидантные эффекты пероксинитрита и H_2O_2 угнетаются антиоксидантной функцией NO, а в условиях сдвига прооксидантно-антиоксидантного баланса, чрезмерного образования O_2^- и, соответственно, пероксинитрита и H_2O_2 реализуется прооксидантный эффект NO [Зинчук В. В., Глуткина Н. В., 2013].

Синдром ИРП сопровождается значительным окислительным стрессом (см. выше), что может нарушать редокс-потенциал эритроцитов и менять кислородсвязывающие свойства крови [Ходосовский М. Н., 2004]. Поскольку эффекты NO на кислородсвязывающие свойства крови и прооксидантно-антиоксидантное состояние сильно зависят от условий среды и уровня окислительного стресса, представляется важным изучение данных параметров во взаимосвязи на модели ИРП у экспериментальных животных в условиях инфузии донаторов оксида азота.

Моноксид углерода. Вторым соединением, отнесенным к газотрансмиттерам, является монооксид углерода – CO (угарный газ), который долгое время считался исключительно экзогенным токсическим веществом. Однако в 60-х годах 20 века было показано, что CO образуется в организме человека в результате распада гемоглобина под воздействием фермента гемоксигеназы, который способствует ферментативному распаду гема на билливердин, железо и CO [Coburn R. F. et al., 1963]. Позднее было установлено, что гемоксигеназа является широко распространенным и неотъемлемым клеточным ферментом для всех эукариот, использующих гемопротеины в аэробных процессах окисления [Liu A. A. et al., 2014]. На сегодняшний день установлены три типа гемоксигеназ: гемоксигеназа-1, -2 и -3. Гемоксигеназа-1 обнаружена в большинстве органов и тканей млекопитающих: печени, селезенке, поджелудочной железе, кишечнике, почках, сердце,

легких, головном и спинном мозге, кож, гладкомышечных и эндотелиальных клетках сосудов и др. [Origassa C. S., Câmara N. O., 2013; Liu B., Qian J. M., 2015]. Данный фермент локализуется в клеточной мембране, кавеолах, эндоплазматическом ретикулуме, ядре и митохондриях, является индуцибельным и активируется под воздействием различных стрессоров, в том числе цитокинов, гипоксии, NO и АФК, обладает мощным антиоксидантным, противовоспалительным эффектом, что позволило отнести его к семейству белков теплового шока (*heat shock protein*) под номером 32 (*hsp-32*). В обычных условиях экспрессия гемоксигеназы-1 невелика, за исключением селезенки, где фермент участвует в утилизации гемоглобина отслуживших свой срок эритроцитов. Гемоксигеназа-2 является конституциональным ферментом большинства клеток, локализованным в митохондриях, имеет дополнительные активные центры для связывания гема и, возможно, участвует в регуляции многих клеточных функций [Origassa C. S., Câmara N. O., 2013]. Наличие гемоксигеназы-3 у млекопитающих точно не установлено, в основном данный фермент используется растениями для синтеза хромофоров [Emborg T. J. et al., 2006].

Вплоть до 90-х годов CO считался побочным продуктом распада гема в гемоксигеназной реакции, однако затем были установлены его нейротрансмиттерные свойства [Dawson T. M., Snyder S. H., 1994]. Так, CO, как и NO, реализует свои эффекты через гуанилатциклазу, поддерживая уровень цГМФ в клетках даже в условиях ингибирования NO-синтазы, усиливает синаптическую передачу и проводимость импульсов в нервных волокнах, однако, в отличие от NO, реализует свой эффект через метаболитные рецепторы. Образование CO в нейронах обеспечивает гемоксигеназа-2, максимальная активность которой наблюдается в области обонятельных луковиц [Ewing J. F., Maines M. D., 1992]. Учитывая гуанилатциклазный механизм действия CO, вскоре были установлены его вазоактивные свойства [Cocceani, F., 1993; Suematsu M. et al., 1995; Zakhary R. et al., 1996]. Важно, что активация гемоксигеназы-1 может происходить под влиянием пероксинитрита, что является важным сигнальным механизмом защиты от окислительного стресса [Ryter S. W. et al., 2006; Ayer A. et al., 2016]. Как и NO, монооксид углерода, синтезируемый в эндотелии гемоксигеназой-2, проявил себя как вазодилататор, после чего начался период интенсивного изучения роли монооксида уг-

лерода в развитии сердечно-сосудистой патологии [Otterbein L. E. et al., 2016].

Установлено, что помимо способности оказывать нейтротрансмиттерный и вазодилатирующий эффекты, СО способен уменьшать агрегацию тромбоцитов, активировать фибринолиз, подавлять пролиферацию гладкомышечных клеток, фибробластов и Т-лимфоцитов, ингибировать апоптоз и синтез провоспалительных цитокинов, снижать экспрессию молекул межклеточной адгезии [Nakao A., Toyoda Y., 2012; Olas B., 2014; Ayer A. et al., 2016]. Авторами показан защитный эффект СО при такой патологии, как атеросклероз, ишемическая болезнь сердца, гипертензия, синдром ишемии-реперфузии. Так, изопреналин (изадрин), известный β -адреномиметик, способный активировать гемоксигеназу-1 протеинкиназным путем, оказывал существенный защитный эффект на сердце при моделировании синдрома его ишемии-реперфузии у крыс, понижая концентрацию МДА, экспрессию ИЛ-6 и α -TNF и восстанавливая активность СОД [Wang J., et al., 2014]. Использование ингибитора гемоксигеназы-1 – цинк протопорфирина IX (ZnPPIX) – нивелировало эффект изопреналина в данных экспериментах. Известна способность СО при синдроме ишемии-реперфузии уменьшать экспрессию ИЛ-1, ICAM-1, индуцибельной NO-синтазы и циклооксигеназы-2 [Liu B., Qian J. M., 2015]. Показано, что СО усиливает выработку белков теплового шока 70 (*hsp-70*), экспрессию ядерного транскрипционного фактора Nrf2, активность СОД [Bolisetty S. et al., 2017]. Важно отметить, что *hsp-70* является лигандом для толл-подобных рецепторов-2 (TLR2), регулирующих активность иммунного ответа и клеточной пролиферации [Asea A., 2008].

Вместе с тем эндогенная продукция СО сопровождается образованием эквимольных концентраций свободного железа (II), что в условиях окислительного стресса является мощным прооксидантным фактором [Niu X. et al., 2014]. Поэтому экзогенные донаторы СО в настоящее время предпочтительнее эндогенных индукторов гемоксигеназы и относятся к классу перспективных терапевтических средств при патологии, сопровождающейся окислительным стрессом [Cebova M. et al., 2016].

Установлено, что введение донаторов СО при гипотермическом хранении трансплантатов печени улучшает их жизнеспособность после пересадки органа у крыс [Lee L.Y. et al., 2011].

Также показано, что донаторы СО при ИРП снижают активность каспаз, провоспалительных цитокинов и экспрессию молекул межклеточной адгезии на эндотелиальных клетках, что может уменьшать степень тяжести реперфузионных повреждений [Wei Y. et al., 2010]. Возможно, механизм данного эффекта при ИРП обусловлен ингибированием TLR2/TLR4-триггерного сигнального каскада, в результате активации которого обычно усиливается экспрессия NF- κ B или клетки подвергаются апоптозу [Huang H. F. et al., 2015].

В целом проведенные ранее исследования показали значительный цитопротективный эффект небольших концентраций экзогенного СО. Однако большинство исследователей сосредоточили свое внимание на внутриклеточных механизмах данного эффекта, не учитывая системных, и в первую очередь высокий аффинитет СО к гемоглобину. Известно, что 80% эндогенного СО транспортируется в крови именно в связи с гемоглобином, что может существенно влиять на кислородсвязывающие свойства, состояние которых определяет условия доставки кислорода тканям и их метаболизм, в том числе при патологии. В настоящее время установлено, что гемоксигеназа-2 является O₂-зависимым ферментом благодаря структурным цистеинам в положении 265 и 282, и может изменять активность хеморецепторов рефлексогенных зон дуги аорты и синокаротидного синуса при понижении pO₂ [Yuan G. et al., 2016]. Данный факт позволяет предположить, что использование донаторов СО может интегрировать клеточные и системные протективные механизмы при дизоксических состояниях. Таким образом, изучение влияния данного газотрансмиттера на окислительные повреждения при синдроме ИРП во взаимосвязи с оценкой состояния механизмов транспорта кислорода кровью является актуальной задачей современной медицинской науки.

Сероводород. Третьей молекулой, отнесенной к классу газотрансмиттеров, является сероводород – безцветный токсический газ с запахом тухлых яиц [Wang R., 2003]. С момента установления эндогенной продукции данного соединения в организме млекопитающих прошел не один десяток лет, пока точка зрения о нем, как о побочном продукте биохимических реакций, трансформировалась до биологически высоко активного соединения, участвующего в механизмах межклеточной сигнализации и мо-

дулирующего активность многих проадаптивных генов [Sluiter E., 1930; Abe K., Kimura H., 1996; Wang R., 2003; Kimura H., 2011; Улащик В. С., 2012]. Установлено, что H_2S синтезируется практически во всех тканях, а наибольшие его концентрации обнаруживаются в мозге, сердце, сосудах, печени и почках. Биологическая активность сероводорода впервые была показана в мозге, где установили его способность усиливать ответы с NMDA-рецепторов и долговременную потенцию в нейронах гиппокампа [Abe K., Kimura H., 1996]. В печени H_2S синтезируется из L-цистеина в основном под влиянием фермента цистатионин-γ-лиазы [Улащик В. С., 2012]. У нокаутированных по данному ферменту мышей наблюдали развитие стойкой гипертензии, что позволило авторам подтвердить ранее дискутировавшуюся вазодилатационную функцию этого газа [Yang G. et al., 2008]. Кроме того, эндотелий может участвовать в регуляции сосудистого тонуса за счет изменения активности собственной цистатионин-γ-лиазы [Al-Magableh M. R., Hart J. L., 2011].

Показано, что сероводород препятствует агрегации тромбоцитов, индуцированной АДФ, коллагеном, адреналином, тромбином и др., причем данный эффект не связан с генерацией цАМФ/цГМФ, продукцией NO или открытием K^+ -зависимых каналов [G. Zagli et al., 2007; Olas B., 2015; Петрова И. В. и др., 2015], однако, вероятно, опосредован антиоксидантной активностью низкомолекулярных тиолов и ингибированием интегриновых рецепторов $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ [Margaritis A. et al., 2011; Gao L. et al., 2015]. Сочетание свойств вазодилататора и антиагреганта способствовало развитию исследований по-отношению к данному газотрансмиттеру как к перспективному соединению для коррекции сердечно-сосудистой патологии [Barr L. A., Calvert J. W., 2014; Patel V. B. et al., 2015; Ueda K. et al., 2015]. Выявлено, что как экзогенные доноры сероводорода, так и стимуляция эндогенной продукции H_2S уменьшают зону инфаркта, степень окислительного стресса, повреждение митохондрий, апоптоз и аутофагию в сердце при ишемии-реперфузии у экспериментальных животных [Shen Y. et al., 2015; Karwi Q. G. et al., 2016]. Установлено, что сероводород является эндогенным стимулятором ангиогенеза, что особо важно при заживлении ран и адаптации к гипоксии [Papapetropoulos A. et al., 2009; Olas B., 2015]. Данный газотрансмиттер способен повышать чувствительность рецепторов

к инсулину и уменьшать сосудистые повреждения почек при сахарном диабете 2-го типа, что указывает на его важную роль в углеводном обмене [Xue R. et al., 2013].

Большой интерес для исследователей представляют свойства сероводорода оказывать цитопротекторный эффект на ткани и органы при патологии, связанной с развитием окислительного стресса. Механизм антиокислительного действия объясняют как прямым взаимодействием газа со свободными радикалами [Li Q., Lancaster J. R. Jr., 2013], так и косвенным эффектом, обусловленным влиянием на активность антиоксидантных ферментов и активность цитопротекторных генов [Xie Z. Z. et al., 2016], снижением адгезии и миграции лейкоцитов в поврежденные ткани [Stein A., Bailey S. M., 2013], модуляцией активности митохондрий и генерации ими АФК [Modis K. et al., 2014], гипометаболизмом [Stein A. et al., 2012] и восстановлением дисульфидных сшивок протеинов, подвергшихся свободнорадикальной атаке [Polhemus D. J., Lefer D. J., 2014], сульфгидрированию и посттрансляционной модификации белков [Zhou, H. et al., 2017]. Установлено, что H_2S легко вступает в реакцию с активными формами как кислорода, так и азота, т.е. оказывает прямой антиоксидантный эффект, сравнимый с эффектами классических антиоксидантов – цистеина и восстановленного глутатиона (GSH) [Li Q., Lancaster J. R. Jr., 2013]. При этом сероводород гасит свободные радикалы как химический восстановитель и может поддерживать NO-синтазную функцию эндотелия при окислительном стрессе [Al-Magableh, M. R. et al., 2014; Xie Z. Z. et al., 2016]. Так, в системе гипоксантин/ KO наблюдали дозозависимое подавление генерации O_2^{*-} при концентрациях H_2S от 10^{-9} до 10^{-4} моль [Al-Magableh, M. R. et al., 2014].

Показано, что сероводород может влиять на функцию митохондрий, причем в малых концентрациях он выступает как донор электронов и улучшает работу комплекса IV (цитохромоксидазы C), а в больших – ингибирует его [Modis K. et al., 2014]. Более того, благодаря сульфгидрированию сигнального белка p66Shc в положении cysteine-59, сероводород модулирует активность дыхательной цепи митохондрий, что препятствует «утечке» электронов и образованию АФК [Xie Z. Z. et al., 2016]. Кроме того, сероводород может увеличивать глутамат-зависимый транспорт цистеина в клетку и повышать уровень GSH, что также является

механизмом антиоксидантной защиты митохондрий и в целом клетки от действия АФК [Kimura Y. et al., 2010]. В работе [Shimada S. et al., 2015] показано увеличение уровня тиоредоксина под влиянием NaHS при ИРП у мышей, что может быть еще одним механизмом антиоксидантного действия сероводорода при патологии, сопровождающейся окислительным стрессом. Повышение уровня GSH и тиоредоксина в клетках под влиянием H₂S может происходить путем активации ядерного транскрипционного фактора Nrf2, который регулирует экспрессию антиоксидантных протеинов и защиту от окислительного стресса [Xie Z. Z. et al., 2016]. Nrf2 обычно находится в цитозоле в виде своего неактивного белкового предшественника Keap1, который высвобождает Nrf2 под влиянием сульфгидратации цистеина-151, вызванной H₂S [Yang G. et al., 2013]. Транскрипционный фактор Nrf2 перемещается в ядро клетки и активирует транскрипцию антиоксидантных генов, таких как гены глутамат-цистеин лигазы, глутатион-редуктазы и тиоредоксина [Jha S. et al., 2008; Xie Z. Z. et al., 2016]. Таким образом, клетка способна повышать свой антиокислительный потенциал и сохранять устойчивость по отношению к окислительному стрессу.

H₂S может взаимодействовать с металлсодержащими ферментами антиоксидантной системы и модулировать их активность. СОД, каталаза и глутатионредуктаза являются основными внутриклеточными антиоксидантными ферментами. Показано, что H₂S взаимодействует с Cu/ZnСОД с высокой скоростью ($>10^7$ моль⁻¹ с⁻¹), повышая активность фермента [Searcy D. G. et al., 1995]. Установлено, что H₂S повышает активность каталазы и СОД при моделировании ишемии-реперфузии культуры эндотелиальных клеток *bEnd.3* сосудов головного мозга [Hu Y. et al., 2015]. Данное исследование показало, что цитопротекторный эффект сероводорода может быть связан с экспрессией сиртуина 6, который подавляет провоспалительные и проапоптотические эффекты ядерного фактора каппа В (NF-κB). Установлено, что сероводород при ишемии мозга снижает провоспалительные эффекты NF-κB путем его ингибирования [Wang Y. et al., 2014]. Однако как редокс-чувствительный транскрипционный фактор, NF-κB способен регулировать активность клеточных антиоксидантных ферментов и может активироваться H₂S с помощью субстанции Р, что приводит к экспрессии генов глутатионпероксида-

зы и каталазы [Tamizhselvi R. et al., 2011; Xie Z. Z. et al., 2016]. Однако последствия взаимодействия H_2S с NF-kB пока остаются противоречивыми. Показано, что H_2S путем активации NF-kB может оказывать провоспалительный эффект при остром панкреатите, сепсисе, ожоговой болезни и воспалительных заболеваниях суставов, что позволило авторам отнести данный газотрансмиттер к медиаторам воспаления [Bhatia M., 2015]. Вместе с тем установлена способность сероводорода повышать активность СОД, каталазы, глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы, глутатион-S-трансферазы, квинонредуктазы путем активации транскрипционного фактора Nrf2 для защиты клеток от окислительного стресса при моделировании гентамицин-индуцированного повреждения почек [Kalayarasan S. et al., 2009]. Более того, показана способность H_2S ингибировать продукцию провоспалительных цитокинов (ИЛ-1, ИЛ-6, α -TNF) в макрофагах при введении ЛПС [Whiteman M. et al., 2010].

Взаимодействие сероводорода с мембранными рецепторами является физиологической основой многих оказываемых им эффектов, в том числе на тонус сосудов, агрегацию тромбоцитов, процессы энергообразования и метаболизма в клетке [Peers C. et al., 2012; Kabil O. et al., 2014]. АТФ-чувствительные калиевые каналы (K_{ATP} -каналы) цитоплазматической и митохондриальных мембран являются важным компонентом клеточной сенсорики и регуляции внутриклеточного метаболизма. Взаимодействие H_2S с K_{ATP} -каналами приводит к гиперполяризации и расслаблению миокарда, что защищает сердце от перегрузок, ишемических и реперфузионных повреждений [Salloum F. N., 2015]. Активация и открытие K_{ATP} -каналов под влиянием сероводорода снижает выделение инсулина β -клетками островков Лангерганса поджелудочной железы [Okamoto M. et al., 2015], оказывает нейропротективный эффект при глутамат-индуцированной эксайтотоксичности [Wang J. F. et al., 2014], обладает антиноцицептивным и противовоспалительным эффектами [Gade A. R. et al., 2013; Fonseca M. D. et al., 2015], вызывает расслабление гладкой мускулатуры сосудов и вазорелаксацию [Yang G. et al., 2008; Sun Y. et al., 2011]. Механизм активации K_{ATP} -каналов, по-видимому, связан с сульфгидрированием цистеина-43 в канал-формирующей субъединице Kir 6.1 [Mustafa A. K. et al., 2011]. В передаче вазодилатирующего эффекта H_2S на гладкую мускулатуру сосудов могут

участвовать и кальций-зависимые калиевые каналы (K_{Ca} -каналы) [Yang G. et al., 2008; Peers C. et al., 2012]. Более того, активация K_{Ca} -каналов сероводородом оказывает определенный эффект на хеморецепторы дуги аорты и каротидных рефлексогенных зон, которые схожи с гипоксическим воздействием [Li Q. et al., 2010]. Важно отметить, что модулятором активности цистатионин-γ-лиазы в хеморецепторах выступает монооксид углерода, образующийся при участии гемоксигеназы-2 [Yuan G. et al., 2015; Fandrey J., 2015].

Показана способность H_2S влиять на клеточную пролиферацию [Wang R., 2003; Улащик В.С., 2012]. Установлено, что при ишемии-реперфузии печени H_2S подавляет апоптоз, повышает активность внутриклеточных антиоксидантов, индуцирует продукцию белков теплового шока (hsp-90), ингибирует провоспалительные факторы, что способствует уменьшению реперфузионных повреждений органа [Jha S. et al., 2008; Shimada S. et al., 2015]. Вместе с тем известно, что, взаимодействуя с гемоглобином, H_2S образует сульфгемоглобин и метгемоглобин [Saeedi A. et al., 2013]. Метгемоглобин не может присоединять кислород и повышает сродство нормального гемоглобина к кислороду [Brown C., Bowling M., 2013]. Более того, взаимодействие сероводорода с гемом и образование сульфгемоглобина можно рассматривать как формирование внутрисосудистого пула данного газотрансмиттера с возможностью его транспортировки на значительные расстояния от мест образования. Однако состояние кислородтранспортной функции крови, как и в случае с CO, остается неизученным. Поскольку газотрансмиттеры образуются в результате метаболизма, представляется важным изучить их роль в механизмах защитного действия других метаболитов, таких как мелатонин и эритропоэтин при ИРП во взаимосвязи с изменением КТФ крови.

Таким образом, комплексное изучение влияния NO, CO и H_2S на параметры кислородтранспортной функции крови, прооксидантно-антиоксидантный баланс и морфофункциональное состояние печени при ишемии-реперфузии позволит выявить новые свойства и системные механизмы, обеспечивающие протективный эффект данных газотрансмиттеров.

Глава 2

ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ДОНАТОРОВ ОКСИДА АЗОТА ДЛЯ КОРРЕКЦИИ ПОСТИШЕМИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ В ПЕЧЕНИ

Известно, что недостаточная продукция оксида азота (NO) и преобладающее влияние эндотелинов нарушают процессы микроциркуляции в печени во время реперфузии [Vollmar B., Menger M. D., 2009]. NO может улучшать процессы микроциркуляции, снижать миграцию, адгезию лейкоцитов и вызываемые ими повреждения органа при реперфузии [Guan L.Y. et al., 2014]. Известно, что NO легко диффундирует в эритроциты и взаимодействует с гемоглобином, образуя нитрозогемоглобин (SNO-Hb), нитриты и нитрозилгемоглобин ($\text{HbFe}^{2+}\text{NO}$), влияя на аллостерическую конформацию гемоглобина и поддерживая пул NO в микроциркуляторном русле [Ozüyaman B. et al., 2008; Reeder B. J., 2010]. Одновременно образование SNO-Hb и $\text{HbFe}^{2+}\text{NO}$ способно существенно изменять кислородсвязывающие свойства самого гемоглобина [Степура Т. Л., Зинчук В. В., 2013; Bonaventura C. et al., 2013], что важно при восстановлении кровотока в ишемизированной печени [Зинчук В. В., Ходосовский М. Н., 2006]. Вместе с тем повышенные уровни NO в сочетании с окислительным стрессом могут привести к образованию пероксинитрита и оказать цитотоксическое действие на гепатоциты при ИРП [Gao L. et al., 2016]. Необходимость поддержания тонкого баланса между повреждающей и протективной сторонами действия NO требует всестороннего изучения влияния донаторов NO на параметры прооксидантно-антиоксидантного баланса и КТФ крови при ИРП. Были изучены эффекты нитроглицерина и нитропрусида натрия на показатели кислородтранспортной функции крови, прооксидантно-антиоксидантного баланса, суммарное содержание нитритов/нитратов плазмы и функциональное состояния печени при ишемии-реперфузии у кроликов [Ходосовский М. Н., Зинчук В. В., 2006; Ходосовский М. Н., Зинчук Н. В., 2007; Ходосовский М. Н., 2008; Ходосовский М. Н., Зинчук В. В., 2012].

Опыты выполнены на взрослых кроликах-самцах весом 3,5-4,5 кг, предварительно выдержанных в стандартных условиях вивария. Анестезия поддерживалась внутривенной инфузией калипсола (1,5 мг/кг/мин). Ишемию печени вызывали наложением

сосудистого зажима на *a. hepatica propria* в течение 30 минут, реперфузионный период длился 120 минут. Вводили катетеры: один – в *v. hepatica* для взятия печёночной венозной крови, другой – в правое предсердие для получения смешанной венозной крови. Забор образцов крови для оценки параметров КТФ крови, продуктов ПОЛ и факторов антиоксидантной системы осуществляли до и после ишемии, а также в конце реперфузионного периода. Ткань печени для оценки показателей прооксидантно-антиоксидантного состояния брали в конце реперфузии. В качестве контроля использовали образцы печени, взятые у животных до ишемии ($n=6$). Степень повреждения печени оценивали по активности АлАТ и АсАТ в плазме крови по Reitman S. et al. (1957).

Животных разделили на 3 экспериментальные группы: в 1-й группе моделировали ИРП ($n=8$); во 2-й – на фоне ИРП проводили внутривенную инфузию нитроглицерина в дозе 1,5 мкг/кг [Taura P. et al., 1996], которую начинали за 5 минут до начала реперфузионного периода ($n=8$); в 3-й группе опыты выполняли как во 2-й, но вместо нитроглицерина использовали нитропруссид натрия (Sigma, США) в дозе 2,5 мг/кг [Paul V., Ekambaram P., 2005], инфузию которого начинали за 5 минут до начала реперфузионного периода. Определение суммарного количества нитритов и нитратов (NO_x) в плазме крови проводили с помощью реактива Грисса [Schulz K. et al., 1999]. Для восстановления нитратов в нитриты использовали металлический кадмий.

На микрогазоанализаторе «Synthesis-15» (Instrumentation Laboratory Company) оценивали показатели КТФ крови: $p50_{\text{станд}}$, $p50_{\text{реал}}$, pO_2 , pCO_2 , pH, истинный бикарбонат плазмы (HCO_3^-), общий CO_2 плазмы (TCO_2), действительный избыток оснований (ABE), стандартный избыток оснований (SBE), стандартный бикарбонат (SBC). Сродство гемоглобина к кислороду (СГК) определяли по показателю $p50$ (pO_2 крови, соответствующее 50% насыщению ее кислородом). $p50_{\text{станд}}$ измеряли при стандартных условиях (pH = 7,4; pCO_2 = 40 мм рт. ст. и $T = 37^\circ\text{C}$), а $p50_{\text{реальн}}$ – рассчитывали для реальных значений этих факторов. На основании полученных значений $p50$ по уравнению Хилла рассчитывали положение кривой диссоциации оксигемоглобина (КДО).

Изучали следующие показатели прооксидантно-антиоксидантного состояния: диеновые конъюгаты (ДК), основания Шиффа (ОШ), α -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 [Гаврилов В. Б. и др., 1988]. Содержание ОШ определяли по интенсивности флюоресценции хлороформного экстракта при длинах волн возбуждения и эмиссии 344 нм и 440 нм, соответственно [Fletcher B.L. et al., 1973]. Концентрацию α -токоферола и ретинола изучали методом флюориметрического определения по интенсивности флюоресценции гексанового экстракта [Черняускене Р.Ч. и др., 1984]. В качестве стандарта использовали α -токоферол и ретинол фирмы «Sigma». Каталазная активность в биологическом материале оценивалась спектрофотометрическим методом, основанным на способности перекиси водорода образовывать с солями молибдена стойко окрашенный комплекс [Королюк, М. А. и др., 1988].

Статистическую обработку полученных данных проводили в зависимости от нормальности распределения выборок, которую оценивали по тесту Холмогорова-Смирнова. При нормальном распределении использованием t-критерий Стьюдента для зависимых и независимых выборок внутри и между группами соответственно. При ненормальном распределении выборки использовали методы непараметрической статистики. Наличие значимых отклонений показателя внутри группы оценивали по показателю Вилкоксона, между группами – по критерию Краскелла-Уоллиса. Достоверными считали различия при $p < 0,05$.

2.1 Влияние нитроглицерина на параметры кислородтранспортной функции крови и прооксидантно-антиоксидантного баланса при ишемии-реперфузии печени у кроликов

В таблицах 1 и 2 показаны изменения параметров кислородтранспортной функции крови печеночной и смешанной венозной крови у экспериментальных животных. В 1-й группе кроликов ишемия печени приводила к снижению pO_2 печеночной венозной крови на 20.3% ($p=0.0096$) и росту показателя pCO_2 на 11,4% ($p=0,0358$) по отношению к исходному уровню.

Таблица 1.– Влияние нитроглицерина на показатели кислородтранспортной функции печеночной венозной крови у экспериментальных животных ($M \pm m$)

Показатель	Ишемия-реперфузия (1-я группа)			Ишемия-реперфузия + Нитроглицерин (2-я группа)		
	Исходная	30 мин. ишемии	120 мин. реперфузии	Исходная	30 мин. ишемии	120 мин. реперфузии
n	8	8	8	8	8	8
p50 _{реал.} мм рт. ст.	32.03±1.24	36.52±1.34*	41.61±1.23*	31.42±0.92	32.96±1.08	35.1±1.22*#
p50 _{станд.} мм рт. ст.	28.30±0.70	30.01±1.06	30.43±0.77	29.39±0.93	29.16±1.12	29.50±1.15
Hb, г/л	113.70±7.77	109.50±8.02*	106.00±4.30	120.10±5.39	120.90±4.97	109.75±3.98*
pO ₂ . мм рт. ст.	37.88±2.63	30.20±1.56*	32.43±3.14*	39.05±3.19	36.85±2.59#	33.04±2.89
pH. ед.	7.337±0.020	7.272±0.051	7.166±0.030*	7.379±0.014	7.320±0.015*	7.249±0.025*
pCO ₂ . мм рт. ст.	42.65±2.16	47.53±1.95*	54.04±6.17	47.04±1.15	48.59±2.09	54.50±4.40
HCO ₃ ⁻ . ммоль/л	23.15±1.80	21.7±1.91	18.74±0.87	28.06±1.37	25.74±1.32*	23.71±1.42*#
TCO ₂ . ммоль/л	24.60±1.80	22.99±1.93	20.26±1.01	29.48±1.39	27.23±1.36*	25.39±1.5*#
ABE. ммоль/л	- 2.34±1.93	- 4.06±2.40	- 9.13±1.08*	2.81±1.44	-0.31±1.35*	-3.31±1.42*#
SBE. ммоль/л	- 2.50±2.07	- 4.35±2.63	- 8.99±1.16*	2.88±1.45	-4.3±1.82*	-3.44±1.34*#
SBC. ммоль/л	22.24±1.52	20.28±1.89	16.81±0.79	26.23±1.11	23.69±1.07*	21.21±1.09*

Примечание – * – достоверное отличие от исходного уровня в соответствующей группе ($p < 0.05$); # – достоверное отличие от животных 1-й группы в соответствующий период времени ($p < 0.05$)

Таблица 2. – Показатели кислородтранспортной функции смешанной венозной крови у экспериментальных животных ($M \pm m$)

Показатель	Ишемия-реперфузия (1-я группа)			Ишемия-реперфузия + Нитроглицерин (2-я группа)		
	Исходная	30 мин. ишемии	120 мин. реперфузии	Исходная	30 мин. ишемии	120 мин. реперфузии
n	8	8	8	8	8	8
p50 _{реал.} мм рт. ст.	31.88±1.17	36.71±1.0*	41.24±1.48*	30.45±0.77	32.81±1.31*#	36.34±1.28*#
p50 _{станд.} мм рт. ст.	27.78±0.65	30.63±1.52	30.35±0.82*	27.76±0.65	28.96±1.24	29.70±1.15*
Hb, г/л	114.39±7.84	108.46±4.67	106.51±4.95	117.57±4.49	119.75±4.29#	107.25±4.26
pO ₂ , мм рт. ст.	41.53±3.5	39.5±4.94	32.96±2.94	45.07±2.77	44.34±2.66	35.48±3.14
pH, ед.	7.322±0.035	7.280±0.026*	7.173±0.038*	7.356±0.014	7.316±0.012*	7.235±0.012*
pCO ₂ , мм рт. ст.	44.68±1.27	47.75±2.76	58.44±5.97*	45.99±1.44	47.98±1.99	56.20±3.15*
HCO ₃ ⁻ , ммоль/л	23.4±1.71	22.36±1.84	20.73±1.32*	26.04±0.93	24.71±1.41	24.64±1.91
TCO ₂ , ммоль/л	24.38±1.41	23.41±1.72	20.21±3.06	27.46±0.94	26.18±1.46	25.11±1.24*
ABE, ммоль/л	- 2.2±1.87	- 4.25±1.82	-7.34±1.65*	0.66±1.06	-1.29±1.41	-4.01±1.32*
SBE, ммоль/л	- 2.21±1.96	- 4.34±1.95	-7.04±1.57*	0.56±1.02	-1.41±1.41	-4.14±1.25*
SBC, ммоль/л	22.05±1.58	20.41±1.48	17.84±1.34*	24.76±0.82	23.18±1.1*	20.10±1.6*

Примечание – * – достоверное отличие от исходного уровня в соответствующей группе ($p < 0.05$); # – достоверное отличие от животных 1-й группы в соответствующий период времени ($p < 0.05$)

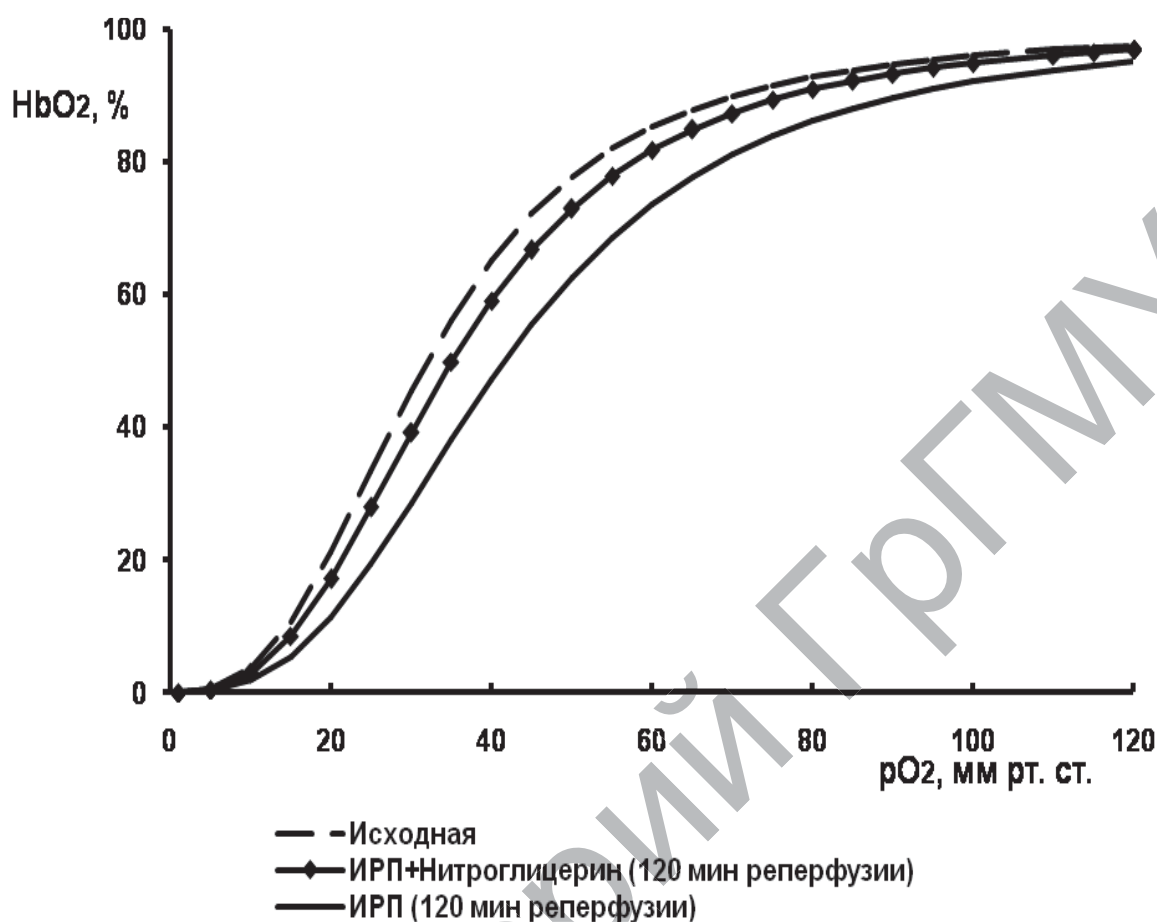


Рисунок 1. – Изменение положения кривой диссоциации оксигемоглобина в конце реперфузионного периода у кроликов в печеночной венозной крови под влиянием нитроглицерина, рассчитанное по показателю $p50_{\text{реал}}$ ($p=0,027$)

Во 2-й группе в конце ишемии не наблюдалось изменений показателей pO_2 и pCO_2 печеночной венозной крови по отношению к исходному уровню в группе, однако установлено существенное улучшение показателя pO_2 по сравнению с животными 1-й группы (см. табл. 1). Одновременно в 1-й группе наблюдали увеличение показателя $p50_{\text{реал}}$ в печеночной крови на 14,0% ($p=0,0098$), в смешанной венозной крови – на 15,2% ($p=0,0076$), указывая на сдвиг КДО вправо. У кроликов, получавших нитроглицерин (2-я группа), значимых изменений $p50_{\text{реал}}$ после 30 минут ишемии в печеночной венозной крови не выявлено, а в смешанной венозной крови данный показатель вырос на 7,7% ($p=0,0198$) по отношению к исходному уровню. Следует отметить, что в обеих группах после ишемии в смешанной венозной

крови наблюдалось снижение показателя рН, указывая на развитие ацидоза (табл. 2).

После восстановления артериального кровотока в печени у кроликов 1-й группы сдвиг КДО вправо усиливался и на 120-й минуте реперфузии в печеночной и смешанной венозной крови показатели $p50_{\text{реал}}$ повысились по отношению к исходным уровням на 29,9% ($p=0,0004$) и 29,4% ($p=0,0006$), соответственно. У кроликов 2-й группы в конце реперфузии также наблюдали увеличение показателя $p50_{\text{реал}}$ в печеночной и смешанной венозной крови по отношению к исходным уровням на 11,7% ($p=0,0159$) и 19,3% ($p=0,0006$), соответственно. Установлено, что значения данных показателей в печеночной и смешанной венозной крови у кроликов 2-й группы снизились по отношению к таковым в 1-й группе на 15,6% ($p=0,027$) и 11,9% ($p=0,018$), соответственно, указывая на сдвиг КДО влево под влиянием нитроглицерина (см. рис. 1). На 120-й минуте реперфузии в обеих экспериментальных группах наблюдалось снижение показателей рН, АВЕ, HCO_3^- , TCO_2 , SBE, and SBC (см. табл. 1 и 2). Однако в конце реперфузии у животных 2-й группы показатели АВЕ, HCO_3^- , TCO_2 и SBE в печеночной венозной крови были лучше, чем у кроликов 1-й группы, что свидетельствовало о значительном улучшении кислотно-основного состояния.

При этом на фоне инфузии нитроглицерина (2-я группа) содержание NOx в плазме печеночной и смешанной венозной крови на 30-й минуте ишемии возросло по отношению к исходному на 70,4% ($p=0,0001$) и 45,4% ($p=0,0011$), соответственно. В конце реперфузионного периода в данных образцах венозной крови установлена лишь тенденция к повышению по отношению к исходному уровню на 18,3% ($p=0,1961$) и 23,0% ($p=0,1125$), соответственно (см. рис. 2). У животных 1-й группы при моделировании ИРП суммарный уровень нитритов/нитратов не изменялся.

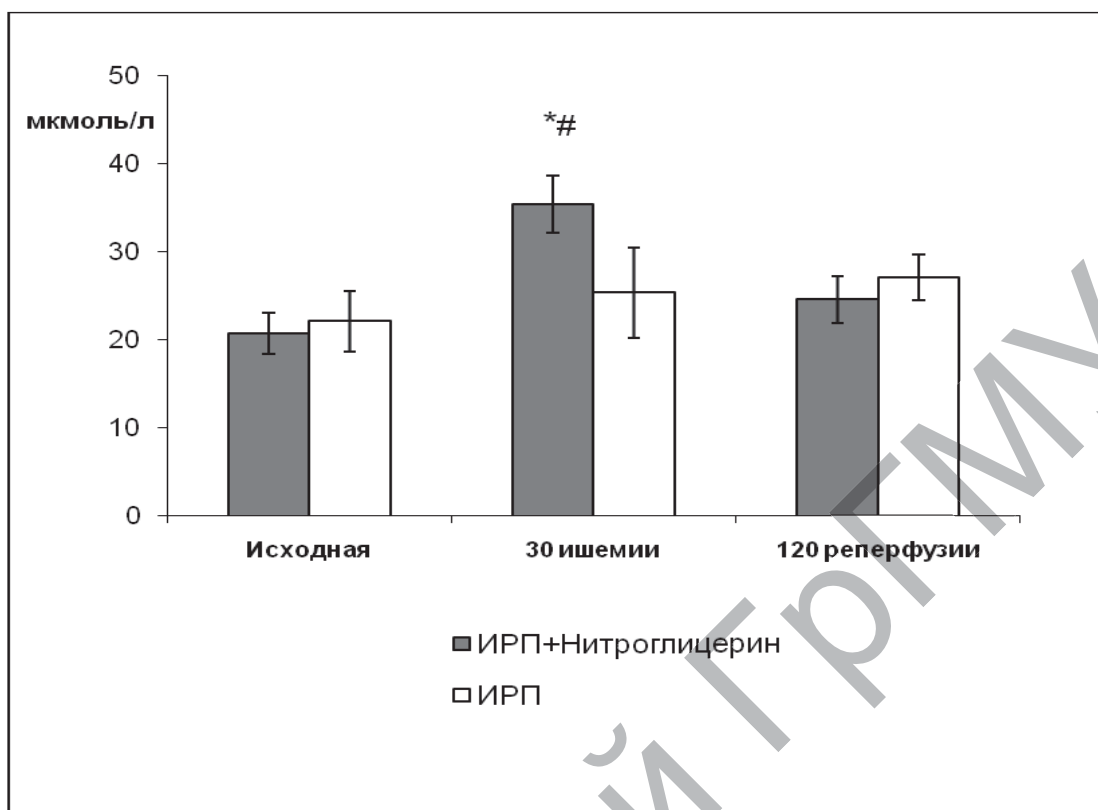


Рисунок 2. – Влияние нитроглицерина на содержание нитритов/нитратов (NOx) плазме печеночной венозной крови у кроликов при ишемии-реперфузии печени, где * – достоверное отличие от исходного уровня в соответствующей группе ($p < 0,05$); # – достоверное различие между группами в соответствующий период времени ($p < 0,05$)

Динамика изменений показателей прооксидантно-антиоксидантного состояния в крови у кроликов обеих групп приведена в таблицах 3 и 4. У животных 1-й группы содержание МДА в плазме печёночной и смешанной венозной крови в конце реперфузии по отношению к исходному увеличилось на 51,1% ($p < 0,01$) и 44,7% ($p < 0,01$), соответственно. Уровень ОШ в эритроцитах печёночной и смешанной венозной крови в конце реперфузионного периода вырос по отношению к исходному на 58,6% ($p < 0,001$) и 63,8% ($p < 0,001$), соответственно. Установлено, что при введении нитроглицерина в условиях ишемии-реперфузии печени у кроликов (2-я группа) в крови наблюдается менее выраженное увеличение содержания продуктов ПОЛ (МДА, ОШ) (табл. 3 и 4). Так, в плазме печеночной и смешанной венозной крови уровень МДА не превышал исходный в конце реперфузионного периода. Содержание ОШ в эритроцитах печеночной и

смешанной венозной крови на 120-й минуте реперфузии было ниже, чем у кроликов 1-й группы, на 35,3% ($p<0,05$) и 34,8% ($p<0,05$), соответственно.

При моделировании ИРП в 1-й группе животных факторы антиоксидантной защиты истощались (см. табл. 3 и 4). Так, содержание α -токоферола на 30-й минуте ишемии в плазме печёночной венозной крови составило от исходного уровня 94,95% ($p<0,05$). На 120-й минуте реперфузии содержание α -токоферола в плазме смешанной венозной крови уменьшилось до 87,6% ($p<0,001$) от исходного уровня. Активность каталазы эритроцитов у кроликов 1-й группы на протяжении ишемии-реперфузии печени повышалась. В конце реперфузии активность этого фермента превышала исходную в эритроцитах печёночной венозной крови на 79,9% ($p<0,001$). У кроликов, которым проводили инфузию нитроглицерина, активность каталазы эритроцитов смешанной венозной крови в конце реперфузии понижалась на 31,5% ($p<0,05$) по отношению к кроликам 1-й группы. Одновременно содержание α -токоферола и ретинола в эритроцитах обоих образцов крови не превышало исходных значений (см. табл. 3 и 4).

Таблица 3. – Влияние нитроглицерина на показатели прооксидантно-антиоксидантного состояния печеночной венозной крови у экспериментальных животных ($M \pm m$)

Показатель	Исходная	30 мин. ишемии	120 мин. реперфузии	Исходная	30 мин. ишемии	120 мин. реперфузии
n	8	8	8	8	8	8
ДК _{пл} , ΔD_{233} /мл	0,51±0,04	0,7±0,08*	0,84±0,08*	0,51±0,04	0,59±0,04	0,81±0,09*
ДК _{эр} , ΔD_{233} /мл	5,25±0,46	7,74±0,77*	8,76±1,21*	5,46±0,55	7,43±0,86	7,26±0,75*
МДА _{пл} , мкмоль/мл	2,05±0,22	2,34±0,28	3,10±0,38*	1,96±0,15	2,14±0,15	2,44±0,19#
МДА _{эр} , мкмоль/мл	6,96±0,84	7,82±0,60	10,08±0,59*	6,91±0,79	8,30±0,89*	8,88±0,75*
ОШ _{пл} , ЕД/мл	9,27±0,43	12,38±1,01*	14,78±0,97*	8,89±0,28	10,71±0,49*	9,38±0,23*#
ОШ _{эр} , ЕД/мл	40,75±1,93	52,94±2,46*	64,62±2,85*	40,83±0,82	42,07±2,04#	41,82±1,11#
токоферол _{пл} , мкмоль/л	20,38±0,28	19,35±0,27*	17,86±0,39*	20,45±0,43	19,19±0,35*	19,33±0,38*
токоферол _{эр} , мкмоль/л	118,47±0,82	115,4±1,06*	112,0±0,83*	118,53±0,48	117,12±1,13	117,46±0,89#
ретинол _{пл} , мкмоль/л	2,10±0,05	1,96±0,04*	1,73±0,06*	2,03±0,06	2,00±0,05	1,96±0,04#
ретинол _{эр} , мкмоль/л	8,59±0,38	7,54±0,28*	6,20±0,24*	8,72±0,31	8,29±0,18	8,53±0,30#
Каталаза _{эр} , ммоль H ₂ O ₂ /с*гНв	2,01±0,18	2,72±0,21	3,62±0,19*	2,03±0,17	2,43±0,25	2,92±0,27*
АлАТ, мкмоль/мин*л	4,56±0,27	5,09±0,22*	8,69±0,59*	4,0±0,35	4,32±0,33	4,81±0,27*#
АсАТ, мкмоль/мин*л	3,50±0,26	3,92±0,21*	6,14±0,39*	3,84±0,4	4,07±0,29	4,47±0,32#

Примечание – * – достоверное отличие от исходного уровня в соответствующей группе ($p < 0.05$); # – достоверное отличие от животных 1-й группы в соответствующий период времени ($p < 0.05$)

Таблица 4. – Влияние нитроглицерина на показатели прооксидантно-антиоксидантного состояния смешанной венозной крови у экспериментальных животных ($M \pm m$)

Показатель	Ишемия-реперфузия (1-я группа)			Ишемия-реперфузия + нитроглицерин (2-я группа)		
	Исходная	30 мин. ишемии	120 мин. реперфузии	Исходная	30 мин. ишемии	120 мин. реперфузии
n	8	8	8	8	8	8
ДК _{пл} , $\Delta D_{233}/\text{мл}$	0,64 $\pm$ 0,06	1,20 $\pm$ 0,14*	1,18 $\pm$ 0,17*	0,63 $\pm$ 0,05	1,08 $\pm$ 0,18*	1,03 $\pm$ 0,20
ДК _{эр} , $\Delta D_{233}/\text{мл}$	5,54 $\pm$ 0,65	7,76 $\pm$ 0,81*	8,45 $\pm$ 0,88*	5,19 $\pm$ 0,59	7,04 $\pm$ 0,77*	7,67 $\pm$ 1,12*
МДА _{пл} , мкмоль/мл	2,40 $\pm$ 0,20	2,62 $\pm$ 0,23	3,47 $\pm$ 0,18*	2,26 $\pm$ 0,15	2,50 $\pm$ 0,21	2,90 $\pm$ 0,29
МДА _{эр} , мкмоль/мл	6,58 $\pm$ 0,75	7,87 $\pm$ 0,98	9,89 $\pm$ 0,70*	6,91 $\pm$ 0,62	7,63 $\pm$ 0,80	9,02 $\pm$ 0,93
ОШ _{пл} , ЕД/мл	9,02 $\pm$ 0,28	11,20 $\pm$ 0,54*	14,33 $\pm$ 0,78*	9,19 $\pm$ 0,37	12,06 $\pm$ 0,67*	9,95 $\pm$ 0,32*#
ОШ _{эр} , ЕД/мл	40,19 $\pm$ 1,06	50,30 $\pm$ 2,87*	65,81 $\pm$ 2,93*	40,89 $\pm$ 0,69	43,32 $\pm$ 2,03	42,88 $\pm$ 1,67#
токоферол _{пл} , мкмоль/л	20,06 $\pm$ 0,38	19,28 $\pm$ 0,36*	17,23 $\pm$ 0,44*	20,12 $\pm$ 0,4	18,91 $\pm$ 0,29*	19,11 $\pm$ 0,3*#
токоферол _{эр} , мкМ/л	118,35 $\pm$ 0,77	115,23 $\pm$ 0,97*	111,3 $\pm$ 1,07*	118,40 $\pm$ 0,86	118,1 $\pm$ 0,92#	117,52 $\pm$ 0,78#
ретинол _{пл} , мкмоль/л	2,08 $\pm$ 0,04	1,97 $\pm$ 0,04*	1,77 $\pm$ 0,03*	2,03 $\pm$ 0,06	2,00 $\pm$ 0,05	1,96 $\pm$ 0,04#
ретинол _{эр} , мкмоль/л	8,79 $\pm$ 0,37	7,78 $\pm$ 0,18*	6,60 $\pm$ 0,19*	8,83 $\pm$ 0,43	8,66 $\pm$ 0,34#	8,63 $\pm$ 0,46#
Каталаза _{эр} , ммоль H ₂ O ₂ /с*гНб	2,13 $\pm$ 0,21	2,74 $\pm$ 0,28	3,81 $\pm$ 0,31*	2,01 $\pm$ 0,15	2,53 $\pm$ 0,20	2,61 $\pm$ 0,32*#
АлАТ, мкмоль/мин*л	4,58 $\pm$ 0,25	4,83 $\pm$ 0,16	8,57 $\pm$ 0,70*	4,11 $\pm$ 0,34	4,25 $\pm$ 0,37	4,97 $\pm$ 0,47#
АсАТ мкмоль/мин*л	3,77 $\pm$ 0,47	4,65 $\pm$ 0,32*	7,16 $\pm$ 0,61*	3,78 $\pm$ 0,52	4,39 $\pm$ 0,30	5,22 $\pm$ 0,51#

Примечание – * – достоверное отличие от исходного уровня в соответствующей группе ($p < 0.05$); # – достоверное отличие от животных 1-й группы в соответствующий период времени ($p < 0.05$)

Те же показатели ПОЛ и антиоксидантной системы были исследованы в гомогенате печени. В 1-й группе животных на 120-й минуте реперфузии по отношению к контролю установлено увеличение ДК с $5,33 \pm 0,43$ до $11,73 \pm 1,02$ $\Delta E_{233}/г$ ($p < 0,001$), МДА – с $13,44 \pm 0,92$ до $27,04 \pm 2,68$ мкмоль/г ($p < 0,01$), ОШ – со $116,5 \pm 9,73$ до $363,4 \pm 52,6$ Ед/г ($p < 0,01$) и уменьшение α -токоферола с $191,3 \pm 6,8$ до $127,6 \pm 3,7$ нмоль/г ($p < 0,001$), ретинола – со $117,38 \pm 6,33$ до $75,73 \pm 4,27$ нмоль/г ($p < 0,001$), а также повышение активности каталазы в гомогенате печени с $2,78 \pm 0,23$ до $7,61 \pm 0,54$ ммоль/сек*г белка ($p < 0,001$). Во 2-й группе на 120-й минуте реперфузии исследуемые показатели прооксидантно-антиоксидантного состояния по отношению к контролю существенно не изменялись. Установлено, что у кроликов 1-й группы моделирование ишемии-реперфузии печени сопровождалось ростом активности АлАТ и АсАТ крови в конце реперфузионного периода, (табл. 3 и 4). В плазме смешанной венозной крови активность АлАТ и АсАТ на 120-й минуте реперфузии повысилась на 87,1% ($p < 0,001$) и 90,1% ($p < 0,001$), соответственно. Повышение активности данных ферментов в плазме крови указывает на нарушение целостности мембран гепатоцитов при моделировании синдрома ИРП. У животных 2-й группы активность АлАТ и АсАТ в плазме смешанной венозной крови на протяжении ИРП существенно не изменялась.

Те же показатели ПОЛ и антиоксидантной системы были исследованы в гомогенате печени. В 1-й группе животных на 120-й минуте реперфузии по отношению к контролю установлено увеличение ДК с $5,33 \pm 0,43$ до $11,73 \pm 1,02$ $\Delta E_{233}/г$ ($p < 0,001$), МДА – с $13,44 \pm 0,92$ до $27,04 \pm 2,68$ мкмоль/г ($p < 0,01$), ОШ – со $116,5 \pm 9,73$ до $363,4 \pm 52,6$ Ед/г ($p < 0,01$) и уменьшение уровня α -токоферола с $191,3 \pm 6,8$ до $127,6 \pm 3,7$ нмоль/г ($p < 0,001$), ретинола – со $117,38 \pm 6,33$ до $75,73 \pm 4,27$ нмоль/г ($p < 0,001$), а также повышение активности каталазы в гомогенате печени с $2,78 \pm 0,23$ до $7,61 \pm 0,54$ ммоль/сек*г белка ($p < 0,001$). Во 2-й группе на 120-й минуте реперфузии исследуемые показатели прооксидантно-антиоксидантного состояния по отношению к контролю существенно не изменялись. Установлено, что у кроликов 1-й группы моделирование ишемии-реперфузии печени сопровождалось ростом активности АлАТ и АсАТ крови в конце реперфузионного

периода, (табл. 3 и 4). В плазме смешанной венозной крови активность АлАТ и АсАТ на 120-й минуте реперфузии повысилась на 87,1% ($p < 0,001$) и 90,1% ($p < 0,001$), соответственно. Повышение активности данных ферментов в плазме крови указывает на нарушение целостности мембран гепатоцитов при моделировании синдрома ИРП. У животных 2-й группы активность АлАТ и АсАТ в плазме смешанной венозной крови на протяжении ИРП существенно не изменялась.

Результаты исследования показали, что ишемия печени сопровождалась ухудшением показателей КТФ крови. Восстановление артериального кровотока не приводило к улучшению кислотно-щелочного состояния, более того, на протяжении 120 минут реперфузии наблюдалось развитие смешанного ацидоза, с выраженным метаболическим компонентом. Данные изменения в конце реперфузии были менее выраженными во 2-й группе животных. Смещение КДО вправо в конце реперфузии могло способствовать значительному повышению активности процессов ПОЛ (судя по накоплению в крови и тканях печени ДК, МДА и ОШ) и истощение факторов антиоксидантной защиты, что указывает на развитие окислительного стресса у кроликов 1-й группы. Усиление свободнорадикальных процессов, очевидно, способствовало повреждению мембран гепатоцитов и ухудшению функционального состояния печени (судя по повышению активности АлАТ и АсАТ в крови) в конце реперфузии. Вместе с тем у животных 2-й группы наблюдалась стабилизация отдельных показателей ПОЛ и факторов антиоксидантной системы, особенно в смешанной венозной крови и в тканях печени. Результаты исследования свидетельствуют, что в условиях инфузии нитроглицерина функциональное состояние печени после ишемии улучшается. Эти изменения наблюдались на фоне повышения СГК крови и могли быть опосредованы повышением уровня SNO-Hb с последующей нормализацией баланса между вазоконстрикторами и вазодилататорами на уровне микроциркуляторного русла печени в постишемическом периоде. Таким образом, нитроглицерин улучшает параметры КТФ крови, прооксидантно-антиоксидантное и функциональное состояние печени при ишемии-реперфузии у кроликов.

2.2. Влияние нитропруссид натрия на параметры кислородтранспортной функции крови и прооксидантно-антиоксидантного баланса при ишемии-реперфузии печени у кроликов

Показано, что ингибирование синтеза индуцибельной NO-синтазы может способствовать уменьшению степени окислительного стресса в печени при ишемии-реперфузии [Yang SL, 2007]. Вместе с тем донатор NO, нитропруssid натрия, может оказывать определенный протективный эффект при ИРП, который связывают с улучшением печеночной микроциркуляции [Kuroki I, 2004]. Известно, что молекула NO, являясь по своей природе свободнорадикальной, может быть источником мощного окислителя – пероксинитрита, который способен усугублять окислительные повреждения клеток [Hines I. N., Grisham M. B., 2011]. Известные данные не объясняют механизм защитного эффекта нитропруссид натрия при ИРП, так как усиление микроциркуляции и поступления O_2 в постишемическом периоде может усиливать окислительные повреждения.

В таблицах 5 и 6 показаны изменения параметров КТФ крови печеночной и смешанной венозной крови у экспериментальных животных под влиянием нитропруссид натрия. В обоих образцах крови наблюдалось снижение показателей pH, ABE, HCO_3^- , TCO_2 , SBE, and SBC на протяжении ИРП, которое было наиболее значительным в конце реперфузии. Данные изменения указывают на глубокие метаболические нарушения как в печени, так и во всем организме опытных животных при ИРП. Смещение кислотно-основного равновесия в сторону ацидоза обычно способствует возникновению эффекта Бора и сдвигу КДО вправо вследствие снижения СГК крови. Однако установлено, что инфузия нитропруссид натрия способствовала сохранению $p50_{\text{реал}}$ без существенных изменений по отношению к исходному уровню после ишемии в печеночной венозной крови (табл. 5), тогда как у кроликов 1-й группы закономерно наблюдали сдвиг КДО вправо (рис. 3). Более того, при использовании нитропруссид натрия у кроликов показатели $p50_{\text{станд}}$ печеночной и смешанной венозной крови проявляли стабильную тенденцию к снижению, которая на 120-й минуте реперфузии была наиболее выражена по сравнению с соответствующим периодом в 1-й группе (табл. 5 и 6).

Таблица 5. – Влияние нитропруссид натрия на показатели кислородтранспортной функции печеночной венозной крови у экспериментальных животных ($M \pm m$)

Показатель	Ишемия-реперфузия (1-я группа)			Ишемия-реперфузия + нитропруссид натрия (3-я группа)		
	Исходная	30 мин. ишемии	120 мин. реперфузии	Исходная	30 мин. ишемии	120 мин. реперфузии
n	8	8	8	8	8	8
p50 _{реал.} мм рт. ст.	32.03±1.24	36.52±1.34*	41.61±1.23*	29.88±1.04	31.48±2.03	37.86±2.36*
p50 _{станд.} мм рт. ст.	28.30±0.70	30.01±1.06	30.43±0.77	27.15±0.76	26.22±1.82#	23.89±1.72#
Hb, г/л	113.70±7.77	109.50±8.02*	106.00±4.30	116.0±7.07	107.25±6.28*	98.88±6.36*
pO ₂ мм рт. ст.	37.88±2.63	30.20±1.56*	32.43±3.14*	37.75±1.71	27.13±3.45*	27.63±3.77*
pH, ед.	7.337±0.020	7.272±0.051	7.166±0.030*	7.380±0.028	7.293±0.016*	7.051±0.062*
pCO ₂ мм рт. ст.	42.65±2.16	47.53±1.95*	54.04±6.17	40.75±2.09	45.34±3.04	58.3±7.28*
HCO ₃ ⁻ ммоль/л	23.15±1.80	21.7±1.91	18.74±0.87	24.58±0.87	22.11±1.16	16.0±1.15*
TCO ₂ ммоль/л	24.60±1.80	22.99±1.93	20.26±1.01	25.8±0.86	23.51±1.23	17.98±1.1*
ABE ммоль/л	-2.34±1.93	-4.06±2.40	-9.13±1.08*	0.13±1.13	-3.68±1.06*	-14.06±1.94*#
SBE ммоль/л	-2.50±2.07	-4.35±2.63	-8.99±1.16*	-0.69±1.18	-4.56±1.19*	-15.25±1.97*#
SBC ммоль/л	22.24±1.52	20.28±1.89	16.81±0.79	24.31±0.93	20.86±0.81*	12.64±1.59*

Примечание: * – достоверное отличие от исходного уровня в соответствующей группе ($p < 0.05$); # – достоверное отличие от животных 1-й группы в соответствующий период времени ($p < 0.05$)

Таблица 6. – Влияние нитропруссид натрия на показатели кислородтранспортной функции смешанной венозной крови у экспериментальных животных ($M \pm m$)

Показатель	Ишемия-реперфузия (1-я группа)			Ишемия-реперфузия + нитропруссид натрия (3-я группа)		
	Исходная	30 мин. ишемии	120 мин. реперфузии	Исходная	30 мин. ишемии	120 мин. реперфузии
n	8	8	8	8	8	8
p50 _{реал.} мм рт. ст.	31.88±1.17	36.71±1.0*	41.24±1.48*	30.36±0.76	32.50±0.63*#	39.10±1.44*
p50 _{станд.} мм рт. ст.	27.78±0.65	30.63±1.52	30.35±0.82*	26.28±0.28	26.83±0.56	24.86±0.97#
Hb, г/л	114.39±7.84	108.46±4.67	106.51±4.95	112.5±7.84	105.25±7.12*	98.75±9.04*
pO ₂ . мм рт. ст.	41.53±3.5	39.5±4.94	32.96±2.94	38.13±4.86	35.38±4.45	33.75±5.74
pH. ед.	7.322±0.035	7.280±0.026*	7.173±0.038*	7.337±0.015	7.290±0.012*	7.026±0.057*
pCO ₂ . мм рт. ст.	44.68±1.27	47.75±2.76	58.44±5.97*	44.06±0.9	43.10±2.48	59.46±7.14
HCO ₃ ⁻ . ммоль/л	23.4±1.71	22.36±1.84	20.73±1.32*	23.99±0.91	21.01±1.34*	15.41±1.33*#
TCO ₂ . ммоль/л	24.38±1.41	23.41±1.72	20.21±3.06	25.33±0.92	22.36±1.41*	17.24±1.37*#
ABE. ммоль/л	-2.2±1.87	-4.25±1.82	-7.34±1.65*	-1.29±1.06	-4.65±1.28*	-14.30±1.91*#
SBE. ммоль/л	-2.21±1.96	-4.34±1.95	-7.04±1.57*	-2.04±1.13	-5.66±1.47*	-15.69±1.99*#
SBC. ммоль/л	22.05±1.58	20.41±1.48	17.84±1.34*	23.15±0.75	20.38±0.92*	12.66±1.55*#

Примечание – * – достоверное отличие от исходного уровня в соответствующей группе ($p < 0.05$); # – достоверное отличие от животных 1-й группы в соответствующий период времени ($p < 0.05$)

Полученные данные указывают на участие NO в кооперативных трансформациях гемоглобина, которые внесли более значимый вклад в формирование аффинитета гемоглобина к кислороду, развивающийся при ИРП ацидоз. Данный факт частично подтверждается ростом содержания NOx в обоих образцах венозной крови на протяжении ИРП (рис. 4), что было особо выражено после ишемии, когда в печеночной венозной крови отсутствовал сдвиг КДО вправо.

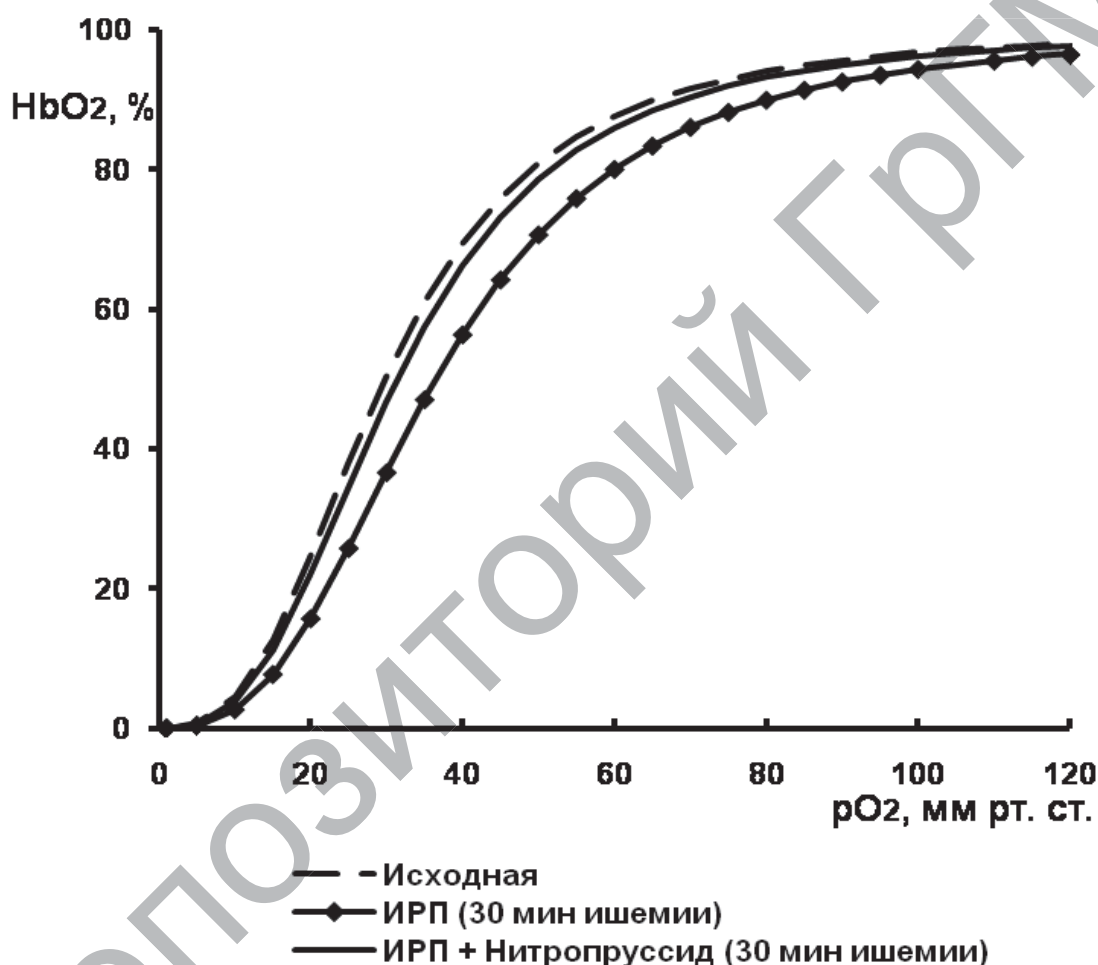


Рисунок 3. – Смещение кривой диссоциации оксигемоглобина влево под влиянием нитропруссид натрия в печеночной венозной крови на 30-й минуте ишемии, рассчитанное по показателю $p50_{\text{реал}}$

Показано, что NO может существенно влиять на кислород-связывающие свойства крови [Stepuro T. L. et al., 2006]. Под влиянием оксида азота могут образовываться разные формы гемоглобина, разнонаправленно изменяющие СГК. Так, высокие концентрации метгемоглобина и SNO-Hb смещают КДО влево, тогда

как повышенные концентрации $\text{HbFe}^{2+}\text{NO}$ сдвигают данную кривую вправо. Возможно, инфузия нитропруссиды натрия при ишемии-реперфузии вела к образованию преимущественно нитрозоформы гемоглобина, что приводило к увеличению СГК крови у кроликов 3-й группы. Согласно исследованию структуры SNO-Hb, NO, соединяясь с $\beta 93$ -цистеином, ингибирует образование солевых мостиков между $\beta 146$ -гистидином и $\beta 94$ -аспарагином, что неминуемо приводит к повышению СГК [Clementi ME, 2003].

Известно, что изменения СГК крови могут влиять на тяжесть реперфузионных повреждений [Зинчук В. В., Ходосовский М. Н., 2006]. Нами исследовано влияние нитропруссиды натрия на состояние прооксидантно-антиоксидантного баланса при ИРП у кроликов.

Данные о влиянии нитропруссиды натрия на показатели прооксидантно-антиоксидантного баланса представлены в таблицах 7 и 8. При инфузии нитропруссиды натрия в конце ишемии в печеночной венозной крови уровень ДК повысился по отношению к исходному на 115,2%, а в смешанной венозной крови – на 99,1% ($p < 0,05$). Содержание ОШ в конце ишемии по отношению к доишемическому уровню в плазме печеночной и смешанной венозной крови возросло на 17,8 и 20,7%, соответственно ($p < 0,05$). В реперфузионном периоде у кроликов 3-й группы в крови содержание ДК и ОШ достоверно не отличалось от доишемического уровня данных показателей ПОЛ. В отличие от животных 1-й группы, у кроликов, которым проводили инфузию нитропруссиды, повышение активности каталазы наблюдалось только на 30-й минуте ишемии в эритроцитах печеночной венозной крови, где уровень данного фермента был выше исходного на 39,5% ($p < 0,05$), тогда как в конце реперфузии активность данного фермента не отличалась от исходной. Содержание α -токоферола в плазме печеночной и смешанной венозной крови в конце реперфузионного периода составляло 89,1 и 88,8%, соответственно, что было выше концентрации данного антиоксиданта по отношению к соответствующему периоду в 1-й группе (табл. 7 и 8).

Те же показатели ПОЛ и антиоксидантной системы были исследованы в гомогенате печени (табл. 9). Выявлено, что в 1-й группе животных на 120-й минуте реперфузии по сравнению с контролем уровень ДК, МДА и ОШ повышался на 120,2%

($p < 0,001$), 101,2% ($p < 0,01$) и 212,0% ($p < 0,01$), соответственно. Одновременно наблюдали уменьшение α -токоферола на 33,3% ($p < 0,001$), ретинола – на 35,5% ($p < 0,001$), а также повышение активности каталазы в гомогенате печени на 173,8% ($p < 0,001$). В 3-й группе на 120-й минуте реперфузии исследуемые показатели прооксидантно-антиоксидантного состояния по отношению к контролю существенно не изменялись (табл. 9). Так, содержание ДК, МДА и ОШ по отношению к животным 2-й группы у кроликов, получавших нитропруссид натрия, снижалось на 48,0% ($p < 0,01$), 27,2% ($p < 0,05$) и 165,7% ($p < 0,01$), соответственно. Напротив, концентрация α -токоферола и ретинола у кроликов 3-й группы по отношению ко 2-й группе повышалась на 39,6% ($p < 0,001$) и 41,0% ($p < 0,001$), соответственно. Активность каталазы в 3-й группе также не превышала таковую в контроле (см. табл. 9).

Улучшение параметров прооксидантно-антиоксидантного баланса при ИРП у кроликов, получавших нитропруссид натрия, сопровождалось снижением активности АЛАТ и АсАТ крови по отношению к животным 1-й группы (см. табл. 7 и 8). Так, в плазме смешанной венозной крови на 120-й минуте реперфузии активность АЛАТ и АсАТ понижалась по отношению к кроликам 1-й группы на 42,0% ($p < 0,05$) и 26,5% ($p < 0,05$), соответственно.

Таблица 7. – Влияние нитропрусида натрия на показатели прооксидантно-антиоксидантного состояния печеночной венозной крови у экспериментальных животных ($M \pm m$)

Показатель	Ишемия-реперфузия (1-я группа)			Ишемия-реперфузия + нитропруssid натрия (3-я группа)		
	Исходная	30 мин. ишемии	120 мин. реперфузии	Исходная	30 мин. ишемии	120 мин. реперфузии
N	8	8	8	8	8	8
ДК _{пл} , $\Delta D_{233}/\text{мл}$	$0,51 \pm 0,04$	$0,7 \pm 0,08^*$	$0,84 \pm 0,08^*$	$0,51 \pm 0,04$	$1,1 \pm 0,07^*$	$0,64 \pm 0,06\#$
ДК _{эр} , $\Delta D_{233}/\text{мл}$	$5,25 \pm 0,46$	$7,74 \pm 0,77^*$	$8,76 \pm 1,21^*$	$4,97 \pm 0,6$	$7,11 \pm 0,75^*$	$6,44 \pm 0,72$
МДА _{пл} , мкмоль/мл	$2,05 \pm 0,22$	$2,34 \pm 0,28$	$3,10 \pm 0,38^*$	$2,08 \pm 0,14$	$2,96 \pm 0,13^*$	$2,30 \pm 0,14$
МДА _{эр} , мкмоль/мл	$6,96 \pm 0,84$	$7,82 \pm 0,60$	$10,08 \pm 0,59^*$	$6,96 \pm 0,64$	$11,04 \pm 0,76^*$	$8,45 \pm 0,53^*$
ОШ _{пл} , ЕД/мл	$9,27 \pm 0,43$	$12,38 \pm 1,01^*$	$14,78 \pm 0,97^*$	$8,51 \pm 0,21$	$10,03 \pm 0,44^*\#$	$9,01 \pm 0,21\#$
ОШ _{эр} , ЕД/мл	$40,75 \pm 1,93$	$52,94 \pm 2,46^*$	$64,62 \pm 2,85^*$	$42,09 \pm 1,68$	$47,51 \pm 1,3^*$	$42,99 \pm 1,87\#$
токоферол _{пл} , мкмоль/л	$20,38 \pm 0,28$	$19,35 \pm 0,27^*$	$17,86 \pm 0,39^*$	$20,89 \pm 0,36$	$20,1 \pm 0,36$	$18,61 \pm 0,35^*$
токоферол _{эр} , мкмоль/л	$118,47 \pm 0,82$	$115,4 \pm 1,06^*$	$112,0 \pm 0,83^*$	$116,93 \pm 1,36$	$115,55 \pm 1,48$	$115,06 \pm 1,28$
ретинол _{пл} , мкмоль/л	$2,10 \pm 0,05$	$1,96 \pm 0,04^*$	$1,73 \pm 0,06^*$	$2,13 \pm 0,06$	$2,08 \pm 0,04$	$2,04 \pm 0,03\#$
ретинол _{эр} , мкмоль/л	$8,59 \pm 0,38$	$7,54 \pm 0,28^*$	$6,20 \pm 0,24^*$	$8,98 \pm 0,29$	$8,95 \pm 0,26$	$8,93 \pm 0,27\#$
Каталаза _{эр} , ммоль $\text{H}_2\text{O}_2/\text{с} \cdot \text{г Нб}$	$2,01 \pm 0,18$	$2,72 \pm 0,21$	$3,62 \pm 0,19^*$	$2,44 \pm 0,12$	$3,41 \pm 0,12^*$	$2,44 \pm 0,1\#$
АлАТ мкмоль/мин*л	$4,56 \pm 0,27$	$5,09 \pm 0,22^*$	$8,69 \pm 0,59^*$	$4,14 \pm 0,26$	$5,6 \pm 0,35^*$	$4,86 \pm 0,17^*\#$
АсАТ кмоль/мин*л	$3,50 \pm 0,26$	$3,92 \pm 0,21^*$	$6,14 \pm 0,39^*$	$4,26 \pm 0,19$	$5,71 \pm 0,22^*\#$	$5,03 \pm 0,21^*$

Примечание – * – достоверное отличие от исходного уровня в соответствующей группе ($p < 0.05$); # – достоверное отличие от животных 1-й группы в соответствующий период времени ($p < 0.05$)

Таблица 8. – Влияние нитропруссид натрия на показатели прооксидантно-антиоксидантного состояния смешанной венозной крови у экспериментальных животных ($M \pm m$)

Показатель	Ишемия-реперфузия (1-я группа)			Ишемия-реперфузия + нитропруссид натрия (2-я группа)		
	Исходная	30 мин. ишемии	120 мин. реперфузии	Исходная	30 мин. ишемии	120 мин. реперфузии
n	8	8	8	8	8	8
ДК _{пл} , ΔD_{233} /мл	0,64 $\pm$ 0,06	1,20 $\pm$ 0,14*	1,18 $\pm$ 0,17*	0,55 $\pm$ 0,05	1,09 $\pm$ 0,12*	0,71 $\pm$ 0,09#
ДК _{эр} , ΔD_{233} /мл	5,54 $\pm$ 0,65	7,76 $\pm$ 0,81*	8,45 $\pm$ 0,88*	4,97 $\pm$ 0,6	7,11 $\pm$ 0,75*	6,44 $\pm$ 0,72
МДА _{пл} , мкмоль/мл	2,40 $\pm$ 0,20	2,62 $\pm$ 0,23	3,47 $\pm$ 0,18*	2,28 $\pm$ 0,15	3,34 $\pm$ 0,30*	2,48 $\pm$ 0,19
МДА _{эр} , мкмоль/мл	6,58 $\pm$ 0,75	7,87 $\pm$ 0,98	9,89 $\pm$ 0,70*	6,82 $\pm$ 0,51	9,55 $\pm$ 0,61*	7,58 $\pm$ 0,36
ОШ _{пл} , ЕД/мл	9,02 $\pm$ 0,28	11,20 $\pm$ 0,54*	14,33 $\pm$ 0,78*	8,58 $\pm$ 0,33	10,35 $\pm$ 0,21*	9,09 $\pm$ 0,29*#
ОШ _{эр} , ЕД/мл	40,19 $\pm$ 1,06	50,30 $\pm$ 2,87*	65,81 $\pm$ 2,93*	40,57 $\pm$ 1,37	45,91 $\pm$ 1,19*	41,78 $\pm$ 2,18#
токоферол _{пл} , мкмоль/л	20,06 $\pm$ 0,38	19,28 $\pm$ 0,36*	17,23 $\pm$ 0,44*	20,79 $\pm$ 0,44	20,14 $\pm$ 0,42*#	18,47 $\pm$ 0,41*#
токоферол _{эр} , мкмоль/л	118,35 $\pm$ 0,77	115,23 $\pm$ 0,97*	111,3 $\pm$ 1,07*	117,04 $\pm$ 1,21	115,55 $\pm$ 1,26	115,79 $\pm$ 0,88#
ретинол _{пл} , мкмоль/л	2,08 $\pm$ 0,04	1,97 $\pm$ 0,04*	1,77 $\pm$ 0,03*	2,13 $\pm$ 0,05	2,10 $\pm$ 0,06	2,07 $\pm$ 0,04#
ретинол _{эр} , мкмоль/л	8,79 $\pm$ 0,37	7,78 $\pm$ 0,18*	6,60 $\pm$ 0,19*	8,92 $\pm$ 0,26	8,80 $\pm$ 0,28#	8,58 $\pm$ 0,33#
Каталаза _{эр} , ммоль H ₂ O ₂ /с*гНв	2,13 $\pm$ 0,21	2,74 $\pm$ 0,28	3,81 $\pm$ 0,31*	2,48 $\pm$ 0,16	3,19 $\pm$ 0,23*	2,79 $\pm$ 0,27#
АлАТ мкмоль/мин*л	4,58 $\pm$ 0,25	4,83 $\pm$ 0,16	8,57 $\pm$ 0,70*	3,96 $\pm$ 0,35	5,74 $\pm$ 0,36*#	4,97 $\pm$ 0,37*#
АсАТ мкмоль/мин*л	3,77 $\pm$ 0,47	4,65 $\pm$ 0,32*	7,16 $\pm$ 0,61*	4,46 $\pm$ 0,28	6,09 $\pm$ 0,37*#	5,26 $\pm$ 0,26*#

Примечание – * – достоверное отличие от исходного уровня в соответствующей группе ($p < 0.05$); # – достоверное отличие от животных 1-й группы в соответствующий период времени ($p < 0.05$)

Таблица 9. – Влияние инфузии нитропруссид натрия на показатели про- оксидантно-антиоксидантного состояния печени при ишемии-реперфузии у кроликов ($M \pm m$)

Показатель	Контроль	ИРП	ИРП + нитро- пруссид натрия
n	8	8	8
ДК, $\Delta D_{233}/Г$	$5,33 \pm 0,43$	$11,73 \pm 1,02 *$	$6,1 \pm 0,43 \#$
МДА, мкмоль/Г	$13,44 \pm 0,92$	$27,04 \pm 2,68 *$	$19,71 \pm 2,48 \#$
ОШ, ЕД/мл	$116,48 \pm 9,73$	$363,38 \pm 52,6 *$	$136,74 \pm 20,1 \#$
α -токоферол, нмоль/Г	$191,31 \pm 6,81$	$127,6 \pm 3,74 *$	$178,1 \pm 6,33 \#$
ретинол, нмоль/Г	$117,38 \pm 6,33$	$75,73 \pm 4,27 *$	$106,8 \pm 4,52 \#$
Каталаза, ммоль H_2O_2 /Г белка/с	$2,78 \pm 0,23$	$7,61 \pm 0,54 *$	$3,12 \pm 0,1 \#$

Примечание – * – достоверное отличие от исходного уровня в соот- ветствующей группе ($p < 0.05$); # – достоверное отличие от животных 1-й группы в соответствующий период времени ($p < 0.05$)

На фоне инфузии нитропруссид натрия содержание NOx в плазме печеночной и смешанной венозной крови на 30-й минуте ишемии возросло по отношению к исходному на 106,1 ($p < 0,01$) и 101,0% ($p < 0,01$), соответственно. В конце реперфузионного пери- ода уровень NOx в данных образцах исследуемой крови превос- ходил доишемический на 50,8% ($p < 0,05$) и 54,7% ($p < 0,01$), соот- ветственно. Кроме того, повышение NOx наблюдалось по отно- шению к животным 1-й группы, у которых на протяжении ИРП суммарный уровень нитритов/нитратов не изменялся (рис. 4).

Результаты исследования указывают на значительное по- вышение активности процессов ПОЛ (судя по накоплению в кро- ви и тканях печени ДК, МДА и ОШ) и истощение факторов анти- оксидантной защиты, что может способствовать сдвигу проокси- дантно-антиоксидантного состояния у кроликов при ИРП в сто- рону радикалообразования. Вместе с тем у животных, получав- ших нитропруссид натрия, наблюдалось снижение исследуемых показателей ПОЛ и улучшение факторов антиоксидантной защиты, особенно в тканях печени в реперфузионном периоде. Результаты исследования свидетельствуют, что в условиях инфузии нитро- пруссида натрия активность процессов ПОЛ в печени после ише-

мии уменьшается, а уровень большинства исследованных антиоксидантов отклоняется от исходного в меньшей степени. Эти изменения наблюдались на фоне повышения NOx и могли быть опосредованы повышением уровня NO и нормализацией баланса между вазоконстрикторами и вазодилататорами в печени в постишемическом периоде, что улучшало процессы микроциркуляции в органе [Vollmar B., Menger M. D., 2009].

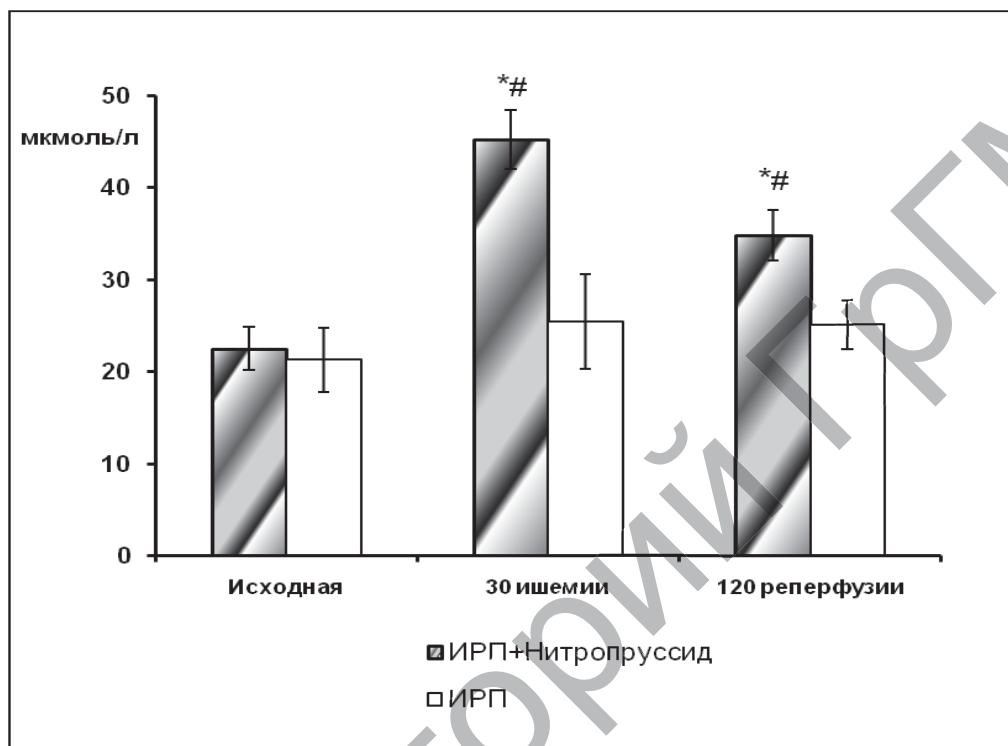


Рисунок 4. – Влияние нитропруссид натрия на содержание нитритов/нитратов (NOx) в плазме смешанной венозной крови у кроликов при ишемии-реперфузии печени, где * – достоверное отличие от исходного уровня в соответствующей группе ($p < 0.05$); # – достоверное различие между группами в соответствующий период времени ($p < 0.05$)

Инфузия нитропруссид натрия могла также способствовать улучшению функционального состояния других органов, в первую очередь легких, повреждение которых часто сопутствует развитию реперфузионного синдрома печени [Taura, P. et al., 1996]. Учитывая кислородзависимый характер патогенеза реперфузионных повреждений печени, участие NO в поддержании прооксидантно-антиоксидантного равновесия может реализовываться через разные механизмы: NO способен быть фактором антиоксидантной защиты, выступая в роли ловушки радикалов [Szabó C. et al., 2007; Phillips L. et al., 2009] либо модифицируя

кислородсвязывающие свойства крови [Stepuro T. L., Zinchuk V. V., 2006]. Диоксид азота (NO_2) может индуцировать на ненасыщенных жирных кислотах образование парамагнитных центров, которые способны активировать защитно-приспособительные реакции в ответ на действие окислительного стресса [9]. Надо отметить, что взаимодействие NO с супероксидным анион-радикалом и образование пероксинитрита, часто рассматриваемое как механизм цитотоксического действия NO на ткани, может играть роль устранения супероксидных анион-радикалов без дальнейшего токсического повреждения тканей. *In vivo* взаимодействие пероксинитрита с CO_2 приводит к образованию нитрозопероксикарбоната, который распадается на NO_3^- и CO_2 без образования активных форм кислорода [Реутов В. П. и др., 2006].

Таким образом, инфузия нитропруссиды натрия кроликам при ИРП способствует увеличению СГК крови, снижению активности свободнорадикальных процессов ПОЛ и препятствует истощению факторов антиоксидантной системы в крови и тканях органа, что благоприятно влияет на функциональное состояние печени у экспериментальных животных.

Глава 3

ВЛИЯНИЕ ДОНАТОРОВ МОНООКСИДА УГЛЕРОДА И СЕРОВОДОРОДА НА КИСЛОРОДЗАВИСИМЫЕ ПРОЦЕССЫ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ СИНДРОМА ИШЕМИИ-РЕПЕРФУЗИИ ПЕЧЕНИ У КРЫС

СО – эндогенно синтезируемый газ в процессе распада молекулы гема на железо и биливердин под влиянием фермента гемоксигеназы-1. Установлено, что СО может способствовать коррекции реперфузионных повреждений сердца, легких, почек, мозга [Moody B. F., Calvert J. W., 2011]. Механизм протективного действия СО связывают со способностью данного газотрансмитера снижать активность каспаз, провоспалительных цитокинов и экспрессию молекул межклеточной адгезии на эндотелиальных клетках, что может уменьшать степень тяжести реперфузионных повреждений [Wei Y. et al., 2010]. Открытие вазоактивных свойств СО [Wang R., 2003] позволяет предположить способность данного соединения участвовать в механизмах коррекции реперфузионных повреждений печени. Кроме того, при взаимодействии с гемоглобином СО образует в 300 раз более аффинное соединение, чем кислород, что может модулировать кислород-связывающие свойства крови [Crocker G. H. et al., 2013]. Так как влияние СО на параметры КТФ крови при реперфузии ранее не изучалось, нами исследовано влияние донатора монооксида углерода на параметры кислородтранспортной функции крови, прооксидантно-антиоксидантного состояния при моделировании синдрома ИРП у крыс [Ходосовский М. Н. и др., 2015; Ходосовский М. Н., 2016; Ходосовский М. Н., Зинчук В. В., 2016; Ходосовский М. Н. и др., 2017].

Эксперименты выполнены на белых крысах-самцах массой 300-350 г, выдержанных в стандартных условиях вивария. Под комбинированным наркозом (тиопентал натрия – 30 мг/кг, в/б, калипсол – 100 мг/кг, в/м) вводили полиэтиленовый катетер в правое предсердие для получения смешанной венозной крови. Ишемию печени вызывали наложением сосудистого зажима на *a. hepatica propria* и *v. portae* (маневр Прингла) [Dixon E. et al., 2005] в течение 30 минут, реперфузионный период длился 120 минут. В конце эксперимента осуществляли забор смешанной венозной крови и тканей печени для оценки параметров КТФ, про-

оксидантно-антиоксидантного и морфофункционального состояния печени. Оценку тяжести реперфузионных повреждений печени осуществляли по активности трансаминаз – АлАТ и АсАТ – в плазме крови, используя кинетический метод с помощью стандартного набора реактивов фирмы Cormay (Польша). Активность АлАТ и АсАТ выражали в МЕ/л. Оперативные вмешательства осуществляли в условиях адекватной анальгезии в соответствии с нормами, принятыми этической комиссией по гуманному обращению с животными Гродненского государственного медицинского университета (приказ ректора УО ГрГМУ от 27.12.2006 г. № 125).

Животных разделили на 4 экспериментальные группы: 1-я группа ($n=10$) – контрольная, во 2-й группе ($n=10$) моделировали ИРП, в 3-й группе ($n=10$) на фоне ИРП вводили донатор монооксида углерода – CORM-3 – в дозе 50 мкмоль/кг [Bagul A. et al., 2008] за 5 минут до начала реперфузионного периода, в 4-й группе ($n=10$) на фоне ИРП проводили инфузию донатора сероводорода – гидросульфида натрия (NaHS, Sigma, 14 мкмоль/кг) [Tan G. et al., 2011] – как в 3-й группе. Содержание сероводорода в плазме крови определяли спектрофотометрическим методом, который основан на реакции между сульфид-анионом и кислым раствором N,N-диметил-p-фенилендиамином в присутствии хлорида железа (III) [Norris E. J. et al., 2011]. Определение суммарного количества нитратов/нитритов (NO_x) в плазме крови проводили спектрофотометрическим методом с помощью реактива Грисса (см. гл. 2).

На микрогазоанализаторе «Synthesis-15» (Instrumentation Laboratory Company) оценивали показатели КТФ крови: $p50_{\text{станд}}$, $p50_{\text{реал}}$, $p\text{O}_2$, $p\text{CO}_2$, гемоглобин (Hb), карбоксигемоглобин (HbCO), метгемоглобин (MetHb), pH, бикарбонат плазмы (HCO_3^-), общий CO_2 плазмы (TCO_2), действительный избыток оснований (ABE) и др. Сродство гемоглобина к кислороду (СГК) определяли по показателю $p50$. $p50_{\text{станд}}$ измеряли при стандартных условиях ($\text{pH}=7,4$; $p\text{CO}_2=40$ мм рт. ст. и $T=37^\circ\text{C}$), а $p50_{\text{реал}}$ – рассчитывали для реальных значений этих факторов. На основании полученных значений $p50$ по уравнению Хилла определяли положение КДО. Показатели прооксидантно-антиоксидантного состояния: ДК, ОШ, α -токоферол, ретинол и активность каталазы – изучали методами, как описано выше (см. гл. 2). Дополнительно изучали со-

держание восстановленного глутатиона (GSH) и малонового диальдегида (МДА). Уровень МДА оценивали по взаимодействию с 2'-тиобарбитуровой кислотой, которая при нагревании в кислой среде приводит к образованию триметинового комплекса розового цвета [Камышников В. С., 2002]. Содержание GSH определяли в биологическом материале по модифицированному методу J. Sedlak, R. Lindsay (1968). В основе метода лежит реакция взаимодействия SH-групп глутатиона с 5,5'-дитиобис (2-нитробензойной кислотой), способной поглощать свет при длине волны 412 нм.

Оценивали общую морфологическую картину печени. Для этого кусочки печени контрольных и опытных животных фиксировали в жидкости Карнуа (для заключения в парафин). Парафиновые срезы толщиной 7-10 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. Проведена оценка изменения морфометрических показателей печени при моделировании синдрома ишемии-реперфузии у контрольных и опытных крыс. Изучение гистологических препаратов, их микрофотографирование, морфометрия и цитофотометрия проводились с помощью микроскопа Axioskop 2 plus (Zeiss, Германия), цифровой видеокамеры (Leica DFC 320, Германия), а также программы компьютерного анализа изображения Image Warp (Bit Flow, США).

Статистическую обработку полученных данных проводили как указано в гл. 2.

3.1 Изменение параметров кислородтранспортной функции крови, прооксидантно-антиоксидантного состояния и морфофункционального состояния печени при ишемии-реперфузии в условиях введения донатора монооксида углерода

Проводили химический синтез соединения, высвобождающего монооксид углерода (CORM-3), по методике Clark J.E. et al (2003). Для этого 0,129 г трикарбонилдихлорорутениум (II) димера ($[\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}_2]_2$) (Sigma Aldrich) и 0,039 г глицина помещали в круглодонную колбу. После добавления метанола (75,0 мл) и этоксида натрия (0,034 г) реакцию контролировали при постоянном помешивании в течение 18 ч при комнатной температуре. Затем растворитель удаляли под давлением, желтый осадок повторно растворяли в тетрагидрофуране, фильтровали и добавляли в

избытке бензин. Полученный желтый раствор выпаривался до формирования слабожелтого порошка (0,142 г, 96% CORM-3).

Установлено, что использование донатора СО при ИРП у крыс способствует уменьшению реперфузионных повреждений печени, судя по активности АлАТ и АсАТ в конце реперфузионного периода (рис. 6). Так, на 120-й минуте реперфузии у крыс 2-й группы в плазме крови по отношению к контролю активность АлАТ и АсАТ увеличивалась в 9,4 ($p < 0,05$) и 9,1 ($p < 0,05$) раза, соответственно. У животных, получавших CORM-3 (3-я группа), в конце реперфузионного периода в смешанной венозной крови по отношению к крысам 2-й группы активность АлАТ и АсАТ понижалась на 45,3% ($p < 0,05$) и 45,2% ($p < 0,05$), соответственно (см. рис. 6). Данные изменения указывают на улучшение функционального состояния печени при использовании CORM-3 в условиях ишемии-реперфузии печени.

Изменение параметров прооксидантно-антиоксидантного состояния (ДК, МДА, ОШ, GSH, α -токоферол, ретинол, активность каталазы) в крови и тканях печени экспериментальных животных представлены в таблице 10. Установлено, что в конце реперфузионного периода у экспериментальных животных 2-й группы наблюдалось повышение содержания продуктов перекисного окисления липидов в крови и тканях печени. Так, у опытных крыс в плазме крови уровень ДК в конце реперфузии увеличился в 4,7 раза ($p < 0,001$), ОШ – в 9,2 раза ($p < 0,001$) по отношению к контрольным (табл. 10). В эритроцитах содержание ДК и ОШ возросло в 2,9 ($p < 0,001$) и 1,7 ($p < 0,001$) раза, соответственно. Одновременно в тканях печени экспериментальных животных количество ДК и ОШ повысилось в 5,5 ($p < 0,001$) и 4,1 ($p < 0,001$) раза, соответственно.

Установлено, что у крыс в конце реперфузионного периода наблюдалось снижение факторов антиоксидантной защиты (табл. 10). Так, уровень α -токоферола в плазме и эритроцитах крови к концу реперфузионного периода понизился по отношению к контролю на 17,0% ($p < 0,001$) и 33,0% ($p < 0,001$), ретинола – на 25,9% ($p < 0,001$) и 20,8% ($p < 0,001$), соответственно. Схожая динамика изменения данных параметров наблюдалась в тканях печени (табл. 10).

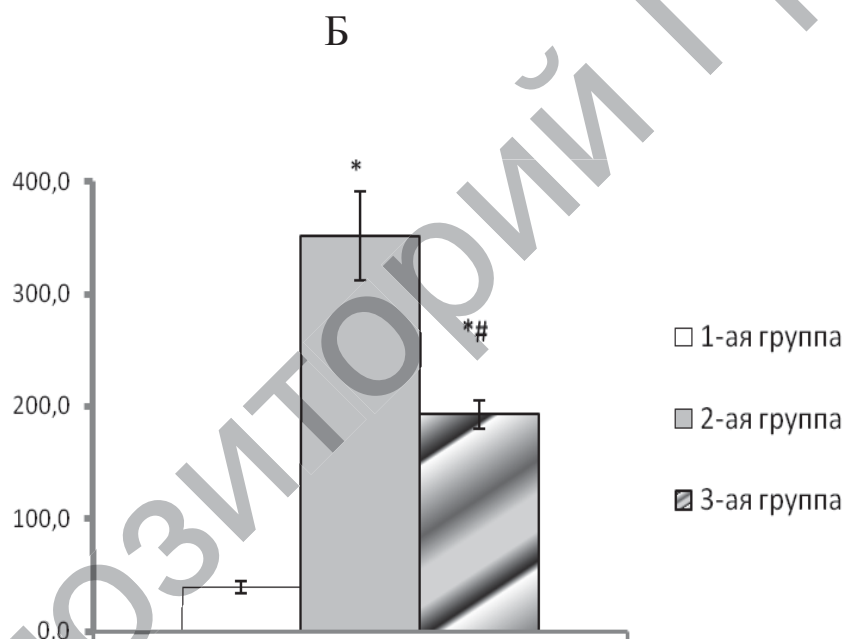
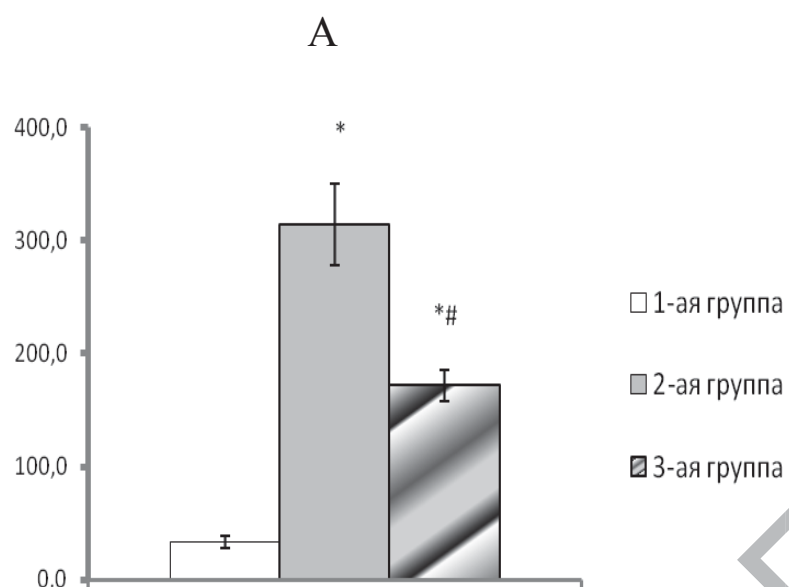


Рисунок 6. – Активность аланинаминотрансферазы (А) и аспартатаминотрансферазы (Б) в плазме крови (Ед/л) у крыс при ишемии-реперфузии печени в условиях инфузии CORM-3 (3-я группа), где * – достоверное отличие по-отношению к 1-й (контроль) группе ($p < 0,05$), # – достоверное различие по отношению ко 2-й (ИРП) группе

Таблица 10. – Изменение параметров прооксидантно-антиоксидантного состояния у крыс при ишемии-реперфузии печени в условиях введения CORM-3 ($M \pm m$)

Показатель	Контроль	ИРП	ИРП + CORM-3
n	10	10	10
ДК _{пл} , $\Delta E_{233}/\text{мл}$	$0,85 \pm 0,08$	$4,01 \pm 0,38^*$	$1,8 \pm 0,13^{* \#}$
ДК _{эр} , $\Delta E_{233}/\text{мл}$	$5,68 \pm 0,48$	$16,73 \pm 0,92^*$	$8,81 \pm 0,51^{* \#}$
ДК _{печ} , $\Delta E_{233}/\text{г}$	$8,52 \pm 0,74$	$46,62 \pm 2,65^*$	$16,22 \pm 0,75^{* \#}$
МДА _{пл} , мкмоль/л	$2,93 \pm 0,91$	$6,45 \pm 2,99$	$1,74 \pm 0,11$
МДА _{эр} , мкмоль/л	$7,69 \pm 0,96$	$6,07 \pm 0,79$	$7,57 \pm 0,77$
МДА _{печ} , мкмоль/г	$24,94 \pm 1,59$	$39,42 \pm 2,1^*$	$28,56 \pm 1,27^{\#}$
ОШ _{пл} , ЕД/мл	$20,05 \pm 1,22$	$184,5 \pm 10,12^*$	$75,83 \pm 5,95^{* \#}$
ОШ _{эр} , ЕД/мл	$39,03 \pm 2,52$	$65,14 \pm 4,05^*$	$49,16 \pm 1,73^{* \#}$
ОШ _{печ} , ЕД/г	$115,06 \pm 5,29$	$469,9 \pm 33,55^*$	$187,7 \pm 8,27^{* \#}$
Токоферол _{пл} , мкМ/л	$20,96 \pm 0,38$	$17,4 \pm 0,34^*$	$18,98 \pm 0,32^{* \#}$
Токоферол _{эр} , мкМ/л	$96,29 \pm 3,74$	$64,48 \pm 2,97^*$	$83,16 \pm 2,48^{* \#}$
Токоферол _{печ} , мкМ/г	$177,33 \pm 4,23$	$141,22 \pm 3,79^*$	$173,03 \pm 3,19^{\#}$
Ретинол _{пл} , мкмоль/л	$2,32 \pm 0,07$	$1,72 \pm 0,03^*$	$2,06 \pm 0,03^{* \#}$
Ретинол _{эр} , мкмоль/л	$7,16 \pm 0,3$	$5,67 \pm 0,19^*$	$6,32 \pm 0,17^{* \#}$
Ретинол _{печ} , мкмоль/г	$20,37 \pm 0,52$	$16,7 \pm 0,4^*$	$19,64 \pm 0,33^{\#}$
GSH _{эр} , мкмоль/гHb	$50,67 \pm 1,84$	$50,98 \pm 1,97$	$51,72 \pm 3,28$
GSH _{печ} , ммоль/г	$4,0 \pm 0,4$	$1,27 \pm 0,26^*$	$2,71 \pm 0,89$
Каталаза _{эр} , $\text{мм/л}^* \text{г}^* \text{с}$	$1,0 \pm 0,13$	$0,38 \pm 0,06^*$	$0,88 \pm 0,09^{\#}$
Каталаза _{печ} , $\text{мм/л}^* \text{г}^* \text{с}$	$3,6 \pm 0,18$	$1,47 \pm 0,16^*$	$3,21 \pm 0,31^{\#}$

Примечание – пл – плазма, эр – эритроциты, печ – гомогенат печени,
 * – достоверное различие по отношению к контрольной группе ($p < 0,05$),
 # – достоверное различие по отношению ко 2-й группе ($p < 0,05$)

Установлено также, что активность каталазы эритроцитов крови животных 2-й группы падала в конце реперфузии по отно-

шению к контролю на 62,0% ($p < 0,001$), а в тканях печени – на 59,1% ($p < 0,001$). Данные изменения указывают на сдвиг прооксидантно-антиоксидантного состояния в сторону свободнорадикальных процессов у экспериментальных животных 2-й группы в крови и тканях печени при ишемии-реперфузии. Снижение активности каталазы указывает на срыв адаптивных возможностей антиоксидантной системы в условиях активации свободнорадикальных процессов и развитие окислительного стресса при синдроме ишемии-реперфузии печени у крыс.

Введение опытным животным донатора монооксида углерода перед ишемией-реперфузией способствовало улучшению большинства исследуемых параметров прооксидантно-антиоксидантного равновесия (табл. 10). Так, уровни ДК и ОШ в эритроцитах по отношению к животным 2-й группы понижались на 47,3% ($p < 0,001$) и 24,5% ($p < 0,01$), соответственно. Содержание ДК, МДА и ОШ в печени в конце реперфузии по отношению к крысам 2-й группы падало на 65,2% ($p < 0,001$), 27,6% ($p < 0,001$) и 60,1% ($p < 0,001$), соответственно. Одновременно улучшались изучаемые параметры антиоксидантной системы в крови и тканях печени у крыс, получавших CORM-3, по отношению к животным 2-й группы. Так, в печени в конце реперфузии уровни α -токоферола, ретинола и активность каталазы у животных 3-й группы не отличались от контрольных (табл. 10). Результаты исследования указывают, что введение крысам донатора монооксида углерода способствует улучшению прооксидантно-антиоксидантного баланса при ишемии-реперфузии печени.

Изменения основных показателей КТФ крови у экспериментальных животных отражены в табл. 11. Установлено, что в конце реперфузионного периода у экспериментальных животных 2-й группы наблюдались нарушения в системе транспорта кислорода кровью. Так, показатель $p50_{\text{реал}}$ в конце реперфузии в смешанной венозной крови увеличился на 37,2% ($p < 0,001$), указывая на резкое снижение сродства гемоглобина к кислороду и сдвиг КДО вправо (рис. 7). Использование CORM-3 способствовало смещению КДО влево по отношению к животным 2-й группы.

Таблица 11. – Изменение показателей кислородтранспортной функции крови, суммарного содержания нитратов/нитритов (NOx), активности АЛАТ и АсАТ крови у крыс при ишемии-реперфузии печени в условиях введения донатора монооксид углерода – CORM-3 (M±m)

Показатель	Контроль	ИРП	ИРП + CORM-3
n	10	10	10
p50 _{реал} , мм рт. ст.	33,9±1,5	46,6±2,1*	40,0±1,4*#
p50 _{станд} , мм рт. ст.	31,6±2,0	32,2±1,9	33,1±1,4
Hb, г/л	127,9±7,1	142,5±6,2	138,4±4,0
MetHb, %	1,1±0,1	3,0±2,3	1,1±0,2
HbCO, %	0	0,4±0,3	0,5±0,3
pO ₂ , мм рт. ст.	28,5±3,9	34,0±2,5	34,7±5,9
pH, ед.	7,322±0,034	7,078±0,049*	7,223±0,048*#
pCO ₂ , мм рт. ст.	55,9±5,2	78,8±3,9*	73,9±5,8*
HCO ₃ ⁻ , ммоль/л	28,6±1,3	24,5±2,6	30,2±0,7#
TCO ₂ , ммоль/л	30,4±1,4	26,9±2,6	32,5±0,8#
ABE, ммоль/л	2,0±1,5	-6,8±3,1*	1,1±1,0#
SBE, ммоль/л	2,4±1,5	-5,7±3,3*	2,4±1,0#
SBC, ммоль/л	24,9±1,2	17,7±2,4*	24,1±0,9#
NOx, мкмоль/л	16,5±2,1	9,3±0,9*	12,9±1,8

Примечание – * – достоверное различие по отношению к контрольной группе (p<0,05), # – достоверное различие по отношению к группе животных, у которых моделировали синдром ишемии-реперфузии печени (p<0,05)

Одновременно снижались показатели кислотно-основного состояния pH, ABE, SBE и SBC, свидетельствуя о развитии метаболического компонента ацидоза, что является неизбежным после ишемии крупного органа (табл. 11). Моделирование ишемии-реперфузии печени приводило росту показателя pCO₂ крови на 41,0% (p<0,01), что могло быть следствием нарушения микроциркуляции и замедления кровотока в печени. В подтверждение данного предположения выявлено, что у крыс в конце реперфузионного периода наблюдалось снижение NOx (табл. 11), что может быть следствием повреждения NO-синтазной функции и развития дисбаланса между вазоконстрикторами и вазодилататорами при ишемии-реперфузии печени. Так, уровень NOx в плазме

смешанной венозной крови к концу реперфузионного периода понизился на 43,5% ($p < 0,01$) по отношению к контролю.

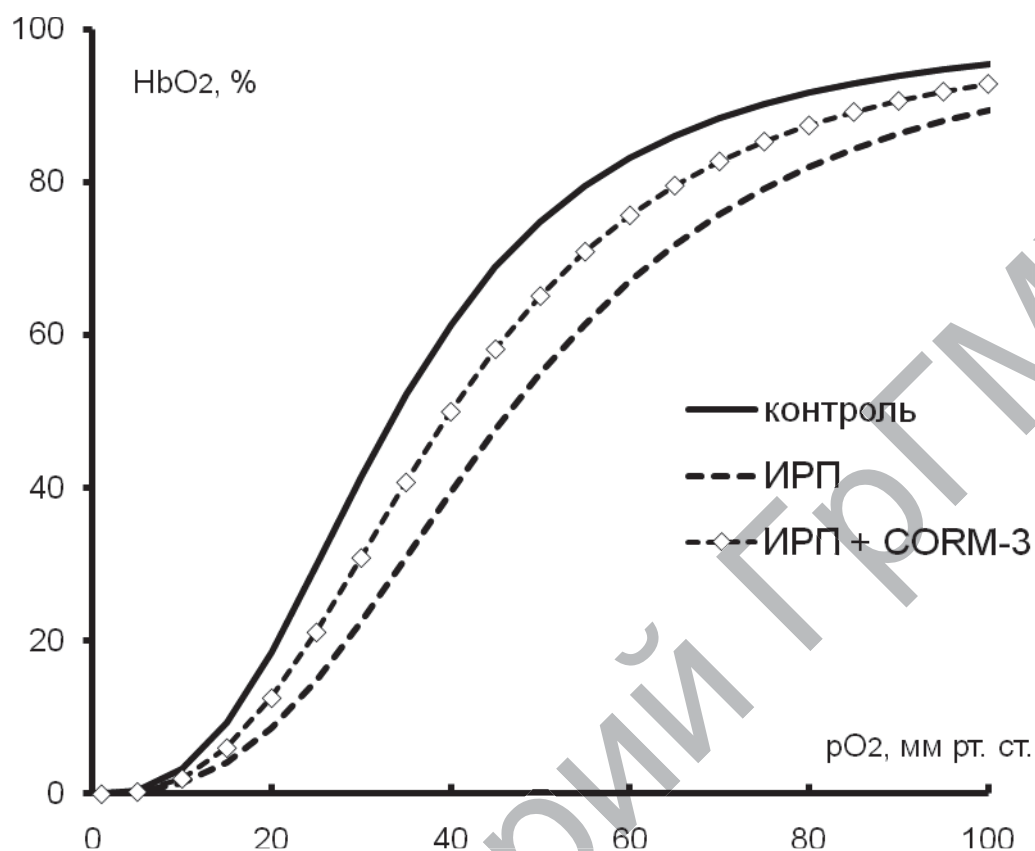


Рисунок 7. – Кривые диссоциации оксигемоглобина у крыс при ишемии-реперфузии печени в условиях инфузии CORM-3, рассчитанные по показателю $p50_{\text{реал}}$

Показано, что в конце реперфузионного периода у экспериментальных животных 3-й группы, получавших CORM-3, наблюдалось улучшение показателей кислородтранспортной функции крови (табл. 12). Так, показатель $p50_{\text{реал}}$ в конце реперфузии в смешанной венозной крови по отношению к животным, не получавшим препарат, снизился на 14,2% ($p < 0,05$), указывая на повышение сродства гемоглобина к кислороду у опытных животных под воздействием донатора монооксид углерода. Одновременно улучшались показатели кислотно-основного состояния pH, ABE, SBE и SBC, свидетельствуя о коррекции метаболического компонента ацидоза. Моделирование ИРП в условиях инфузии CORM-3 не приводило к изменениям уровней MetHb или HbCO.

Установлено, что улучшение функционального состояния печени и повышение СГК крови у крыс, получавших CORM-3, в

конце реперфузионного периода, сопровождалось сохранением уровня NOx в плазме крови, в отличие от животных 2-й группы, у которых данный показатель понижался (табл. 11). Сохранение плазматического пула NO может быть следствием снижения активности процессов ПОЛ и улучшения антиоксидантной защиты при ИРП. Учитывая факт, что уровень HbCO у экспериментальных животных не изменялся, повышение СГК крови могло быть обусловлено участием NO в аллостерической модификации гемоглобина с целью повышения его сродства к кислороду.

При оценке общей морфологической картины печени выявлено, что печень контрольных животных имеет нормальное строение. Архитектоника ее не нарушена. Прослойки соединительной ткани между дольками печени не видны. В центре печеночной дольки располагается центральная вена, по краям в углах дольки – междольковые триады, представленные междольковыми артерией, веной и желчным протоком. Триады окружены небольшим количеством рыхлой волокнистой соединительной ткани. Радиальность печеночных балок хорошо выражена. Синусоидные капилляры более расширены в центральной части классической печеночной дольки по сравнению с периферической. Гепатоциты чаще одноядерные, но встречаются и двуядерные. Цитоплазма гепатоцитов светлая оксифильная, ядра – базофильные.

Вместе с тем установлено, что печень крыс после ишемии-реперфузии характеризуется выраженным полнокровием синусоидных капилляров с эритростазами. В стенке синусоидных капилляров увеличивается количество клеток Купфера. Слабо выражено расширение перисинусоидальных пространств Диссе. Местами обнаруживается гранулоцитарная инфильтрация. Балочно-радиарное строение долек чёткое. В некоторых гепатоцитах выявляются белковая дистрофия или кариопикноз. В целом моделирование ишемии-реперфузии приводит к венозному застою, расширению синусоидных капилляров, увеличению числа клеток Купфера и гранулоцитарной инфильтрации в печеночной ткани, что является следствием развития реперфузионного синдрома в органе. Введение опытными животными CORM-3 способствовало нормализации ширины синусоидных капилляров (табл. 12).

Таблица 12. – Морфометрические показатели печени крыс контрольной и опытных групп при использовании CORM-3 (Медиана, нижний квартиль, верхний квартиль (Me (25%; 75%))).

Параметры	контроль	ИРП	ИРП + CORM-3
n	10	10	10
Ширина синусоидных капилляров (мкм)	5,87 (5,73; 6,24)	9,10*** (7,66; 9,71)	6,06*** (5,73; 6,37)
Количество клеток Купфера (на 0,1 мм ²)	29,51 (25,30; 29,51)	33,73 (29,51; 37,95)	28,46 (25,30; 33,73)
Количество 2-ядерных гепатоцитов (на 0,1 мм ²)	20,03 (16,86; 21,08)	11,59** (10,54; 16,86)	12,65** (9,49; 16,86)
Площадь ядер гепатоцитов (мкм ²)	45,00 (43,58; 47,93)	45,76 (42,82; 49,60)	44,02 (43,25; 45,81)
Диаметр ядер гепатоцитов (мкм)	7,55 (7,47; 7,83)	7,68 (7,42; 7,96)	7,51 (7,45; 7,66)
Периметр ядер гепатоцитов (мкм)	26,09 (25,49; 26,61)	25,85 (25,35; 26,84)	25,40 (25,22; 26,19)

Примечание – данные представлены в виде Me (25%; 75%); *** – $p < 0,001$; * – в сравнении с контролем, • – в сравнении с ишемией-реперфузией

При оценке морфометрических показателей печени установлено, что ширина синусоидных капилляров статистически значимо увеличена по сравнению с контрольными животными на 54,8% ($p < 0,001$) (табл. 12). У животных 2-й группы было слабо выражено расширение перисинусоидальных пространств Диссе. Местами обнаруживается гранулоцитарная инфильтрация. В некоторых гепатоцитах выявляются белковая дистрофия или кариопикноз. Резко снижается количество двухъядерных гепатоцитов. Однако размеры ядер печеночных клеток крыс с ишемией-реперфузией статистически значимо не отличаются от контрольных значений (табл. 12). Выявленные изменения морфометрических показателей указывают на значительные изменения ширины синусоидных капилляров и венозный стаз, что может быть обу-

словлено развитием реперфузионного синдрома в печени у экспериментальных животных.

При оценке гистохимических показателей печени выявлено, что ишемия-реперфузия печени приводит к повышению активности СДГ на 50% ($p<0,05$), падению активности ЛДГ на 24% ($p<0,05$), НАДН-ДГ – на 5,6% ($p<0,05$) и КФ – на 26,7% ($p<0,05$) в тканях печени животных 2-й группы по отношению к контролю (табл. 13). Введение крысам 3-й группы CORM-3 способствовало нормализации активности СДГ и НАДН-ДГ. Вместе с тем активность ЛДГ и КФ оставалась сниженной (см. табл. 13).

Таблица 13. – Активность ферментов (ед. отп. пл.) в цитоплазме гепатоцитов печени крыс контрольной и опытных групп при использовании CORM-3 (Медиана, нижний квартиль, верхний квартиль (Me (25%; 75%)))

Фермент	Контроль	ишемия-реперфузия	Ишемия-реперфузия + CORM-3
n	10	10	10
СДГ	0,28 (0,25; 0,31)	0,42* (0,39; 0,46)	0,32** (0,31; 0,33)
ЛДГ	0,67 (0,61; 0,73)	0,51* (0,50; 0,54)	0,43** •• (0,37; 0,47)
НАДН-ДГ	0,92 (0,91; 0,94)	0,87* (0,86; 0,88)	0,90 (0,87; 0,94)
КФ	1,06 (1,05; 1,11)	0,78* (0,75; 0,91)	0,88** (0,77; 0,89)

Примечание – данные представлены в виде Me (25%; 75%); * – $p<0,05$, •• – $p<0,01$; *** – $p<0,001$; * – в сравнении с контролем, • – в сравнении с ишемией-реперфузией

Применение донатора СО (CORM-3) у крыс 3-й группы приводило к коррекции реперфузионных повреждений при ИРП, что подтверждается снижением активности АлАТ и АсАТ по отношению ко 2-й группе экспериментальных животных. Возможно, использование донатора СО при ишемии-реперфузии приводило к стабилизации митохондриальных мембран и снижению гибели клеток механизмами некроза и апоптоза [Sener A. et al., 2013]. В работе [Naugaа H. et al., 2015] показано, что использование небольших доз СО существенно повышает эффективность тканевого дыхания митохондрий. Кроме того, установлено, что фармакологическое прекондиционирование во время ишемии

перед реперфузией с помощью СО уменьшает неконтролируемую продукцию АФК митохондриями путем ингибирования комплекса III дыхательной цепи [Zuckerbraun B. S. et al., 2007]. Эти результаты согласуются с полученными данными в нашем исследовании о нормализации активности каталазы, уровня α -токоферола, ретинола и GSH в печени в конце реперфузионного периода, что свидетельствует об улучшении редокс-состояния гепатоцитов под влиянием небольших доз СО. С другой стороны, СО может снижать экспрессию мРНК провоспалительных цитокинов (ИЛ-6, α -TNF), что уменьшает при реперфузии интенсивность окислительного стресса, связанного с лейкоцитарной инфильтрацией паренхимы печени [Kaizu, T. et al., 2008]. Известно, что СО является мощным цитопротектором при сердечно-сосудистых заболеваниях, при сепсисе и шоке, трансплантации органов, острых поражениях легких, почек и печени [Bauer I., Pannen B. H., 2009]. СО в малых дозах может проявлять антиокислительную активность, повышая активность антиоксидантных ферментов [Farrugia G., Szurszewski J. H., 2014]. Показано, что использование донатора СО приводит к активации MAPK-сигнальных путей, ответственных за реакцию на стрессорное воздействие на клетку (p38 и JNK), усиливает Nrf-2 транслокацию из цитозоля в ядро и стимулирует активность антиоксидантных генов [Zuckerbraun B. S. et al., 2007]. Возможна реализация протективного эффекта СО при ИРП у крыс через модуляцию кислородсвязывающих свойств крови и повышение сродства гемоглобина к кислороду NO-зависимыми механизмами [Зинчук В. В., Глуткина Н. В., 2013]. Данное предположение согласуется с полученными результатами о нормализации содержания NOx в крови у животных, получавших CORM-3. Нельзя также исключить прямых антиоксидантных эффектов монооксида углерода при использовании CORM-3 у экспериментальных животных [Bauer I., Pannen B. H., 2009].

Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что у крыс 2-й группы при моделировании синдрома ишемии-реперфузии наблюдается нарушение КТФ крови, снижение СГК, смешанный ацидоз, недостаточность L-аргинин-NO системы, полнокровие синусоидных капилляров с эритростазами, ухудшение прооксидантно-антиоксидантного состояния в крови и тканях печени, что отражает развитие окислительного стресса и репер-

фузионных повреждений органа. Использование донатора монооксида углерода в условиях ишемии-реперфузии печени у животных 3-й группы повышает СГК крови и антиокислительную способность печени, снижает активность процессов ПОЛ, что способствует улучшению морфофункционального состояния органа при ишемии-реперфузии. Протективный эффект СО в значительной степени обусловлен его эффектами на КТФ крови, антиоксидантную систему организма, что отражает участие данного газотрансммиттера в механизмах цитопротекции при синдроме ишемии-реперфузии.

3.2 Коррекция механизмов транспорта кислорода и окислительных повреждений печени при ишемии-реперфузии с помощью донатора сероводорода

Сероводород, как и СО, является эндогенно синтезируемым газом с широким спектром биологических эффектов [Farrugia G., Szurszewski J. H., 2014]. Известно, что синтез H_2S в организме человека и животных осуществляется из L-цистеина с помощью цистотионин- β -синтетазы, цистотионин- γ -лиазы и 3-меркаптопируват-сульфотрансферазы при участии цистеин-аминотрансферазы [Улащик В. С., 2012; Kimura H., 2015]. Показано, что данный газотрансммиттер способен оказывать вазодилаторный, противовоспалительный и антиапоптотический эффект при ишемии-реперфузии органов [Shimada S. et al., 2015; Wu D. et al., 2015]. Механизм действия сероводорода на печень при реперфузии остается изученным недостаточно. Учитывая способность сероводорода вызывать сульфгидрирование белков [Kimura H., 2015], предположили, что защитный эффект сероводорода может быть результатом его взаимодействия с гемоглобином и модификации кислородсвязывающих свойств крови, что существенно влияет на прооксидантно-антиоксидантное равновесие [Зинчук В. В., Ходосовский М. Н., 2006].

Выявлено, что у крыс, получавших NaHS (4-я группа), в конце реперфузии активность АЛАТ и АсАТ в плазме крови снижалась на 47,0% ($p < 0,001$) и 53,0% ($p < 0,001$) соответственно, по отношению к животным, которые препарат не получали (рис. 8). Данные изменения указывают на гепатозащитное действие донатора сероводорода в условиях ИРП у крыс. Показано, что у

экспериментальных животных 4-й группы сохранялся пониженный уровень NOx по отношению к контролю при отсутствии различия со 2-й группой животных (рис. 9). Данный факт указывает на то, что инфузия NaHS не влияла на NO-синтазную функцию в организме опытных животных. Вместе с тем установлено, что у экспериментальных животных 2-й группы снижался уровень H₂S плазмы по отношению к контролю (рис. 10). Инфузия NaHS восстанавливала уровень сероводорода в плазме крови в конце реперфузии у животных 3-й группы.

Установлено, что введение опытным животным NaHS перед реперфузией способствовало улучшению большинства исследуемых параметров прооксидантно-антиоксидантного равновесия (табл. 14). Так, уровень ДК и ОШ в эритроцитах по отношению к животным 2-й группы снижался на 53,3% ($p < 0,001$) и 32,7% ($p < 0,001$), соответственно. Содержание ДК, МДА и ОШ в печени в конце реперфузии по отношению к крысам 2-й группы падало на 70,2% ($p < 0,001$), 31,7 ($p < 0,001$) и 61,7% ($p < 0,001$), соответственно. Одновременно улучшались изучаемые параметры антиоксидантной системы в крови и тканях печени у крыс, получавших NaHS, по отношению к животным 2-й группы. Так, в печени в конце реперфузии уровни α -токоферола, ретинола и активность каталазы у животных 3-й группы не отличались от контрольных значений, а содержание GSH повышалось (табл. 14). Результаты исследования указывают, что введение крысам донатора сероводорода способствует улучшению прооксидантно-антиоксидантного баланса при ишемии-реперфузии печени.

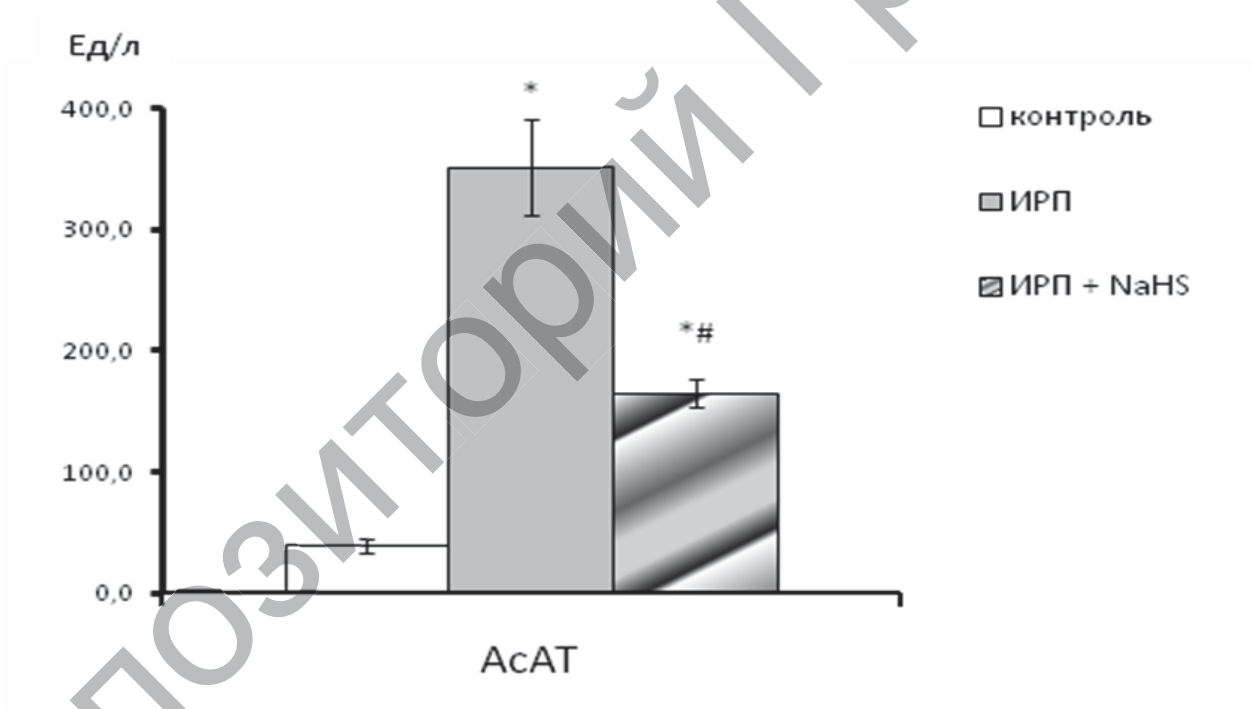
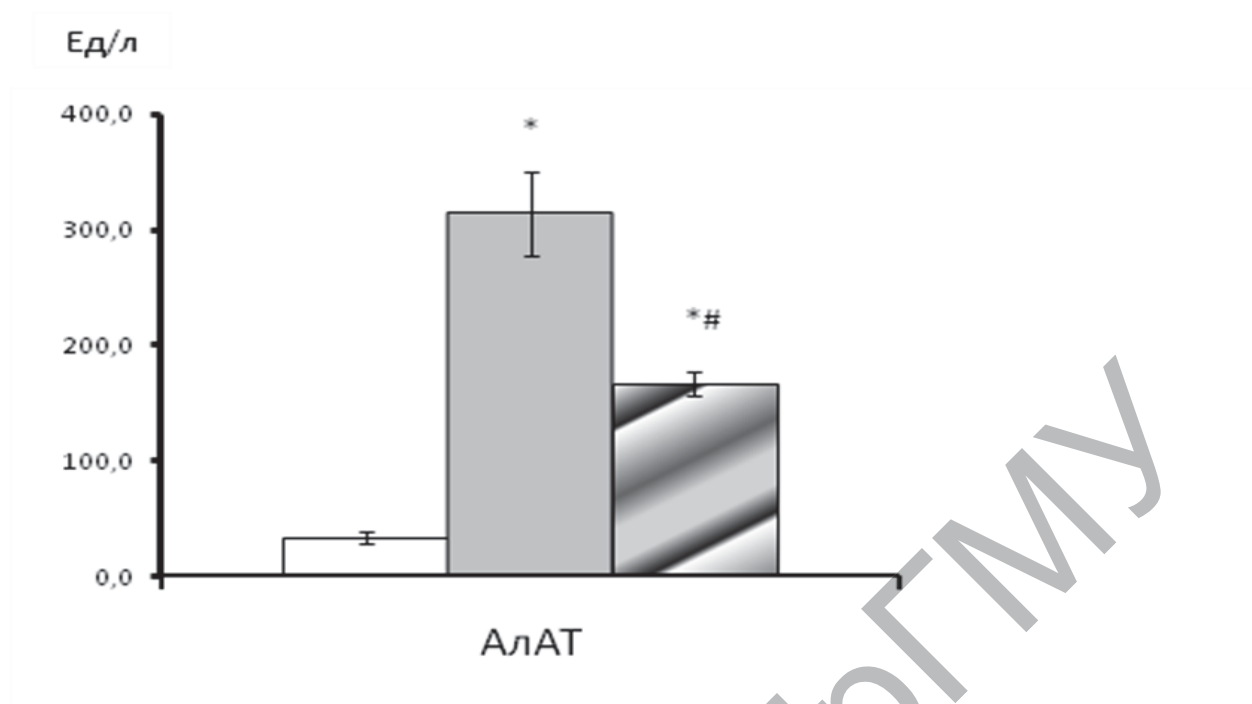


Рисунок 8. – Изменение активности трансаминаз крови под влиянием NaHS у опытных животных (Ед/л), где * – достоверное различие по отношению к контрольной группе ($p < 0,05$), # – достоверное различие по отношению ко 2-й группе (ИРП)

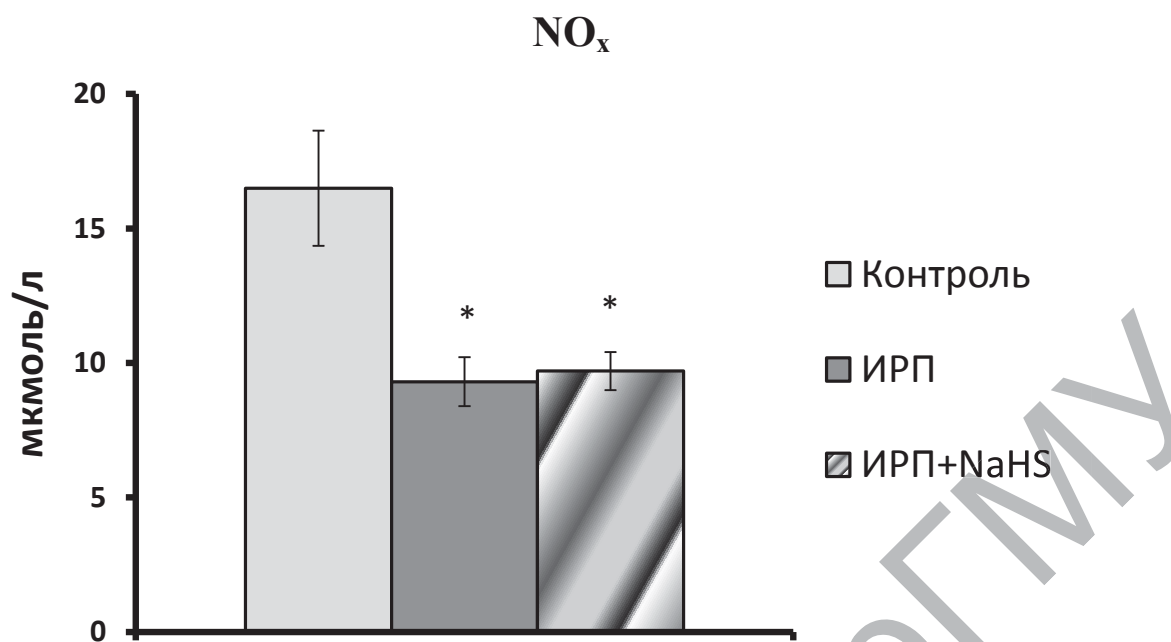


Рисунок 9. – Изменение суммарного уровня нитритов/нитратов (NO_x) в крови при ишемии-реперфузии печени (ИРП) у крыс (мкмоль/л), где * – достоверное различие по отношению к контролю ($p < 0,05$), # – достоверное различие по отношению к группе животных, у которых моделировали только синдром ишемии-реперфузии печени ($p < 0,05$)

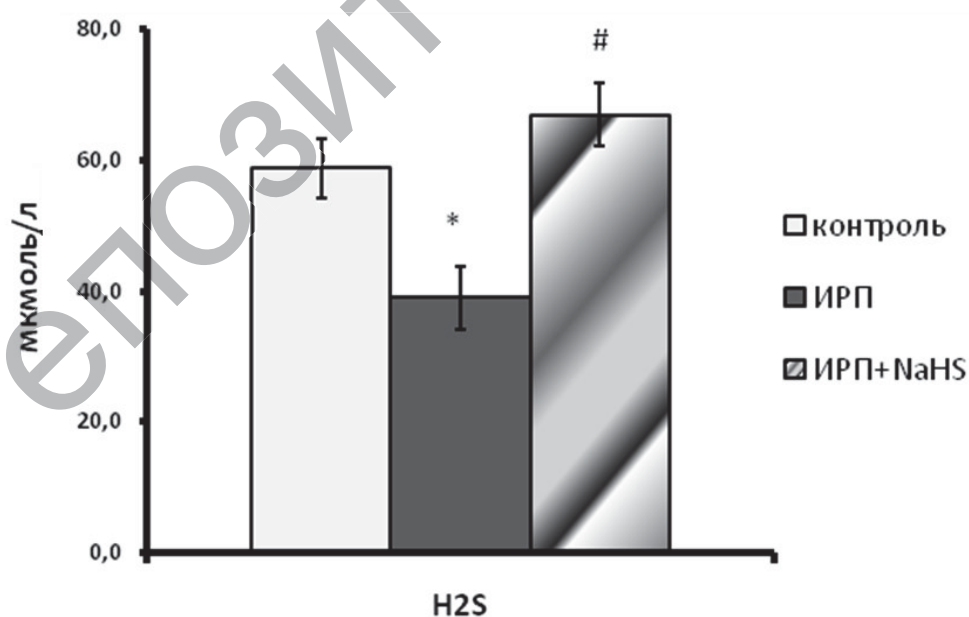


Рисунок 10. – Содержание сероводорода в плазме крови опытных животных (мкмоль/л), где * и # как на рисунке 9

Таблица 14. – Изменение параметров прооксидантно-антиоксидантного состояния у крыс при ИРП в условиях введения NaHS ($M \pm m$)

Показатель	Контроль	ИРП	ИРП + NaHS
n	10	10	10
ДК _{пл} , $\Delta E_{233}/\text{мл}$	$0,85 \pm 0,08$	$4,01 \pm 0,38^*$	$1,26 \pm 0,13^{* \#}$
ДК _{эр} , $\Delta E_{233}/\text{мл}$	$5,68 \pm 0,48$	$16,73 \pm 0,92^*$	$7,81 \pm 0,49^{* \#}$
ДК _{печ} , $\Delta E_{233}/\text{г}$	$8,52 \pm 0,74$	$46,62 \pm 2,65^*$	$13,9 \pm 1,55^{* \#}$
МДА _{пл} , мкмоль/л	$2,93 \pm 0,91$	$6,45 \pm 2,99$	$1,85 \pm 0,34$
МДА _{эр} , мкмоль/л	$7,69 \pm 0,96$	$6,07 \pm 0,79$	$7,6 \pm 0,61$
МДА _{печ} , мкмоль/г	$24,94 \pm 1,59$	$39,42 \pm 2,1^*$	$26,91 \pm 1,22^{\#}$
ОШ _{пл} , ЕД/мл	$20,05 \pm 1,22$	$184,49 \pm 10,1^*$	$61,68 \pm 4,83^{* \#}$
ОШ _{эр} , ЕД/мл	$39,03 \pm 2,52$	$65,14 \pm 4,05^*$	$43,84 \pm 2,39^{\#}$
ОШ _{печ} , ЕД/г	$115,06 \pm 5,29$	$469,9 \pm 33,55^*$	$179,9 \pm 24,2^{* \#}$
α -токоферол _{пл} , мкмоль/л	$20,96 \pm 0,38$	$17,4 \pm 0,34^*$	$19,36 \pm 0,38^{* \#}$
α -токоферол _{эр} , мкмоль/л	$96,29 \pm 3,74$	$64,48 \pm 2,97^*$	$84,61 \pm 1,81^{* \#}$
α -токоферол _{печ} , мкмоль/г	$177,33 \pm 4,23$	$141,22 \pm 3,79^*$	$169,0 \pm 2,81^{\#}$
ретинол _{пл} , мкмоль/л	$2,32 \pm 0,07$	$1,72 \pm 0,03^*$	$2,16 \pm 0,07^{\#}$
ретинол _{эр} , мкмоль/л	$7,16 \pm 0,3$	$5,67 \pm 0,19^*$	$7,14 \pm 0,24^{\#}$
ретинол _{печ} , мкмоль/г	$20,37 \pm 0,52$	$16,7 \pm 0,4^*$	$19,24 \pm 0,39^{\#}$
GSH _{эр} , мкмоль/гHb	$50,67 \pm 1,84$	$50,98 \pm 1,97$	$49,58 \pm 2,09$
GSH _{печ} , ммоль/г	$4,09 \pm 0,36$	$1,27 \pm 0,26^*$	$7,0 \pm 0,24^{* \#}$
Каталаза _{эр} , $\text{ммоль/л} \cdot \text{гHb} \cdot \text{сек}$	$1,0 \pm 0,13$	$0,38 \pm 0,06^*$	$1,1 \pm 0,09^{\#}$
Каталаза _{печ} , $\text{ммоль/л} \cdot \text{гбелка} \cdot \text{сек}$	$3,6 \pm 0,18$	$1,47 \pm 0,16^*$	$3,37 \pm 0,16^{\#}$

Примечание – * – достоверное различие по отношению к контрольной группе ($p < 0,05$), # – достоверное различие по отношению к группе животных, у которых моделировали синдром ишемии-реперфузии печени ($p < 0,05$)

Установлено, что в конце реперфузионного периода у экспериментальных животных, получавших NaHS, наблюдалось улучшение показателей кислородтранспортной функции крови (табл. 15). Так, показатель $p50_{\text{реал}}$ в конце реперфузии в смешанной венозной крови по отношению к животным, не получавшим препарат, снизился на 13,9% ($p < 0,05$), что говорит о повышении сродства гемоглобина к кислороду у опытных животных под воздействием донатора сероводорода (рис. 11).

Одновременно улучшались показатели кислотно-основного состояния pH , HCO_3^- , TCO_2 , ABE, SBE и SBC, свидетельствуя о коррекции метаболического компонента ацидоза. Так, показатели pH , HCO_3^- , ABE, SBE и SBC не отличались от таковых в контроле. Показатель HCO_3^- у животных, получавших NaHS и SBC в конце реперфузионного периода, повышался на 32,2% ($p < 0,05$) и 44,1% ($p < 0,05$) по отношению к крысам 2-й группы.

Моделирование ишемии-реперфузии печени в условиях инфузии NaHS не приводило к изменениям уровней MetHb или HbCO, что также может являться положительным моментом исследования, учитывая способность сероводорода оказывать прямое повреждающее действие на ткани в высоких концентрациях. В данном случае доза NaHS в 14 мкМ оказала протективный эффект на кислородтранспортную функцию крови, не изменяя концентрацию патологических фракций гемоглобина (табл. 15).

Результаты исследования показали, что у крыс при моделировании синдрома ИРП инфузия донатора сероводорода улучшает параметры КТФ крови, приводит к сдвигу КДО влево, улучшает прооксидантно-антиоксидантное состояние, снижает степень реперфузионных повреждений печени (судя по активности АлАТ и АсАТ). Результаты исследования согласуются с данными других авторов [Kang K. et al., 2009], которые установили, что у крыс инфузия NaHS в дозе 14 мкмоль/кг приводит к снижению активности миелопероксидазы и концентрации МДА в печени при реперфузии в сравнении с животными, у которых ИРП моделировали без препарата. Характерно, что в данном исследовании донатор сероводорода понижал возросшую концентрацию NO в сыворотке крови, тогда как в наших экспериментах суммарный уровень нитратов/нитритов плазмы оставался ниже контроля в обеих экспериментальных группах.

Таблица 15. – Изменение показателей кислородтранспортной функции крови, суммарного содержания нитратов/нитритов (NOx), активности АЛАТ и АсАТ крови у крыс при ишемии-реперфузии печени в условиях введения донатора сероводорода – NaHS (M±m)

Показатель	Контроль	ИРП	ИРП + NaHS
n	10	10	10
p50 _{реал} , мм рт. ст.	33,9±1,5	46,6±2,1*	40,1±1,7*#
p50 _{станд} , мм рт. ст.	31,6±2,0	32,2±1,9	34,3±2,5
Hb, г/л	127,9±7,1	142,5±6,2	141,8±4,6
MetHb, %	1,1±0,1	3,0±2,3	1,0±0,1
HbCO, %	0	0,4±0,3	0
pO ₂ , мм рт. ст.	28,5±3,9	34,0±2,5	29,6±3,8
pH, ед.	7,322±0,034	7,078±0,049*	7,236±0,048#
pCO ₂ ., мм рт. ст.	55,9±5,2	78,8±3,9*	76,0±4,6*
HCO ₃ ⁻ , ммоль/л	28,6±1,3	24,5±2,6	32,4±1,3#
TCO ₂ , ммоль/л	30,4±1,4	26,9±2,6	34,8±1,2*#
ABE, ммоль/л	2,0±1,5	-6,8±3,1*	3,1±1,9#
SBE, ммоль/л	2,4±1,5	-5,7±3,3*	4,8±1,9#
SBC, ммоль/л	24,9±1,2	17,7±2,4*	25,5±1,5#

Примечание – * – достоверное различие по отношению к контрольной группе (p<0,05), # – достоверное различие по отношению к группе животных, у которых моделировали синдром ишемии-реперфузии печени (p<0,05)

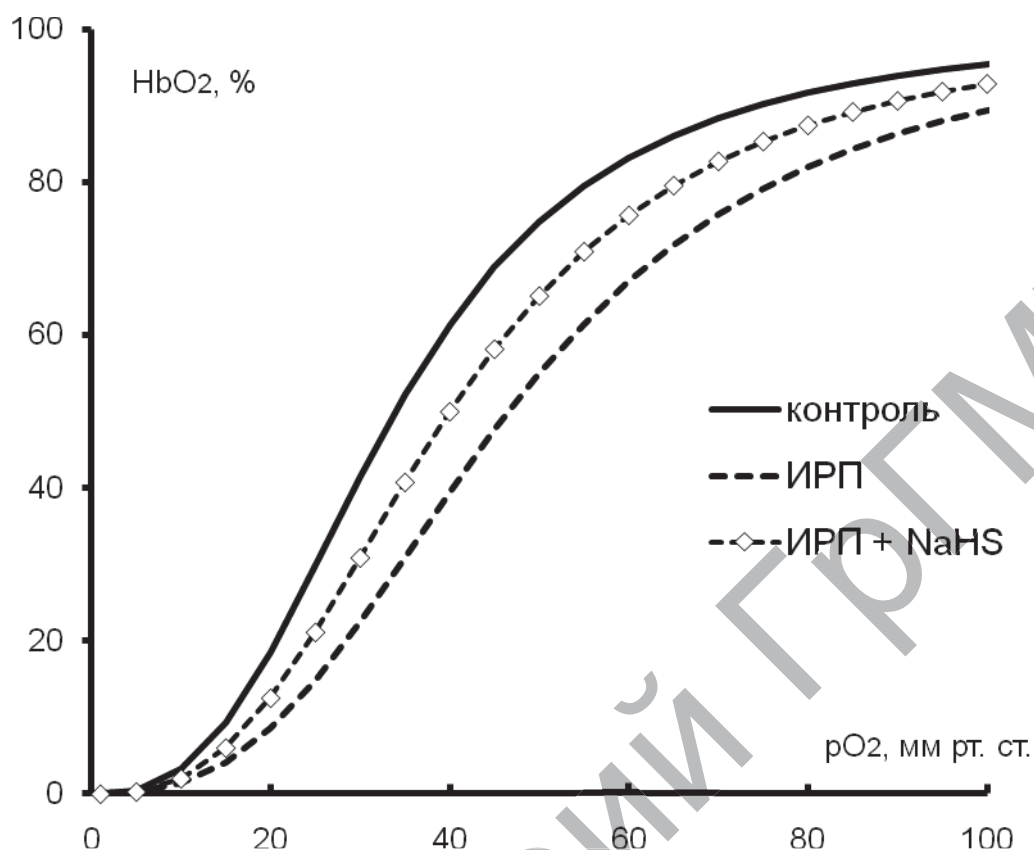


Рисунок 11. – Кривые диссоциации оксигемоглобина у крыс при ишемии-реперфузии печени в условиях инфузии NaHS, рассчитанные по показателю $p50_{\text{реал}}$

Возможно, снижение уровня NOx плазмы в наших экспериментах обусловлено переходом NO в эритроциты и последующим его взаимодействием с гемоглобином, что приводит к образованию нитрозилгемоглобина ($\text{HbFe}^{2+}\text{NO}$), который сдвигает КДО вправо [Зинчук В. В., Глуткина Н. В., 2013], тогда как использование донатора сероводорода уменьшает правосторонний сдвиг КДО за счет сульфгидрирования гемоглобина [Kimura H, 2015].

Установлено, что у крыс, получавших NaHS при моделировании ишемии-реперфузии, происходит уменьшение ширины синусоидных капилляров на 20,8% ($p < 0,01$) в сравнении с животными 2-й группы, увеличение количества клеток Купфера на 17,9% ($p < 0,05$) в сравнении с контрольными животными, при этом количество двухъядерных гепатоцитов остается сниженным

по отношению к контролю (табл. 16). Другие морфометрические показатели у животных 1-й, 2-й и 4-й групп достоверных различий не имели (табл. 16).

Таблица 16. – Морфометрические показатели печени крыс контрольной и опытных групп при использовании NaHS (Медиана, нижний квартиль, верхний квартиль (Me (25%; 75%)))

Параметры	Контроль	ИРП	ИРП + NaHS
Ширина синусоидных капилляров, мкм	5,87 (5,73; 6,24)	9,10*** (7,66; 9,71)	7,21** •• (6,41; 7,68)
Количество клеток Купфера на 0,1 мм ²	29,51 (25,30; 29,51)	33,73 (29,51; 37,95)	34,78* (32,68; 36,89)
Количество 2-ядерных гепатоцитов на 0,1 мм ²	20,03 (16,86; 21,08)	11,59** (10,54; 16,86)	10,54*** (7,38; 13,70)
Площадь ядер гепатоцитов, мкм ²	45,00 (43,58; 47,93)	45,76 (42,82; 49,60)	48,37 (42,30; 50,18)
Диаметр ядер гепатоцитов, мкм	7,55 (7,47; 7,83)	7,68 (7,42; 7,96)	7,87 (7,38; 7,98)
Периметр ядер гепатоцитов, мкм	26,09 (25,49; 26,61)	25,85 (25,35; 26,84)	26,63 (25,00; 27,30)

Примечание — данные представлены в виде Me (25%; 75%); * – $p < 0,05$; **, •• – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$; * – в сравнении с контролем, • – в сравнении с ишемией-реперфузией

При оценке гистохимической картины печени установлено, что у крыс 4-й группы сохраняется сниженная активность лактатдегидрогеназы, но повышается активность кислой фосфатазы на 10,4% ($p < 0,05$) в цитоплазме гепатоцитов по отношению к крысам 2-й группы (табл. 8). Повышение активности кислой фосфатазы может указывать на активацию процессов внутриклеточного переваривания и защиты под влиянием сероводорода. При этом повышается активность сукцинатдегидрогеназы по отношению к контролю на 33,3% ($p < 0,01$) и по отношению ко 2-й

группе – на 12,5% ($p < 0,05$), что свидетельствует об усиленной работе цикла трикарбоновых кислот у крыс, получавших NaHS.

Таблица 17. – Активность ферментов (ед. отп. пл.) в цитоплазме гепатоцитов печени крыс контрольной и опытных групп при использовании NaHS (Медиана, нижний квартиль, верхний квартиль (Me (25%; 75%)))

Фермент	Контроль	ИРП	ИРП + NaHS
СДГ	0,27 (0,26; 0,30)	0,32 * (0,30; 0,35)	0,36 ** • (0,34; 0,38)
ЛДГ	0,67 (0,66; 0,69)	0,50 *** (0,47; 0,57)	0,55 *** (0,48; 0,56)
НАДН-ДГ	0,90 (0,87; 0,93)	0,91 (0,82; 0,93)	0,86 (0,80; 0,92)
КФ	0,98 (0,96; 1,00)	0,77 * (0,70; 0,82)	0,85 * • (0,84; 0,89)

Примечание– данные представлены в виде Me (25%; 75%); * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$; * – в сравнении с контролем, • – в сравнении с ишемией-реперфузией

Повышение СГК крови при реперфузии может способствовать снижению состояния «относительной» гипероксии, когда в постишемическом периоде ткани не способны полноценно утилизировать кислород, но получают кровь с обычным его содержанием [Биленко М. В., 1989]. Результатом такого дисбаланса является увеличение образования свободных радикалов кислорода в процессе использования последнего в митохондриях и развитие окислительного стресса, что наблюдалось у животных 2-й группы. По-видимому, смещение КДО влево при реперфузии способствовало ограничению участия кислорода в свободнорадикальных процессах и снижению окислительного повреждения печени. Возможно, инфузия донатора сероводорода способствует улучшению работы митохондрий при ИРП, которые являются ключевым местом генерации активных форм кислорода при ИРП [Биленко М. В., 1989, Mukhopadhyay P. et al., 2012]. Введение крысам NaHS способствует сохранению мембранного потенциала митохондрий, повышению образования ими АТФ и уменьшению аномального перераспределения цитохрома С, а также восстановлению функции нейронов коры мозга при моделировании

остановки сердца и последующей реанимации [Pan H. et al., 2014]. Повышение СГК крови при реперфузии может способствовать снижению состояния «относительной» гипероксии, когда в постишемическом периоде митохондрии не способны полноценно утилизировать кислород, но получают кровь с обычным его содержанием [Биленко М. В., 1989]. Кроме того, нельзя исключить прямого антиоксидантного действия сероводорода при ИРП [Szabó C., 2007].

Известно, что сероводород как газотрансмиттер активирует цитопротекторный генетический аппарат клеток в постишемическом периоде [O'Connell M. A. et al., 2015]. Установлено, что введение NaHS при ИРП способствует повышению экспрессии ядерного фактора Nrf-2, что приводит к активации генов, продуцирующих проадаптивные белки, в частности антиоксидантные ферменты (глутамат-цистеин лигаза, глутатион-S-трансфераза, тиоредоксинредуктаза-1, гемоксигеназа-1), вовлекаемые в процессы детоксикации свободных радикалов кислорода и выживания клеток при повреждающих воздействиях [Shimada S et al., 2015, O'Connell M.A. et al., 2015]. Тиоредоксинредуктаза-1 участвует в детоксикации таких мощных индукторов окислительного стресса, как перекись водорода и пероксинитрит [Zhang W., 2007]. Повышение ее активности могло быть фактором нормализации уровня каталазы при инфузии NaHS крысам в наших экспериментах. Повышение экспрессии глутамат-цистеин лигазы, участвующей в синтезе GSH, могло быть причиной повышения уровня последнего в печени у опытных животных 4-й группы.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что у крыс при использовании донатора сероводорода в условиях ИРП наблюдается улучшение параметров кислородтранспортной функции крови, прооксидантно-антиоксидантного баланса, отдельных морфометрических и гистохимических показателей печени. Данные изменения указывают на улучшение морфофункционального состояния печени при использовании NaHS в условиях ишемии-реперфузии печени механизмами, не связанными с продукцией NO.

Глава 4

РОЛЬ ГАЗОТРАНСМИТТЕРОВ В ЗАЩИТНОМ ЭФФЕКТЕ N₁-МЕТИЛНИКОТИНАМИДА ПРИ ИШЕМИИ- РЕПЕРФУЗИИ ПЕЧЕНИ

В предыдущей главе показано, что моделирование ИРП у крыс маневром Прингла приводит к дисфункции эндотелия (судя по снижению NOx), которое сопровождается нарушениями КТФ крови, окислительным стрессом и морфофункциональными нарушениями в печени. Показано, что недостаточность NO-зависимой вазодилатации может приводить к компенсаторному повышению синтеза 1-МНА из никотинамида при прогрессирующей легочной гипертензии в эксперименте и клинике [Fedorowicz, A. et al., 2016]. Долгое время 1-МНА считали малоактивным побочным продуктом деградации никотинамида, который образуется в печени и выделяется с мочой. Однако в последнее время выявлены противовоспалительные и антитромботические свойства данного метаболита [Gebicki J. et al., 2003; Chlopicki S. et al., 2007]. Поскольку воспаление и нарушения микроциркуляции являются составными компонентами реперфузионного повреждения в печени, предположили, что 1-МНА может оказать протективное действие при данной патологии.

4.1 Влияние N₁-метилникотинамида на кислородсвязывающие свойства крови, кислотно-основное и прооксидантно-антиоксидантное состояние при ишемии-реперфузии печени

На начальном этапе исследований изучали способность 1-МНА влиять на параметры прооксидантно-антиоксидантного баланса и КТФ крови при моделировании реперфузионных повреждений печени у крыс [Ходосовский М. Н., Зинчук В. В., 2009; Ходосовский М. Н. и др., 2010].

Опыты выполнены на взрослых крысах-самцах массой 360-440 г, предварительно выдержанных в стандартных условиях вивария. Под комбинированным наркозом (тиопентал натрия 30 мг/кг, калипсол 100 мг/кг) ишемию печени вызывали наложением сосудистого зажима на *a. hepatica* и *v. portae* (маневр Прингла) в течение 30 минут, после снятия зажима реперфузионный

период длился 120 минут. Вводили силиконовый катетер в правое предсердие для получения смешанной венозной крови. Забор образцов крови осуществляли до и после ишемии, а также на 120-й минуте реперфузии. В конце экспериментов проводили эвтаназию животных (тиопентал натрия, 100 мг/кг, в/в), затем извлекали печень для исследования. Все опыты проведены в соответствии с этическими стандартами по проведению исследований на экспериментальных животных Гродненского государственного медицинского университета.

Животных разделили на 2 экспериментальные группы: в 1-й группе (n=8) моделировали ИРП, во 2-й группе (n=8) – за 10 мин. до ишемии печени интраперитонеально вводили 1-МНА в дозе 100 мг/кг. Оценку параметров КТФ крови, прооксидантно-антиоксидантного баланса, АлАТ, АсАТ и статистическую обработку данных проводили, как описано в гл. 2.

Установлено, что у животных 1-й группы на 120-й минуте реперфузии в смешанной венозной крови содержание продуктов ПОЛ резко возрастало (табл. 1, приложение). Так, уровень ДК в плазме крови повысился по отношению к исходному на 264,4% ($p<0,05$), а флюоресценция продуктов со свойствами ОШ возросла на 633,3% ($p<0,05$). Те же параметры ПОЛ были исследованы в образцах печени, где их содержание к концу реперфузионного периода также увеличивалось (рис. 12). Одновременно выявлено, что на протяжении ИРП в крови и тканях печени крыс снижалось содержание ряда антиоксидантов. Так, уровень α -токоферола в плазме смешанной венозной крови к концу реперфузионного периода понизился на 19% ($p<0,05$), а ретинола – на 35,8% ($p<0,05$). Активность каталазы эритроцитов и гомогената печени в конце реперфузии по отношению к исходным уровням падала на 45,8% ($p<0,05$) и 42,7% ($p<0,05$), соответственно. Содержание α -токоферола и ретинола в тканях печени на 120-й минуте реперфузии также понижалось.

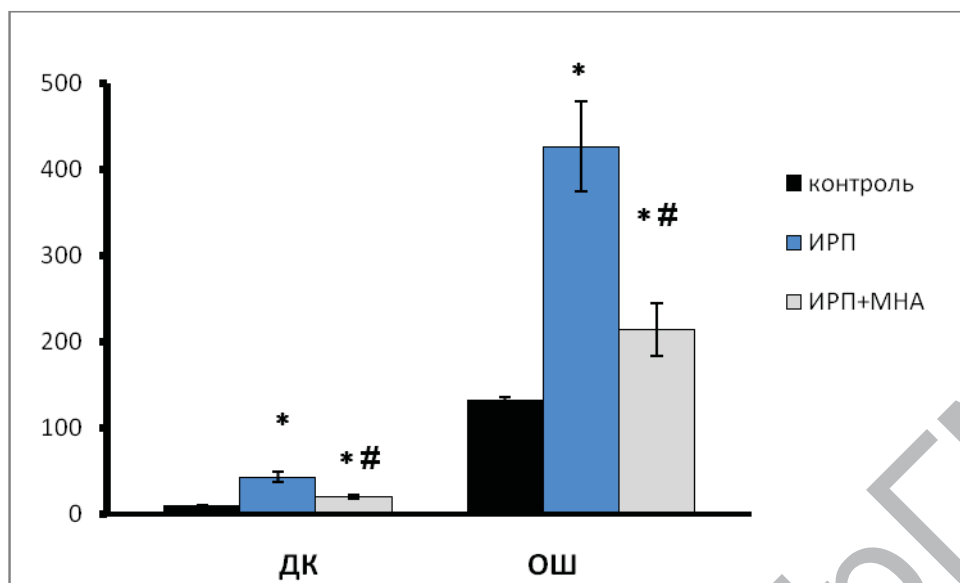


Рисунок 12. – Содержание продуктов ПОЛ в печени опытных крыс (ЕД/г)

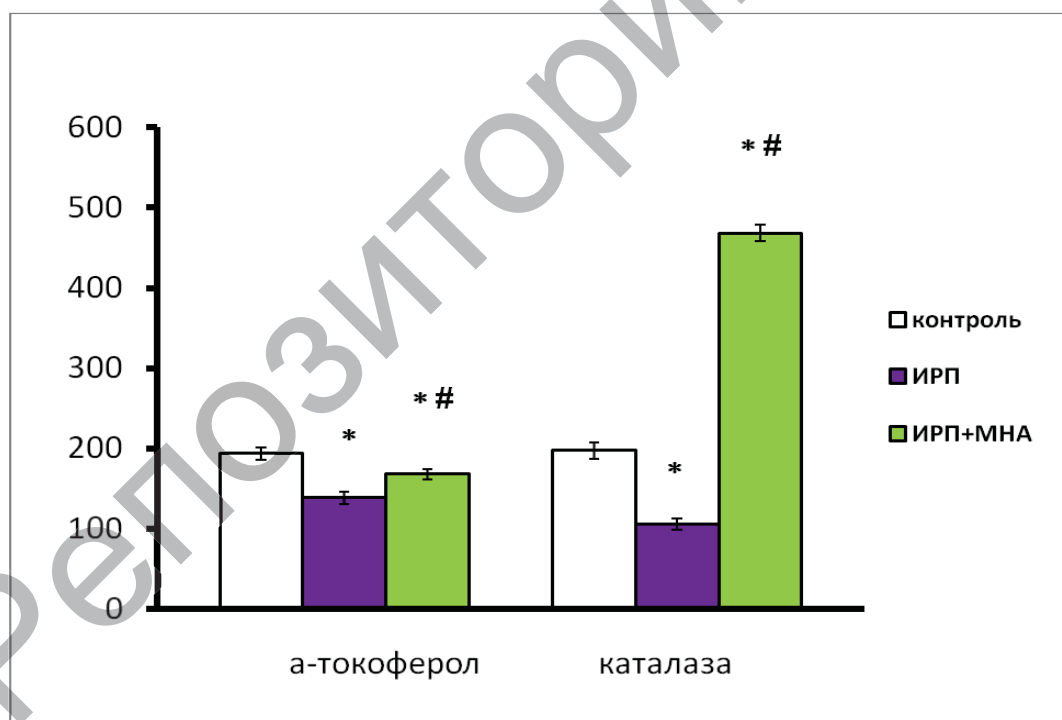


Рисунок 13. – Содержание α-токоферола (нмоль/г) и активность каталазы (ммольН₂О₂*мин/г белка) в печени экспериментальных животных

Данные результаты указывают на интенсификацию процессов ПОЛ и на истощение механизмов антиоксидантной защиты у экспериментальных животных при ИРП, что отражает развитие постишемических повреждений органа. Действительно, активность АлАТ и АсАТ в плазме крови на 120 мин. реперфузии возрастала по отношению к исходной в 8,5 ($p < 0,001$) и в 8,3 раза ($p < 0,001$), соответственно, указывая на развитие тяжелых повреждений печени в конце постишемического периода у животных 1-й группы (табл. 1, приложение).

Вместе с тем у крыс, которым назначали 1-МНА, наблюдались менее выраженные изменения активности процессов ПОЛ по отношению к животным, которые 1-МНА не получали (табл. 1, приложение). Так, на 120-й мин. реперфузии в смешанной венозной крови содержание ДК повысилось по отношению к исходному только на 51,4% ($p < 0,05$), а флюоресценция продуктов со свойствами ОШ возросла на 130,3% ($p < 0,05$). Те же параметры ПОЛ были исследованы в образцах печени, где их содержание к концу реперфузионного периода также возрастало, однако оставалось ниже, чем у животных, которым не давали перед ишемией-реперфузией 1-МНА (рис. 12). Также выявлено, что у крыс, которым давали 1-МНА, на протяжении ИРП в крови содержание ряда антиоксидантов снижалось в меньшей степени, чем у животных, не получавших 1-МНА. Так, уровень α -токоферола в плазме смешанной венозной крови к концу реперфузионного периода понизился на 11,3% ($p < 0,05$), ретинола – на 20,7% ($p < 0,05$). Активность каталазы эритроцитов в конце реперфузии по отношению к исходным уровням, в отличие от животных без метилникотинамида, повышалась на 65,0% ($p < 0,05$). Содержание α -токоферола и активность каталазы в тканях печени на 120-й мин. реперфузии было выше, чем у животных, которым 1-метилникотинамид не давали (рис. 13). Активность АлАТ и АсАТ в плазме крови на 120-й мин. реперфузии возрастала по отношению к исходной в 4,6 ($p < 0,01$) и в 4,4 раза ($p < 0,001$), соответственно, что было достоверно ниже, чем у животных 1-й группы (табл. 1, приложение).

Изменения основных показателей КТФ смешанной венозной крови при ишемии и последующей реперфузии печени отражены в табл. 18.

Таблица 18. – Изменение параметров кислородтранспортной функции крови при ишемии-реперфузии печени у крыс в условиях введения N₁-метилникотинамида (M±m)

Показатель	Исходное значение	30 мин. ишемии	120 мин. реперфузии	
			1-я группа	2-я группа
n	8	5	8	8
p50 _{реал} , мм рт. ст.	36,9±1,5	44,0±2,3*	43,5±1,1*	40,2±1,0#
p50 _{станд} , мм рт. ст.	33,7±1,2	35,5±0,9	33,2±1,4	34,2±1,2
Hb, г/л	119,5±5,4	127,0±10,1	126,5±12,4	126,6±4,6
MetHb, г/л	0,48±0,12	0,28±0,13	0,5±0,21	0,41±0,07
COHb, г/л	0,65±0,37	0,0±0,0	0,9±0,49	0,31±0,14
pO ₂ , мм рт. ст.	34,8±1,5	36,4±1,4	42,9±6,6	35,8±3,1
pH, ед.	7,32±0,02	7,21±0,05*	7,17±0,04*	7,25±0,03#
pCO ₂ , мм рт. ст.	62,7±2,2	65,4±3,1	74,5±8,4*	73,3±4,1*
HCO ₃ ⁻ , ммоль/л	32,3±0,6	27,0±2,4*	27,0±1,8*	29,9±1,5
TCO ₂ , ммоль/л	34,2±0,6	29,0±2,4*	29,3±2,0*	32,2±1,5
ABE, ммоль/л	5,2±0,7	-1,5±2,9*	-2,4±1,7*	1,0±1,8*

Примечание – * – достоверные изменения по отношению к исходному значению (p<0,05), # – достоверные изменения по отношению к 1-й группе

Ишемия печени приводила к снижению показателей кислотно-основного состояния крови: pH , HCO_3^- , TCO_2 и ABE по отношению к исходным уровням, указывая на развитие метаболического ацидоза. Так, уровни HCO_3^- и TCO_2 после ишемии понизились по отношению к исходным значениям на 16,4% ($p < 0,05$) и 15,3% ($p < 0,05$), соответственно. Одновременно в конце ишемического периода наблюдалось увеличение показателя $p50_{\text{реал}}$ на 19,3% ($p < 0,05$) по отношению к исходному уровню. На 120-й мин. реперфузии у животных 1-й группы более выражено понижались pH , HCO_3^- , TCO_2 , ABE , увеличивалось pCO_2 крови, отражая усиление метаболического ацидоза и гиперкапнии. Так, уровни HCO_3^- и TCO_2 в конце реперфузии оставались ниже исходных значений на 16,2% ($p < 0,05$) и 14,3% ($p < 0,05$), соответственно. Показатель pCO_2 возрос на 18,9% ($p < 0,05$) по отношению к исходному уровню. В конце реперфузионного периода у крыс 1-й группы сохранялось увеличение $p50_{\text{реал}}$ на 18,0% ($p < 0,05$) по отношению к доишемическому уровню, что свидетельствует снижении СГК крови после ишемии и сдвиге КДО вправо (рис. 14).

Инфузия 1-МНА перед моделированием ишемии-реперфузии печени способствовала менее выраженным изменениям параметров КТФ крови в конце реперфузии. На 120-й мин. реперфузионного периода значительно изменились только показатели ABE и pCO_2 по отношению к исходным. Так, увеличение показателя pCO_2 в конце реперфузии у животных этой группы составило 17,0% ($p < 0,05$) по отношению к исходному уровню. Показатель $p50_{\text{реал}}$ в конце реперфузии у животных 2-й группы увеличился всего на 9,1% ($p > 0,05$) по отношению к исходному уровню, однако был значительно меньшим, чем у животных 1-й группы, что указывает на повышение СГК крови (рис. 14). Важно отметить, что в конце реперфузионного периода уровни $MetHb$ и $SOHb$ по отношению к исходным у крыс, получавших 1-МНА, существенно не изменялись (табл. 18).

Проведенные исследования показали, что ишемия печени приводила к снижению показателей кислотно-основного состояния крови (pH , HCO_3^- , TCO_2 и ABE) по отношению к исходным уровням, указывая на развитие метаболического ацидоза, который неизбежен при ишемии такого крупного органа, как печень [Биленко М. В., 1989]. Смещение КДО вправо (судя по показате-

лю $p50_{\text{реал}}$) носило, по-видимому, компенсаторный характер, способствуя увеличению отдачи кислорода в ишемизированные ткани [Зинчук В. В., Ходосовский М. Н., 2006]. В конце реперфузии у животных 1-й группы правосторонний сдвиг КДО сохранялся на фоне прогрессирующего ацидоза, что могло усиливать дисбаланс между доставкой кислорода в постишемическом периоде и способностью тканей к его утилизации.

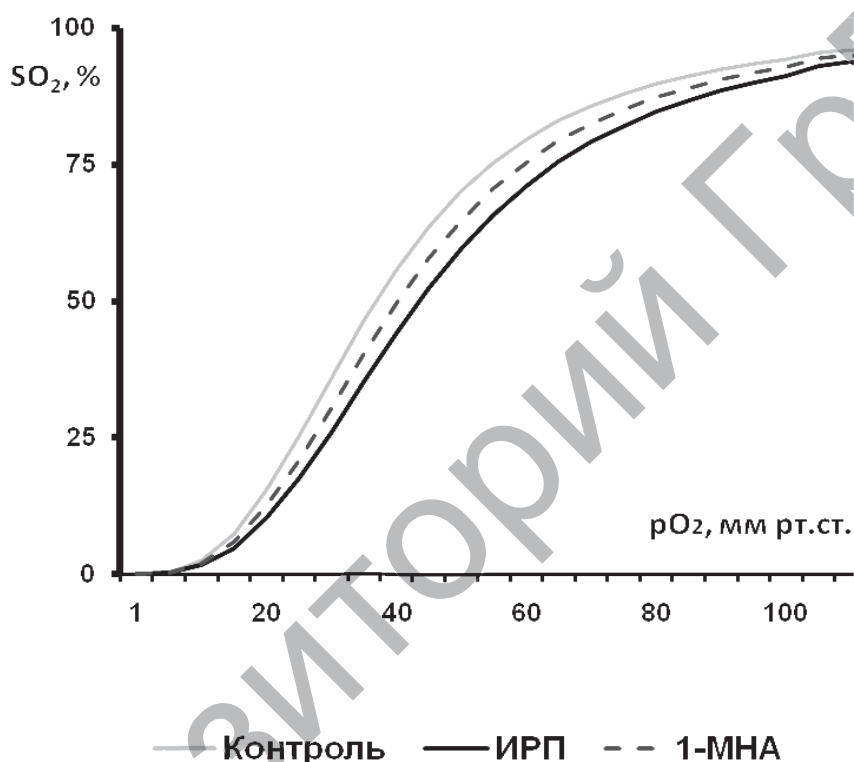


Рисунок 14. – Кривые диссоциации оксигемоглобина у крыс при ишемии-реперфузии печени в условиях инфузии N₁-метилникотинамида, рассчитанные по показателю $p50_{\text{реал}}$

Данные изменения СГК, вероятно, были обусловлены преимущественно за счет эффекта Бора, так как показатели MetHb и COHb на протяжении экспериментов существенно не изменялись. Парадоксально, но восстановление кровотока в печени не способствовало улучшению параметров КТФ крови у крыс, что согласуется с полученными ранее данными на схожей модели экспериментов у кроликов [Зинчук В. В. и др., 2002]. Вместе с тем

установлено, что в условиях введения 1-МНА в конце реперфузии КДО сдвигается влево (судя по показателям $p50_{\text{реал}}$). По-видимому, данный эффект мог в большой степени быть обусловлен меньшими нарушениями кислотно-основного состояния крови у животных, получавших 1-МНА, и как следствие – снижением эффекта Бора на СГК. Нельзя исключить, что 1-МНА мог стимулировать выработку монооксида азота в печени, что может существенно улучшить прооксидантно-антиоксидантное состояние органа в постишемическом периоде, а также за счет образования S-нитрозогемоглобина увеличить СГК и сместить КДО влево [Fago A. et al., 2013].

Повышение СГК в конце постишемического периода у животных 2-й группы по-сравнению с крысами 1-й группы может быть одним из факторов, определяющих улучшение прооксидантно-антиоксидантного состояния при ишемии-реперфузии печени у крыс в условиях инфузии 1-МНА, судя по изменению ДК, ОШ, каталазы, токоферола и ретинола в крови и печени у животных 2-й группы. Так, за счет более высокого СГК крови и уменьшения отдачи O_2 в ткани в реперфузионном периоде возможно ограничение участия кислорода в свободнорадикальных процессах. Известно, что избыточная активация процессов ПОЛ может быть следствием изменения соотношения доноров и акцепторов электронов в тканях, возникающего при нарушении их кислородного обеспечения [Биленко М. В., 1989]. Возможно, 1-МНА в реперфузионном периоде мог оказать положительное влияние на работу митохондрий, подавляя активность восстановленных переносчиков NADH и NADPH и улучшая процессы утилизации кислорода [Бучаченко А. Л. и др., 2004], что в конечном счете выразилось в меньшей степени нарушений показателей кислотно-основного состояния у животных 2-й группы. Кроме того, 1-МНА мог способствовать активации синтеза простациклина, который, обладая значительными вазодилататорными свойствами, оказывал положительное влияние на процессы микроциркуляции в постишемическом периоде [Chlopicki S. et al., 2007]. Таким образом, показано, что 1-МНА улучшает прооксидантно-антиоксидантное, кислотно-основное состояние крови, повышает СГК, снижает активность АлАТ и АсАТ в реперфузионном периоде. Повышение СГК в конце постишемического периода при введении 1-МНА может быть одним из механизмов протективно-

го действия препарата на печень при ишемии-реперфузии. Однако механизм защитного влияния 1-МНА при ишемии-реперфузии печени нуждался в дальнейших исследованиях.

4.2 Роль газотрансммиттеров в механизме протективного влияния 1-метилникотинамида на печень при синдроме ишемии-реперфузии

С целью изучения механизма протективного действия 1-МНА при ИРП исследовали его эффект на прооксидантно-антиоксидантный баланс, КТФ крови и функциональное состояние печени в условиях ингибирования NO-синтазной функции. Проводили оценку содержания в крови и гомогенате печени показателей прооксидантно-антиоксидантного состояния (диеновых конъюгатов, оснований Шиффа, активности каталазы, α -токоферола, ретинола), а также оценена активность маркерных ферментов печени (аланин- и аспартатаминотрансфераз, АлАТ и АсАТ) у 8 крыс-самцов при ишемии-реперфузии печени в условиях введения метилникотинамида (100 мг/кг) и L-NAME (Sigma, 5 мг/кг).

Установлено, что у крыс, которым назначали 1-МНА на фоне ингибирования NO-синтазной функции организма, положительный эффект препарата на прооксидантно-антиоксидантное и функциональное состояние печени сохранялся (табл. 2, приложение). Так, на 120-й минуте реперфузии в смешанной венозной крови содержание ДК снижалось по-отношению к животным 1-й группы на 43,7% ($p<0,05$), а флюоресценция продуктов со свойствами оснований Шиффа – на 71,9% ($p<0,05$) (табл. 2, приложение). Те же параметры ПОЛ были исследованы в образцах печени, где их содержание к концу реперфузионного периода также возрастало, однако оставалось ниже, чем у животных, которым не давали перед ишемией-реперфузией 1-МНА (рис. 15).

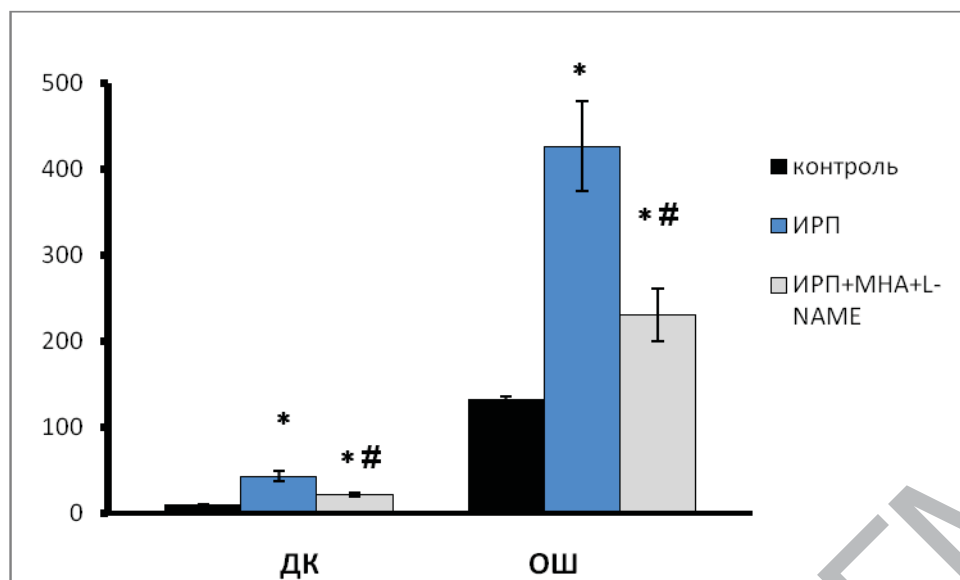


Рисунок 15. – Содержание продуктов ПОЛ в печени опытных крыс (ЕД/г)

Установлено также, что у крыс, которым давали 1-МНА на фоне ингибирования NO-синтазной функции организма, на протяжении ишемии-реперфузии печени в крови содержание ряда антиоксидантов снижалось в меньшей степени, чем у животных без 1-МНА. Так, уровень α -токоферола в плазме смешанной венозной крови к концу реперфузионного периода понизился на 12,5% ($p < 0,05$), ретинола – на 17,1% ($p < 0,05$). Активность каталазы эритроцитов в конце реперфузии, в отличие от животных без 1-МНА, повышалась, и была выше по-отношению к исходному уровню на 70,7% ($p < 0,05$). Содержание α -токоферола и активность каталазы в тканях печени на 120-й минуте реперфузии было выше, чем у животных, которым 1-МНА не давали (рис. 16).

Полученные данные свидетельствуют, что у крыс, получавших 1-МНА на фоне ингибирования NO-синтазной функции организма при ишемии-реперфузии печени, положительный эффект препарата на прооксидантно-антиоксидантное и функциональное состояние органа сохраняется, что имеет важное значение в понимании исследуемого механизма протективного действия. По-видимому, протективный эффект 1-МНА при ИРП не был опосредован NO-зависимыми механизмами, а связан с другими свойствами соединения.

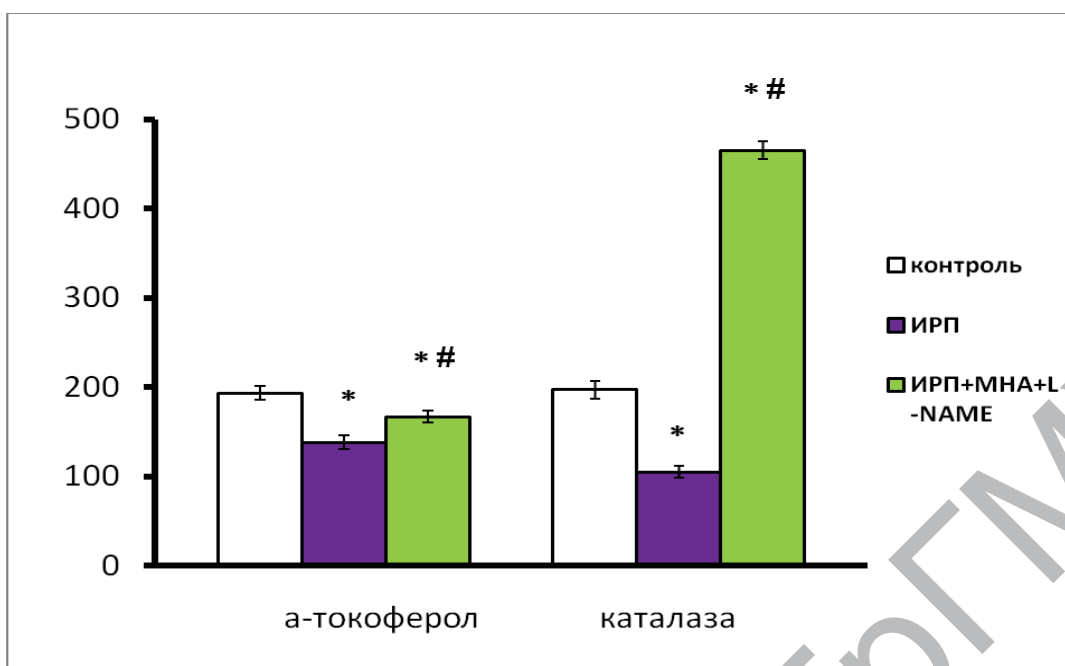


Рисунок 16. – Содержание α -токоферола (нмоль/г) и активность каталазы (ммоль H_2O_2 *мин/г белка) в печени экспериментальных животных

Ранее сообщалось, что 1-МНА может влиять на сосудистый тонус через активацию синтеза простациклина [Chlopicki S. et al., 2007]. С целью изучения роли простациклиновых рецепторов в механизме протективного действия 1-МНА при ИРП на крысах выполнена серия экспериментов ($n=8$) с использованием селективного ингибитора данных рецепторов RO3244794 (5 мг/кг, в/б), который давали за 15 мин. до ишемии печени [Bley K. R. et al., 2006].

Установлено, что у крыс, которым назначали 1-МНА в сочетании с RO3244794, наблюдается повышение активности процессов ПОЛ по отношению к животным 2-й группы (табл. 3, приложение). Так, на 120-й минуте реперфузии в смешанной венозной крови содержание ДК повысилось по отношению к соответствующему периоду во 2-й группе в 3,1 раза ($p<0,05$), а флуоресценция продуктов со свойствами оснований Шиффа возросла в 4,3 раза ($p<0,05$). Те же параметры ПОЛ были исследованы в образцах печени, где их содержание к концу реперфузионного периода также возрастало: ДК – в 2,7 раза ($p<0,05$), ОШ – в 2,6 раза ($p<0,05$) по отношению к крысам 2-й группы, соответственно, (рис. 17).

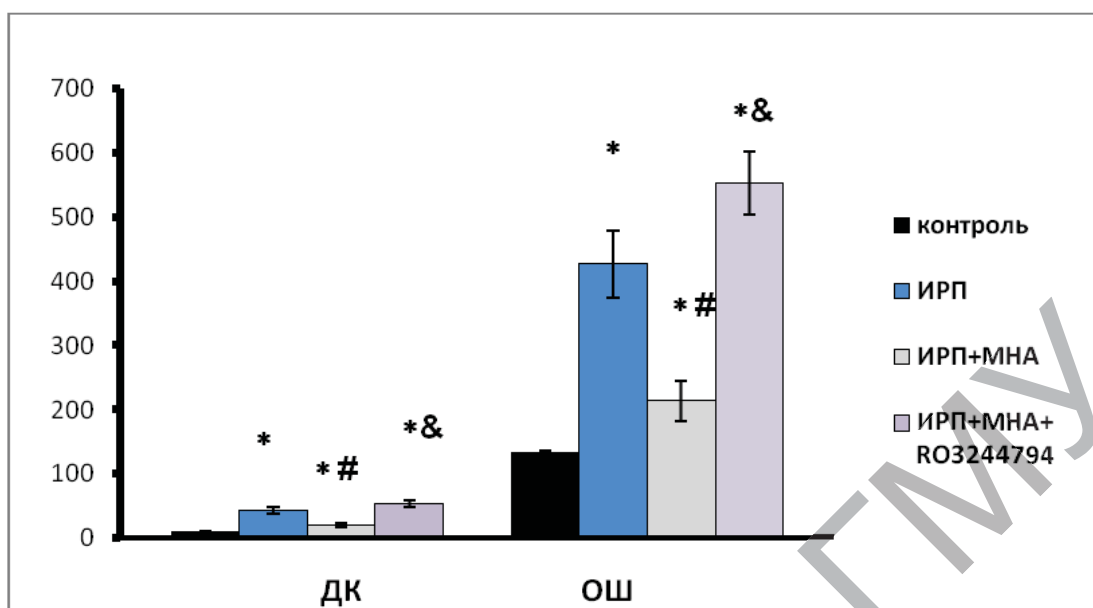


Рисунок 17. – Содержание продуктов ПОЛ в печени опытных крыс (ЕД/г)

Выявлено также, что у крыс, которым давали 1-МНА в сочетании с RO3244794, на протяжении ИРП в крови содержание ряда антиоксидантов снижалось (табл. 3, приложение). Так, уровень α -токоферола в плазме смешанной венозной крови к концу реперфузионного периода понизился на 7,5% ($p < 0,05$), ретинола – на 11,8% ($p < 0,05$) по отношению к соответствующему периоду во 2-й группе. Активность каталазы эритроцитов в конце реперфузии по-отношению к исходному уровню падала на 38,4% ($p < 0,05$). Содержание α -токоферола и ретинола в тканях печени на 120-й минуте реперфузии было ниже исходного на 25,0 ($p < 0,05$) и 46,2% ($p < 0,05$), соответственно (рис. 18).

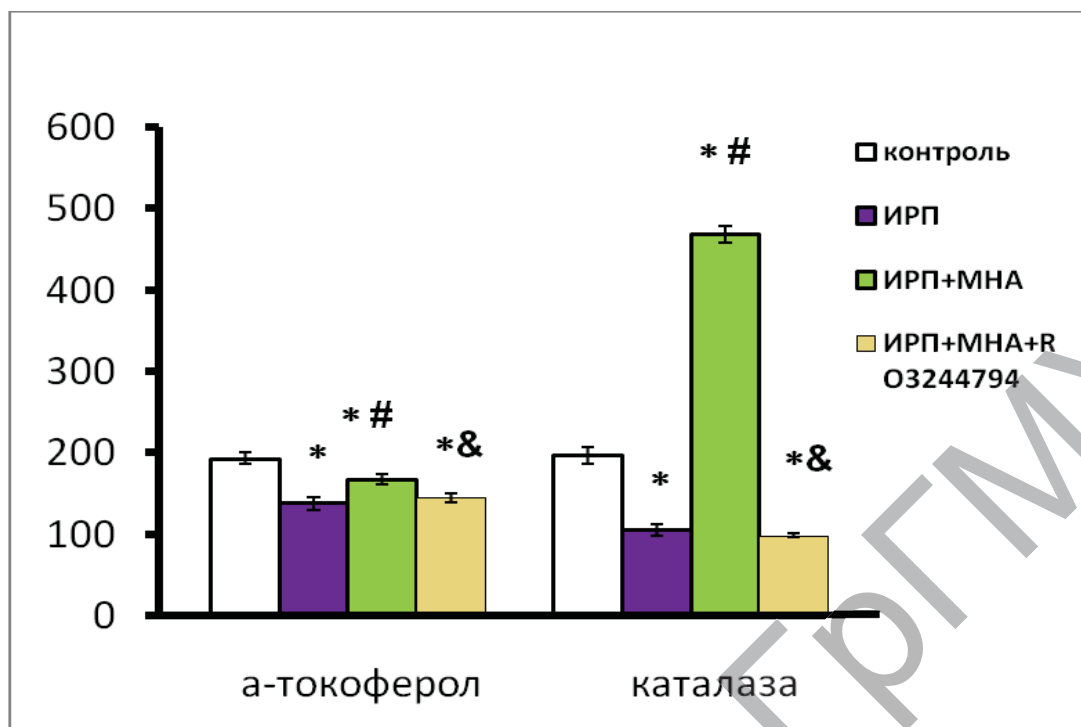


Рисунок 18. – Содержание α -токоферола (нмоль/г) и активность каталазы (ммоль H_2O_2 *мин/г белка) в печени экспериментальных животных

Полученные данные свидетельствуют, что у крыс, получавших 1-МНА на фоне ингибирования простаглицлиновых рецепторов, препарат не оказывает протективного действия при ИРП, как это наблюдалось при даче его отдельно во 2-й группе животных. По-видимому, простаглицлиновые рецепторы играют важную роль в механизме реализации протективного эффекта 1-МНА на печень, что не позволяет препарату оказывать защитное действие на орган при синдроме ишемии-реперфузии в условиях их ингибирования.

Поскольку синтез простаглицлина циклооксигеназой-2 может регулироваться сероводородом [Li Y. et al., 2014], дополнительно изучили вклад данного газотрансммиттера в реализацию защитного эффекта 1-МНА при ИРП у крыс. Для оценки вклада сероводорода в механизм протективного действия 1-МНА при ИРП опытным крысам (n=8) введение 1-метилниотинамида комбинировали с ингибитором синтеза сероводорода – Dl-пропаргилглицином (ПАГ, Sigma, 50 мг/кг, 60 мин. до ИРП, в/б) [Tan G. et al., 2011]. Содержание сероводорода в плазме крови определяли спектрофотометрическим методом (см. гл. 3). Из-

менение параметров прооксидантно-антиоксидантного состояния при совместной инфузии 1-МНА и ПАГ представлены в табл. 4 (см. приложение).

Установлено, что протективный эффект 1-МНА на фоне ингибирования эндогенной продукции сероводорода при ИРП отсутствует. Так, на 120-й минуте реперфузии в смешанной венозной крови уровень ДК по-отношению к соответствующему периоду во 2-й группе повысился в 3,1 раза ($p < 0,05$), а флюоресценция продуктов со свойствами оснований Шиффа возросла в 3,7 раза ($p < 0,05$). Те же параметры ПОЛ были исследованы в образцах печени, где их содержание к концу реперфузионного периода также возрастало: ДК – в 2,1 раза ($p < 0,05$), ОШ – в 2,0 раза ($p < 0,05$) по отношению к крысам 2-й группы, соответственно (рис. 19).

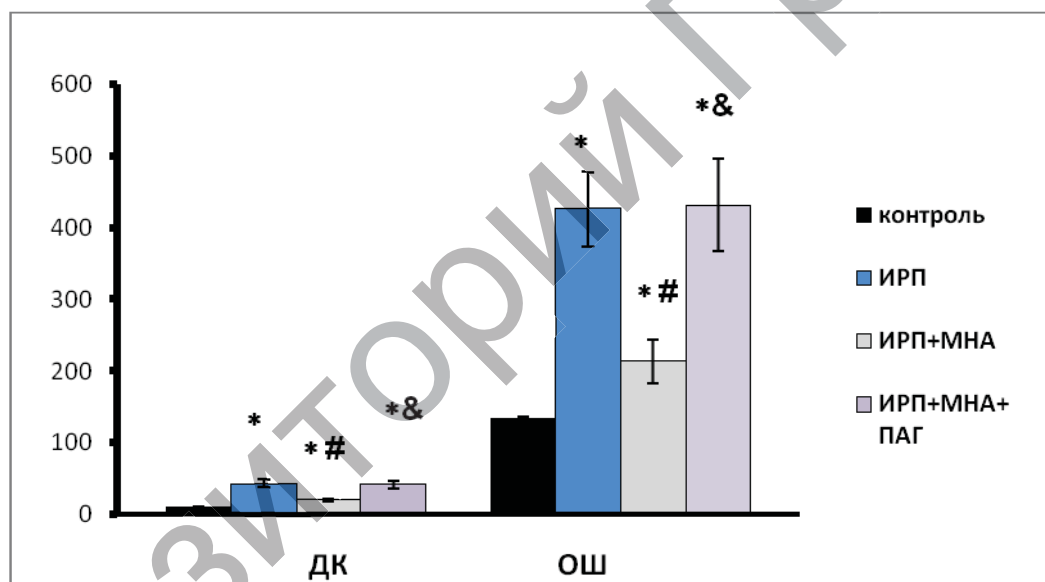


Рисунок 19. – Содержание продуктов ПОЛ в печени опытных крыс (ЕД/г)

Выявлено, что у крыс, которым давали 1-МНА в сочетании с ПАГ, на протяжении ИРП в крови содержание исследуемых антиоксидантов снижалось. Так, уровень α -токоферола в плазме смешанной венозной крови к концу реперфузионного периода понизился на 8,0% ($p < 0,05$), ретинола – на 15,2% ($p < 0,05$) по отношению к соответствующему периоду во 2-й группе (табл. 4, приложение). Активность каталазы эритроцитов в конце реперфузии по-отношению к исходному уровню падала на 46,8% ($p < 0,05$). Содержание α -токоферола, ретинола и активность каталазы в тканях печени на 120-й минуте реперфузии было ниже,

чем во 2-й группе, на 16,6% ($p<0,05$), 19,9% ($p<0,05$) и 76,4% ($p<0,001$), соответственно (рис. 20).

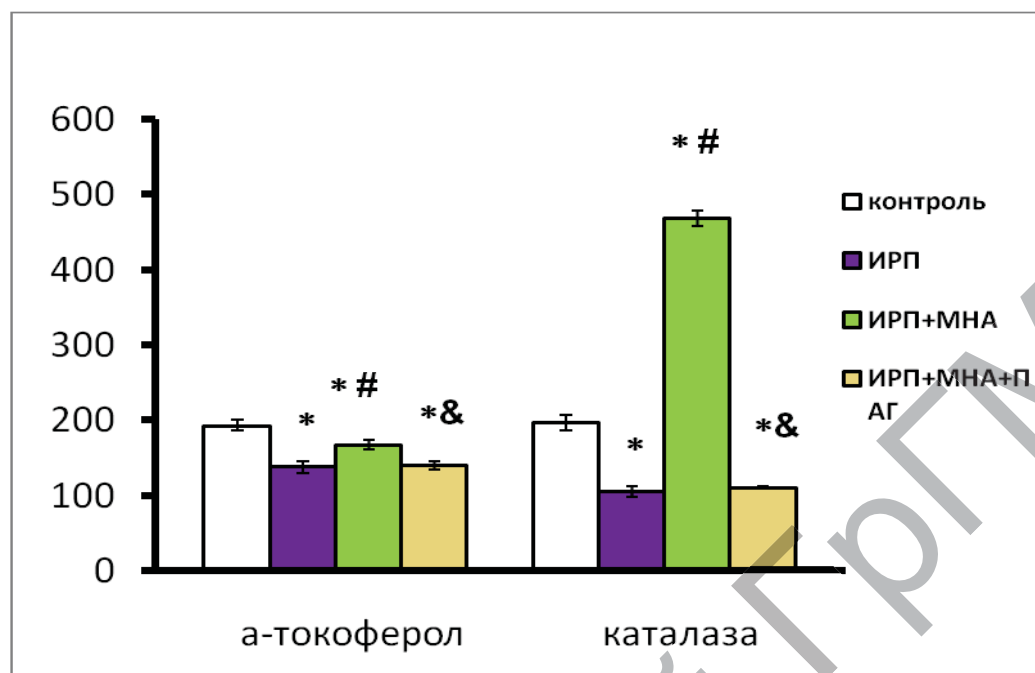


Рисунок 20. – Содержание α-токоферола (нмоль/г) и активность каталазы (ммоль Н₂О₂*мин/г белка) в печени экспериментальных животных

Изменения основных показателей КТФ смешанной венозной крови на 120-й минуте реперфузии печени у экспериментальных животных отражены в табл. 19. Ингибирование NO-синтазной функции при использовании 1-МНА для коррекции реперфузионных повреждений (3-я группа) не приводило к снижению показателей кислотно-основного состояния крови: рН, HCO_3^- , TCO_2 , АВЕ и др. по отношению к крысам 2-й группы, указывая на независимость эффекта 1-МНА от метаболического влияния монооксид азота.

Таблица 19. – Изменение параметров кислородтранспортной функции крови на 120-й минуте реперфузии печени у опытных крыс ($M \pm m$)

Показатель	2-я группа (1-МНА)	3-я группа (1-МНА+ L-NAME)	4-я группа (1-МНА+ RO3244794)	5-я группа (1-МНА+ ПАГ)
n	8	8	8	8
p50 _{реал} , мм рт. ст.	40,2±1,0	38,57±1,7	43,76±1,1*	45,34±0,96*
p50 _{станд} , мм рт. ст.	34,2±1,2	31,57±2,5	32,12±2,01	37,91±0,81*
Hb, г/л	126,6±4,6	130,9±4,0	136,8±6,95	145,1±8,65
MetHb, г/л	0,41±0,07	0,65±0,32	0,44±0,16	1,29±0,2*
COHb, г/л	0,31±0,14	0	0,79±0,79	0
pO ₂ , мм рт. ст.	35,8±3,1	28,38±2,86	33,38±2,93	40,0±2,69
pH, ед.	7,25±0,03	7,21±0,06	7,12±0,04*	7,216±0,035
pCO ₂ , мм рт. ст.	73,3±4,1	71,7±7,25	82,96±3,99	96,41±7,7*
HCO ₃ ⁻ , ммоль/л	29,9±1,5	28,4±1,74	26,8±2,3	38,2±0,61*
TCO ₂ , ммоль/л	32,2±1,5	30,6±1,64	30,14±2,22	41,53±0,45*
ABE, ммоль/л	0,98±1,85	-0,65±2,68	-3,2±2,74	7,63±0,61*
SBE, ммоль/л	1,96±1,91	0,24±2,63	-1,95±2,84	10,6±0,67*
SBC, ммоль/л	24,2±1,47	22,6±2,2	20,61±2,22	28,19±1,19

Примечание – * – достоверные изменения по отношению ко 2-й группе ($p < 0,05$)

Данный факт согласуется с динамикой изменений прооксидантно-антиоксидантного состояния у крыс 3-й группы (табл. 2, приложение). В 3-й группе не изменялось также СГК венозной

крови по отношению ко 2-й группе, судя по уровням $p50_{\text{реал}}$ и $p50_{\text{станд}}$ (табл. 19). У животных, которым ингибировали простациклиновые рецепторы с помощью RO3244794 (4-я группа), в конце реперфузионного периода наблюдалось увеличение показателя $p50_{\text{реал}}$ на 8,8% ($p < 0,05$) по отношению к соответствующему периоду во 2-й группе. На 120-й минуте реперфузии у животных 4-й группы выражено по отношению ко 2-й группе понижался также показатель pH, тогда как HCO_3^- , TCO_2 , ABE, $p\text{CO}_2$ не изменялись (табл. 23). В 5-й группе животных 1-МНА также не оказывал протективного эффекта при ИРП. Так, в конце реперфузии показатель $p\text{CO}_2$ вырос на 31,5% ($p < 0,05$) по отношению ко 2-й группе. В конце реперфузионного периода у крыс 5-й группы повышались показатели $p50_{\text{реал}}$ и $p50_{\text{станд}}$ на 12,7% ($p < 0,05$) и 10,4% ($p < 0,05$) по отношению к животным 2-й группы, соответственно, что свидетельствует снижении SGK крови и сдвиге КДО вправо при использовании 1-МНА с ПАГ (рис. 21).

Таким образом, проведенные исследования показали, что 1-МНА оказывает протективный эффект при ИРП, который выражается в улучшении кислородсвязывающих свойств крови, параметров кислотно-основного состояния, снижении концентрации продуктов ПОЛ, повышении уровня ряда антиоксидантов и уменьшении активности маркеров повреждения печени – АлАТ и АсАТ. Изучение механизма данного эффекта 1-МНА при ИРП выявило зависимость между использованием препарата, эндогенной продукцией сероводорода и активностью простациклиновых рецепторов. По-видимому, механизм протективного действия 1-МНА связан с активацией эндогенной продукции H_2S и повышением активности циклооксигеназы-2 с последующим увеличением продукции простациклина, который наряду с сероводородом восстанавливает баланс между вазоконстрикторами и вазодилататорами при реперфузии печени. Данные выводы согласуются с полученными нами результатами о влиянии донаторов монооксида азота при ИРП, изложенными в гл. 2.

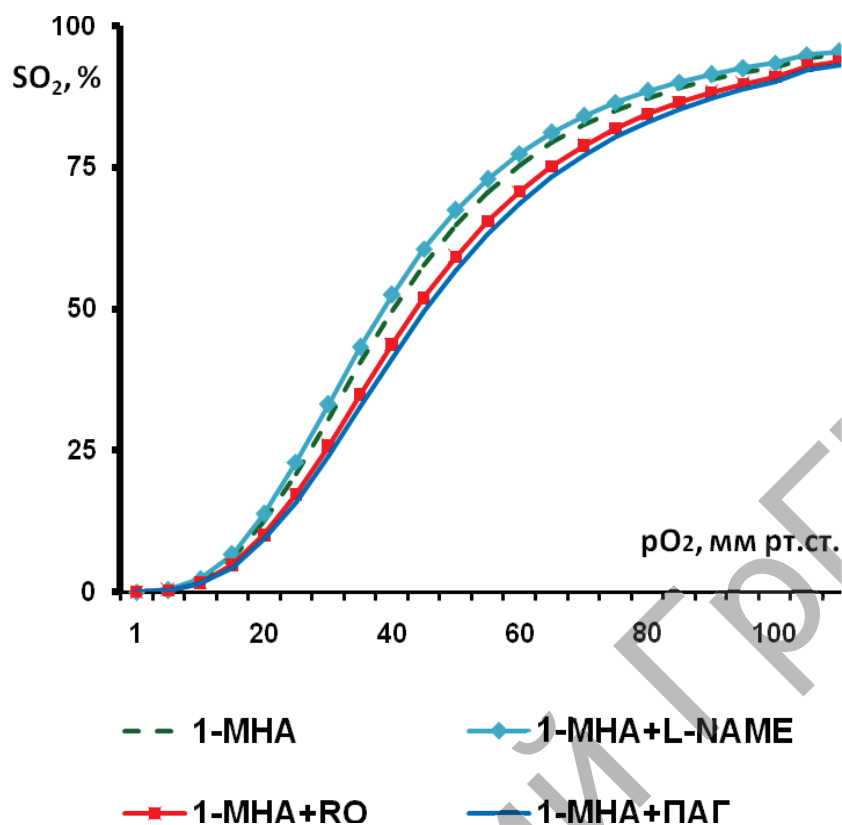


Рисунок 21. – Кривые диссоциации оксигемоглобина у крыс на 120-й минуте реперфузии печени в условиях инфузии 1-метилникотинамида (1-МНА), совместной инфузии 1-МНА с L-NAME, RO3244794 или ПАГ, рассчитанные по показателю $p50_{\text{реал}}$

КОРРЕКЦИЯ РЕПЕРФУЗИОННЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ ПЕЧЕНИ МЕЛАТОНИНОМ И ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМА ЕГО ПРОТЕКТИВНОГО ДЕЙСТВИЯ

Известно, что мелатонин обладает значительными прямыми и непрямыми антиоксидантными свойствами, способен влиять на сосудистый тонус, уменьшать зону некроза и инфильтрацию лейкоцитами паренхимы печени при разных видах ее повреждения, в т.ч. при ишемии-реперфузии [Mathes A. M., 2010]. Ранее сообщалось об успешном применении мелатонина для защиты от окислительных повреждений при моделировании токсического поражения печени четыреххлористым углеродом [Sigala F. et al., 2006; Shaker M. E. et al., 2009]. Поскольку нарушения прооксидантно-антиоксидантного баланса при токсическом гепатите имеют схожие механизмы с таковыми при развитии реперфузионных повреждений печени, нами изучено влияние мелатонина на активность свободнорадикальных процессов во взаимосвязи с параметрами КТФ крови при синдроме ИРП [Ходосовский М. Н., Зинчук В. В., 2014].

5.1 Влияние разных доз мелатонина на активность свободно-радикальных процессов и систему транспорта кислорода при ишемии-реперфузии печени

Для изучения вопроса эффективности мелатонина для коррекции реперфузионных повреждений печени выполнены опыты на взрослых белых крысах-самцах, массой 280-360 г, выдержанных в стандартных условиях вивария при 12-часовом световом режиме. 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 и тканей печени для оценки параметров КТФ, прооксидантно-антиоксидантного и функционального состояния печени. Эвтаназию животных проводили путем внутривенного введения тиопентала натрия (100 мг/кг). Все оперативные вмешательства осуществляли в условиях адекват-

ной анальгезии в соответствии с нормами, принятыми этической комиссией по гуманному обращению с животными Гродненского государственного медицинского университета.

Животных разделили на 5 групп: 1-я группа ($n=9$) – контрольная, во 2-й группе ($n=9$) моделировали ИРП, в 3-й ($n=7$), 4-й ($n=9$) и 5-й ($n=9$) группах за 10 минут перед ИРП интраперитонеально вводили мелатонин (Sigma) в дозе 1, 2 и 10 мг/кг, соответственно. Проводили оценку параметров КТФ крови, прооксидантно-антиоксидантного и функционального состояния печени, как указано в главе 3. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием t -критерия Стьюдента или U -теста в зависимости от нормальности распределения выборок. Достоверными считали различия при $p<0,05$.

Изменения параметров КТФ крови, прооксидантно-антиоксидантного состояния и трансаминаз крови при использовании разных доз мелатонина представлены в таблицах 5 и 6 (см. приложение). Установлено, что моделирование ИРП приводило к росту ДК и ОШ в крови у крыс 2-й группы по отношению к контрольным животным в 4,2 ($p<0,001$) и в 8,7 ($p<0,001$) раза, соответственно (табл. 5, приложение). Накопление продуктов ПОЛ здесь указывает на усиление свободнорадикальных процессов ПОЛ в организме животных 2-й группы, что может быть следствием недостаточности механизмов антиоксидантной защиты, т.е. развития окислительного стресса. Введение мелатонина снизило по отношению к животным 2-й группы уровень ДК на 52,9% ($p<0,05$) только у крыс 5-й группы, тогда как понижение ДК в 3-й и 4-й группах не было статистически значимым и составило всего 13,2% ($p=0,256$) и 19,7% ($p=0,081$), соответственно. Концентрация ОШ в плазме смешанной венозной крови по отношению к животным 2-й группы снижалась у животных 4-й и 5-й групп на 32,3% ($p<0,05$) и 53,7% ($p<0,05$), соответственно, тогда как у животных 3-й группы оставалась высокой.

Выявлено, что у животных 2-й группы понижалась концентрация α -токоферола и ретинола в крови на 14,4% ($p<0,001$) и 30,4% ($p<0,001$), соответственно. Активность каталазы эритроцитов в конце реперфузионного периода у крыс 2-й группы падала на 57,5% ($p<0,001$). Схожие изменения исследуемых параметров прооксидантно-антиоксидантного баланса наблюдали в печени в конце реперфузионного периода (рис. 22). Введение опытным

крысам мелатонина в дозе 1 и 2 мг/кг перед ИРП существенно не влияло на уровень факторов антиоксидантной защиты как в крови, так и в печени (табл. 5, приложение). Вместе с тем при использовании дозы мелатонина 10 мг/кг выявлены существенные улучшения прооксидантно-антиоксидантного состояния в конце реперфузии печени. Так, уровень α -токоферола и ретинола в 5-й группе в плазме крови повышался по отношению к животным 2-й группы на 12,1% ($p<0,05$) и 29,7% ($p<0,05$), соответственно. Активность каталазы в 5-й группе животных повышалась (табл. 5, приложение). Улучшение параметров КТФ крови наблюдали при использовании всех доз мелатонина (табл. 6, приложение).

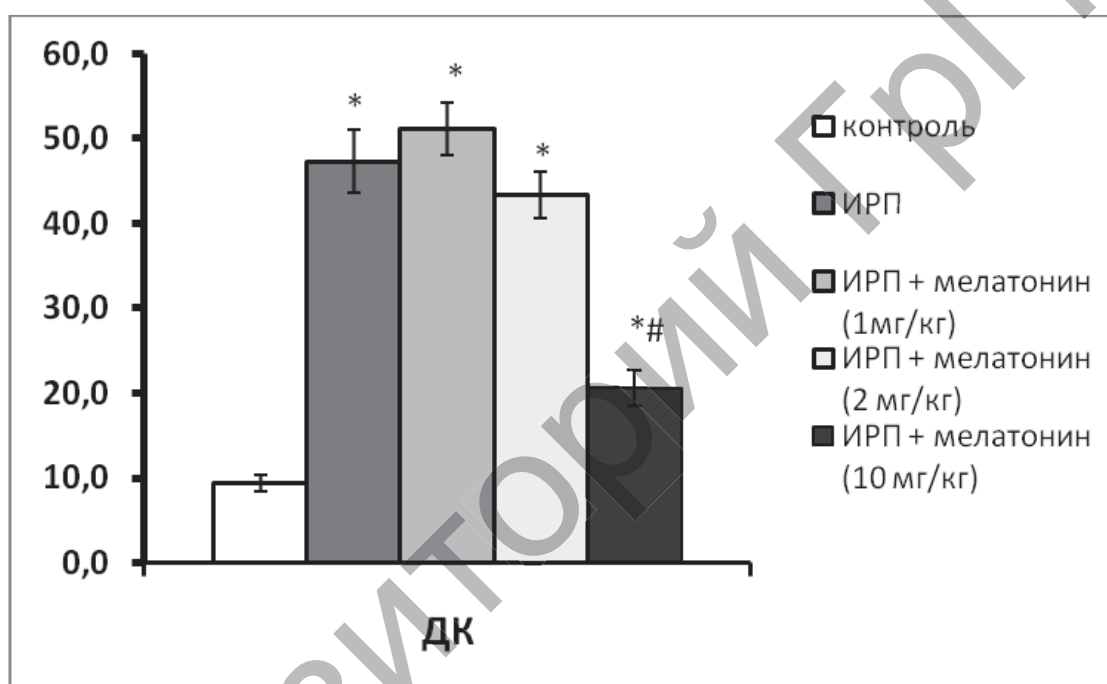


Рисунок 22. – Влияние разных доз мелатонина на уровень ДК в гомогенате печени опытных крыс (ЕД/г), где * – достоверное различие по отношению к контролю, $p<0,05$; # – достоверные различия по отношению ко 2-й группе (ИРП), $p<0,05$

Результаты исследования показывают, что у крыс активность процессов ПОЛ резко повышается при моделировании синдрома ИРП. Избыточная активация процессов ПОЛ может быть следствием изменения соотношения доноров и акцепторов электронов в тканях, возникающего при нарушении их кислородного обеспечения. Восстановление кровотока при реперфузии может усиливать «утечку» электронов в митохондриях ишемизированных тканей с последующим развитием окислительного стресса, свободнорадикальным повреждением клеточных мем-

бран, нарушением функции и даже гибели гепатоцитов механизмами некроза или апоптоза [Зинчук В. В., Ходосовский М. Н., 2006]. Результаты исследования показывают, что более высокие дозы мелатонина снижают содержание продуктов ПОЛ в крови у крыс при моделировании синдрома ИРП. Показано, что мелатонин может повышать активность ферментов антиоксидантной системы при повреждении печени разного генеза [Tomás-Zapico C., Coto-Montes A., 2005]. Возможно, снижение ДК и ОШ в 5-й группе было связано с улучшением механизмов антиоксидантной защиты. С другой стороны, мелатонин способен непосредственно устранять активные формы кислорода, что может уменьшать активность свободнорадикальных процессов ПОЛ [Guenther A. L. et al., 2005].

Таким образом, мелатонин оказывает защитный дозозависимый эффект, снижая активность процессов ПОЛ и улучшая кислородсвязывающие свойства крови при моделировании синдрома ИРП у крыс. Данный эффект опосредован как антиоксидантными свойствами мелатонина, так и его способностью улучшать параметры КТФ крови. Доза мелатонина в 10 мг/кг имеет наиболее выраженные протективные свойства, поэтому ее использовали в дальнейших исследованиях.

5.2 Роль монооксид азота в механизме протективного действия мелатонина при реперфузии печени

Для изучения роли NO в механизме протективного эффекта мелатонина при ИРП выполнены опыты на взрослых белых крысах-самцах, массой 280-360 г, выдержанных в стандартных условиях вивария при 12-часовом световом режиме. Под комбинированным наркозом (тиопентал натрия – 30 мг/кг, в/б, калипсол – 100 мг/кг, в/м) ишемии 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 и тканей печени для оценки параметров КТФ, прооксидантно-антиоксидантного и функционального состояния печени. Эвтаназию животных проводили путем внутривенного введения тиопентала натрия (100 мг/кг). Все оперативные вмешательства осуществляли в условиях адекватной аналгезии в соответствии с

нормами, принятыми этической комиссией по гуманному обращению с животными Гродненского государственного медицинского университета.

Животных разделили на 4 группы: 1-я (n=9) группа – контроль; во 2-й группе (n=8) моделировали ИРП; животным в 3-й (n=9) группе за 10 минут перед ИРП вводили мелатонин (внутрибрюшинно, 10 мг/кг, Sigma); в 4-й группе (n=9) эксперименты проводили как в 3-й группе, но за 5 минут до применения мелатонина крысам вводили метиловый эфир N_ω-нитро-L-аргинина (L-NAME, 10 мг/кг, “Sigma”, внутрибрюшинно). Функциональное состояние печени оценивали по активности АЛАТ и АсАТ кинетическим методом с помощью стандартного набора реактивов фирмы “Cormay” (Польша). Определение суммарного количества нитритов и нитратов (NO_x) в плазме крови для оценки общего синтеза NO в организме животных проводили спектрофотометрическим методом с помощью реактива Грисса [Bryan N. S., Grisham M. B., 2007].

Оценивали показатели КТФ крови: p50_{реал}, pO₂, pCO₂, pH, HCO₃⁻, TCO₂, ABE, SBE, SBC, SGK и КДО; показатели прооксидантно-антиоксидантного состояния: концентрацию ДК, ОШ, α-токоферола, ретинола и активность каталазы как описано ранее в главе 2. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием t-критерия Стьюдента или U-теста в зависимости от нормальности распределения выборок. Достоверными считали различия при p<0,05.

Изменения основных показателей КТФ крови у животных отражены в табл. 7 (приложение). В конце реперфузии в крови у крыс 2-й группы наблюдали уменьшение показателей pH, ABE и SBC на 1,7% (p<0,01), 399,3% (p<0,05) и 15,8% (p<0,05), соответственно, отражающее развитие метаболического ацидоза. В конце постишемического периода у крыс 2-й группы в смешанной венозной крови наблюдалось увеличение p50_{реал} и p50_{станд} на 28,6% (p<0,001) и 10,1% (p<0,05), соответственно, что свидетельствует о сдвиге КДО вправо (рис. 23). Моделирование ИРП у крыс 2-й группы приводило к росту ДК и ОШ в плазме крови в конце реперфузии по отношению к контрольным животным в 4,2 (p<0,001) и в 8,7 (p<0,001) раза, соответственно (табл. 8, приложение). При этом у животных 2-й группы понижалась концентрация α-токоферола и ретинола в крови на 14,4% (p<0,001) и

30,4% ($p < 0,001$), соответственно. Активность каталазы эритроцитов в конце реперфузионного периода у крыс 2-й группы падала на 57,5% ($p < 0,001$). Схожие изменения исследуемых параметров прооксидантно-антиоксидантного баланса наблюдали в печени в конце реперфузионного периода (табл. 8, приложение).

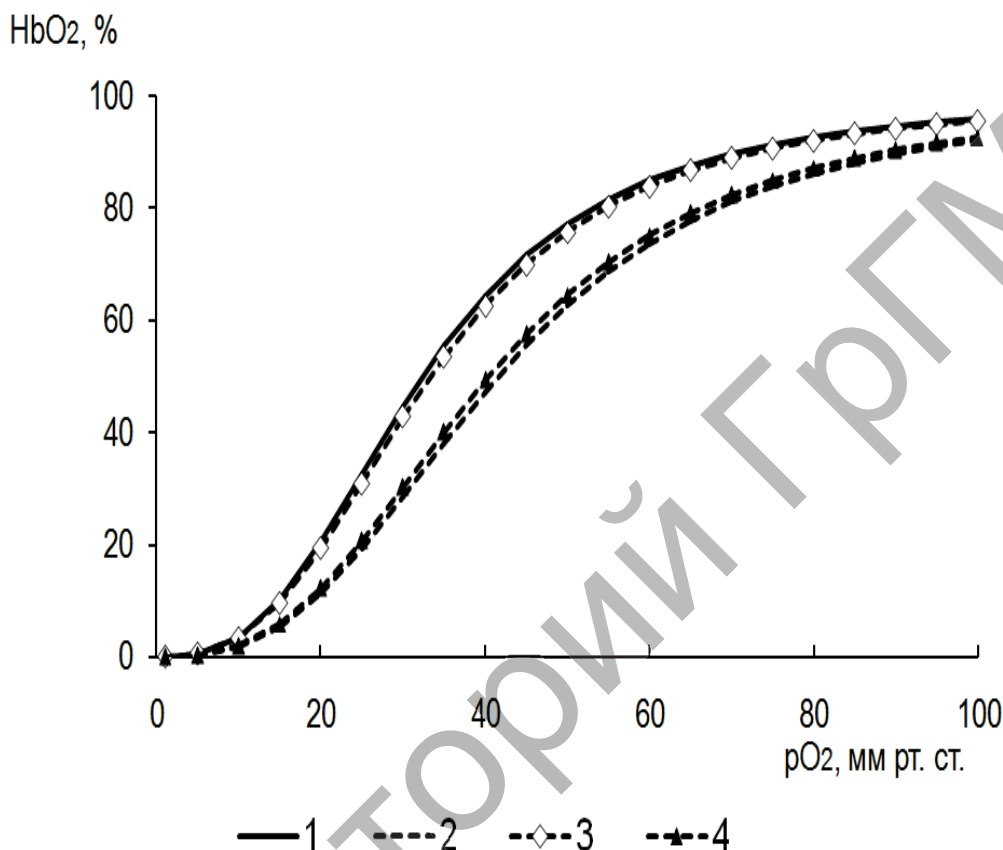
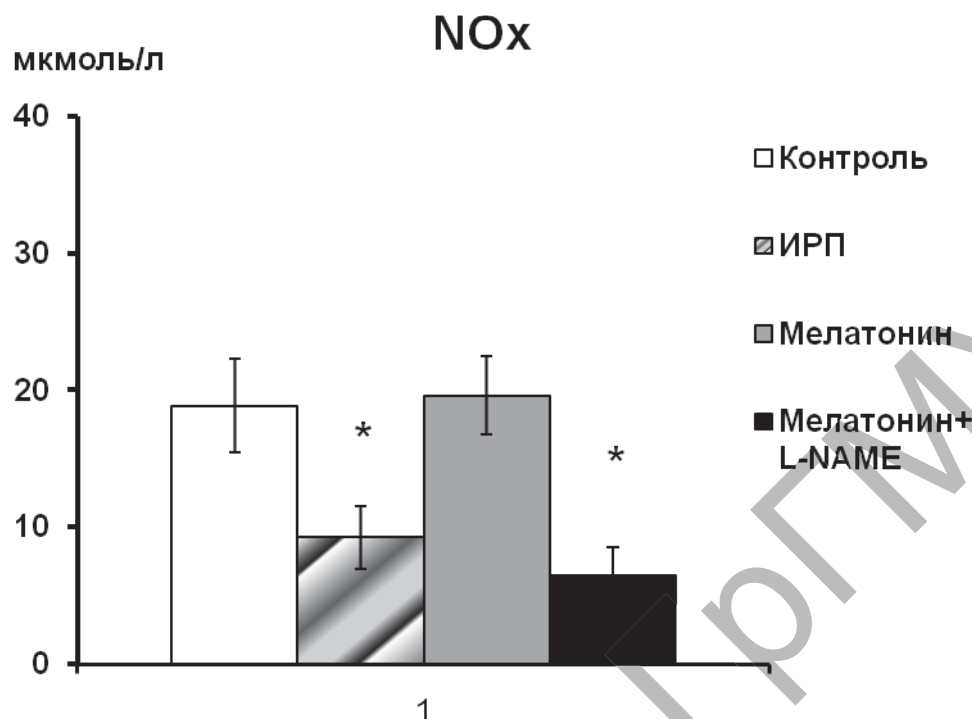


Рисунок 23. – Влияние мелатонина (10 мг/кг, внутривбрюшинно, однократно) на сродство гемоглобина к кислороду у крыс при ишемии-реперфузии печени, где 1 – 1-я группа, 2 – 2-я группа, 3 – 3-я группа, 4 – 4-я группа

Мелатонин (10 мг/кг, внутривбрюшинно, однократно) у животных 3-й группы вызывал улучшение параметров КТФ крови в конце реперфузии (табл. 7, приложение). Так, по отношению к животным 1-й группы здесь не наблюдали изменения показателей pH, HCO₃⁻, TCO₂, ABE, SBE и SBC. Одновременно установлено смещение КДО влево по отношению к животным 2-й группы в конце реперфузии (судя по показателям p50_{реал} и p50_{станд}). Вместе с тем, у крыс 3-й экспериментальной группы наблюдали повышение ДК и ОШ в плазме крови в конце реперфузии по отношению к контролю только в 2,0 ($p < 0,01$) и в 4,0 ($p < 0,01$) раза, соответственно, что было существенно меньше, чем во 2-й груп-

пе (табл. 8, приложение). В печени в конце постишемического периода в 3-й группе содержание ДК и ОШ было выше по отношению к контролю в 2,2 ($p<0,001$) и 2,0 ($p<0,001$) раза, соответственно, однако ниже, чем у крыс 2-й группы. Важно, что у животных 3-й группы в конце ИРП не наблюдалось понижения концентрации α -токоферола и ретинола в крови и в гомогенате печени по отношению к животным 1-й группы. Активность каталазы в конце реперфузионного периода у крыс 3-й группы повышалась в эритроцитах на 51,2% ($p<0,05$), в гепатоцитах – на 142,1% ($p<0,001$).

Ингибирование NO-синтазы у животных 4-й группы в конце ИРП приводило к снижению pH, повышению $p\text{CO}_2$, HCO_3^- , TCO_2 крови по отношению к 3-й экспериментальной группе. Одновременно наблюдалось увеличение показателя $p50_{\text{реал}}$ по отношению к животным 1-й и 3-й групп. Данные изменения КТФ крови сопровождались ростом содержания ДК и ОШ в крови по отношению к контрольным в 2,8 ($p<0,001$) и в 6,5 ($p<0,001$) раза, соответственно. В печени содержание ДК и ОШ увеличилось в 3,5 ($p<0,001$) и 2,7 раза ($p<0,001$), соответственно. Одновременно у крыс 4-й группы отмечено снижение концентрации α -токоферола и ретинола в крови на 12,7% ($p<0,001$) и 29,0% ($p<0,001$), в печени – на 13,5% ($p<0,01$) и на 16,6% ($p<0,001$), соответственно. Активность каталазы в эритроцитах у крыс 4-й группы в конце реперфузионного периода по отношению к контрольным не изменялась, а в печени возрастала на 53,5% ($p<0,05$). Данные изменения параметров прооксидантно-антиоксидантного состояния у животных 4-й группы были ниже, чем у крыс 3-й группы, но оставались выше, чем у животных 2-й группы (табл. 8, приложение). Следует отметить, что у животных 2-й и 4-й экспериментальных групп наблюдалось снижение суммарного содержания NOx в крови по отношению к крысам 1-й и 3-й опытных групп (рис. 24). Во всех опытных группах повышалась активность АлАТ и АсАТ в крови, которая была максимальной во 2-й и минимальной в 3-й группах (табл. 8, приложение).



**Рисунок 24. – Влияние мелатонина 10 мг/кг (внутрибрюшинно, однократно) на суммарное содержание нитритов и нитратов (NOx) в плазме крови у крыс при ишемии-реперфузии печени, где контроль – 1-я группа, ИРП – 2-я группа, мелатонин – 3-я группа, L-NAME – 4-я группа;
* – достоверные различия по отношению к контролю ($p < 0,05$)**

Результаты исследования показали, что у крыс при моделировании синдрома ИРП (2-я группа) развивается смешанный ацидоз, уменьшается СГК крови, резко повышается активность процессов ПОЛ, снижается содержание α -токоферола, ретинола, активность каталазы. Данные изменения свидетельствуют о сдвиге КДО крови вправо, увеличении потока кислорода в ткани в постишемическом периоде, с последующим вовлечением O_2 в свободнорадикальные процессы и нарушении прооксидантно-антиоксидантного состояния печени, т.е. о развитии окислительного стресса. Избыточная активация процессов ПОЛ может быть следствием изменения соотношения доноров и акцепторов электронов в тканях, возникающего при нарушении их кислородного обеспечения. Восстановление потока крови с низким СГК при реперфузии может усиливать данный дисбаланс и «утечку» электронов в митохондриях ишемизированных тканей с последующим свободнорадикальным повреждением клеточных мембран, нарушением функции и даже гибели гепатоцитов [Зинчук В. В.,

Ходосовский М. Н., 2006; Jaeschke H., Woolbright B. L., 2012]. Снижение NOx, установленное у животных 2-й группы, могло быть следствием повреждения эндотелия активными формами кислорода, а также вовлечения NO в свободнорадикальные реакции, результатом которых может быть образование мощного окислителя – пероксинитрита. Известно, что последний способен играть важную роль в повреждении печени при ишемии-реперфузии [Зинчук В. В., Ходосовский М. Н., 2006; Mathes A. M., 2010; Vollmar B., Menger M. D., 2009].

Мелатонин (10 мг/кг, внутрибрюшинно, однократно) при моделировании ИРП (3-я группа) вызывал улучшение параметров КТФ крови, антиоксидантной системы, сдвиг КДО влево, снижение активности процессов ПОЛ по отношению к животным 2-й группы. Установлено, что применение мелатонина способствует повышению активности каталазы в эритроцитах и печени, что согласуется с другими исследованиями, установившими рост активности ферментов антиоксидантной системы под влиянием препарата при повреждении печени токсического генеза [Shaker M. E. et al., 2009]. Снижение активности процессов ПОЛ в 3-й экспериментальной группе могло быть связано с уменьшением потока O₂ и образования его свободных радикалов в тканях печени после ишемии вследствие повышения СГК крови, а также с улучшением работы антиоксидантных ферментов под влиянием мелатонина. С другой стороны, мелатонин способен непосредственно устранять активные формы кислорода, что может уменьшать активность свободнорадикальных процессов [Guenther A. L. et al., 2005; Tan D. X. et al., 2007]. Известно, что мелатонин может прямо взаимодействовать с гидроксильным радикалом, образуя 3-гидроксилмелатонин, который затем выводится с мочой [Tan D. X. et al., 2007]. Кроме того, мелатонин может взаимодействовать с перекисью водорода и другими активными формами кислорода, устраняя последние в так называемом «антиоксидантном каскаде мелатонина» [Mathes A. M., 2010]. Вместе с тем, показана способность мелатонина улучшать процессы микроциркуляции при ИРП через изменение активности конституциональной и индуцибельной NO-синтаз [Park S. W. et al., 2007].

Комбинированное использование мелатонина и L-NAME при ИРП (4-я группа) нарушало параметры КТФ крови, проокси-

дантно-антиоксидантного состояния крови и печени, снижало содержание NOx в крови по сравнению с животными 1-й и 3-й групп. Однако параметры прооксидантно-антиоксидантного и отдельные показатели кислотно-основного состояния оставались здесь выше, чем во 2-й группе опытных животных. Данные изменения указывают на снижение эффектов мелатонина в условиях ингибирования NO-синтазы на КТФ крови и прооксидантно-антиоксидантный баланс при ИРП. По-видимому, антиоксидантные эффекты мелатонина были частично опосредованы его влиянием на NO-синтазную функцию организма. Мелатонин может уменьшать экспрессию индуцибельной и повышать активность конституциональной NO-синтаз, тем самым увеличивая уровень в ткани оксида азота при ИРП [Park S. W. et al., 2007]. Оптимизируя уровни NO, мелатонин может модифицировать кислородсвязывающие свойства крови, препятствует участию избытка оксида азота в формировании токсических продуктов, таких как пероксинитрит, и последующее усиление свободнорадикальных процессов в печени при реперфузии [Зинчук В. В. и др., 2013]. Возможно, совместное применение L-NAME и мелатонина снижает эффект последнего на баланс вазоконстрикторов и вазодилататоров при ИРП у животных 4-й группы, что приводило к ухудшению СГК крови, условий микроциркуляции, ангиоспазму, усилению дисбаланса между донорами и акцепторами электронов в митохондриях и увеличению «утечки» электронов в дыхательной цепи в постишемическом периоде. Вместе с тем частичное сохранение протективных влияний мелатонина на параметры прооксидантно-антиоксидантного баланса при ингибировании данной функции с помощью L-NAME (судя по различиям с животными 2-й группы), по-видимому, обусловлено его прямыми антиокислительными свойствами.

Таким образом, антиокислительный эффект мелатонина при ишемии-реперфузии печени может быть связан с его способностью улучшать параметры КТФ крови, повышать активность антиоксидантных ферментов, а также прямым антиокислительным эффектом этого соединения. NO принимает важное участие в реализации протекторных влияний мелатонина на печень, т.к. ингибирование NO-синтазы снижает гепатопротекторные влияния мелатонина при развитии реперфузионных повреждений.

Глава 6

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМА ПРОТЕКТИВНОГО ДЕЙСТВИЯ ЭРИТРОПОЭТИНА ПРИ ИШЕМИИ-РЕПЕРФУЗИИ ПЕЧЕНИ

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) [Nandra K. K. et al., 2013]. Известно, что гипоксия/ишемия является основным фактором 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 [Alchera E. et al., 2010; Moeini M. et al., 2013; Nandra K. K. et al., 2013]. В последующем выяснено, что рецепторы к ЭПО имеются у нервных клеток, кардиомиоцитов, эпителия легких, эндотелия сосудов и др. Более того, некоторые из тканей способны синтезировать данный гликопротеин [Захаров Ю. М., 2007]. Цитопротективный эффект краткосрочного использования ЭПО связывают со способностью этого гликопротеина ингибировать механизмы апоптоза, подавлять экспрессию провоспалительных цитокинов, процессы ПОЛ, улучшать функцию эндотелия и условия микроциркуляции [Alchera E. et al., 2010; Shawky H. M. et al., 2012]. Вместе с тем известно, что долгосрочные защитные эффекты ЭПО реализуются через изменение кислородсвязывающих свойств крови, а состояние параметров КТФ крови может влиять на активность процессов ПОЛ при разной патологии [Зинчук В. В., Ходосовский М. Н., 2006; Зинчук В. В. и др., 2012]. Изучили краткосрочное влияние ЭПО на параметры кислородтранспортной функции крови и прооксидантно-антиоксидантный баланс крови при ИРП [Ходосовский М. Н., Зинчук В. В., 2014].

Целью начального этапа исследований было изучить влияние однократного использования разных доз ЭПО на параметры КТФ крови, прооксидантно-антиоксидантный баланс и

НО-синтазную функцию при моделировании синдрома ишемии-реперфузии печени у крыс.

6.1 Влияние разных доз эритропоэтина на параметры кислородтранспортной функции крови и прооксидантно-антиоксидантный баланс при синдроме ишемии-реперфузии печени

Опыты выполнены на взрослых белых крысах-самцах, весом 280-360 г, предварительно содержавшихся 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 и тканей печени для оценки параметров КТФ крови, прооксидантно-антиоксидантного и функционального состояния печени. Оперативные вмешательства осуществляли в соответствии с нормами, принятыми комиссией по биомедицинской этике Гродненского государственного медицинского университета.

Животных разделили на 4 группы: 1-я (n=9) группа – контрольная; во 2-й (n=8) группе моделировали ИРП; в 3-й (n=8) и в 4-й (n=9) группах за 30 минут перед ИРП вводили рекомбинантный человеческий эритропоэтин альфа (ЭПО, INTAS) в дозе 100 и 1000 МЕ/кг, соответственно. Оценивали показатели КТФ крови: $p50_{\text{реал}}$, pO_2 , pCO_2 , pH , HCO_3^- , TCO_2 , ABE, SBE, SBC, СГК и КДО; показатели прооксидантно-антиоксидантного состояния: концентрацию ДК, ОШ, α -токоферола, ретинола и активность каталазы; АлАТ, АсАТ, NOx как описано ранее (глава 5). Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием t-критерия Стьюдента или U-теста, в зависимости от нормальности распределения выборок. Достоверными считали различия при $p < 0,05$.

Изменения параметров КТФ крови у экспериментальных животных представлены в табл. 20.

Таблица 20. – Влияние разных доз эритропоэтина на показатели кислородтранспортной функции крови у крыс при ишемии-реперфузии печени ($M \pm m$)

Показатель	Контроль	ИРП	ИРП + ЭПО-100	ИРП + ЭПО-1000
n	9	8	8	9
p50 _{реал} , мм рт. ст.	32,37±0,5	41,6±0,58*	45,58±0,85*#	35,07±1,9#
p50 _{станд} , мм рт. ст.	30,91±0,9	34,04±0,9*	38,86±0,46*#	33,53±1,59
Hb, г/л	107,2±5,6	119,75±8,9	118,25±14,47	140,9±6,0*
MetHb, %	0,63±0,18	0,4±0,13	0,28±0,09	0,72±0,21
pO ₂ , мм рт. ст.	27,78±2,7	35,25±1,98*	37,38±2,12*	30,78±3,61
pH, ед.	7,35±0,02	7,227±0,029*	7,246±0,018*	7,348±0,019#
pCO ₂ , мм рт. ст.	48,3±4,59	56,68±3,24	73,63±2,54*	57,94±4,7
HCO ₃ ⁻ , ммоль/л	26,64±1,5	24,01±1,71	32,31±0,75*#	31,7±1,7*#
TCO ₂ , ммоль/л	28,1±1,65	25,75±1,77	34,6±0,76*#	33,5±1,8*#
ABE, ммоль/л	1,2±1,13	-3,6±1,77*	3,83±0,92#	5,01±1,1*#
SBE, ммоль/л	0,89±1,41	-3,8±2,03*	4,81±0,93*#	5,8±1,47*#
SBC, ммоль/л	24,61±0,81	20,7±1,39*	26,53±0,82#	28,4±1,4*#

Примечание – ИРП – ишемия-реперфузия печени (2-я группа), ЭПО-100 – эритропоэтин в дозе 100 МЕ/кг (3-я группа), ЭПО-1000 эритропоэтин в дозе 1000 МЕ/кг (4-я группа);

* – достоверное различие по отношению к контролю ($p < 0,05$);

– достоверное различие по отношению ко 2-й группе (ИРП) ($p < 0,05$)

Выявлено, что у крыс 2-й группы в конце постишемического периода в крови наблюдалось уменьшение значений показателей pH, ABE, SBE и SBC, отражая развитие метболического ацидоза. В конце реперфузии у крыс 2-й экспериментальной группы в крови наблюдалось увеличение $p50_{\text{станд}}$ и $p50_{\text{реал}}$ на 10,1% ($p < 0,05$) и 28,6 % ($p < 0,001$), свидетельствуя о сдвиге КДО вправо (рис. 25).

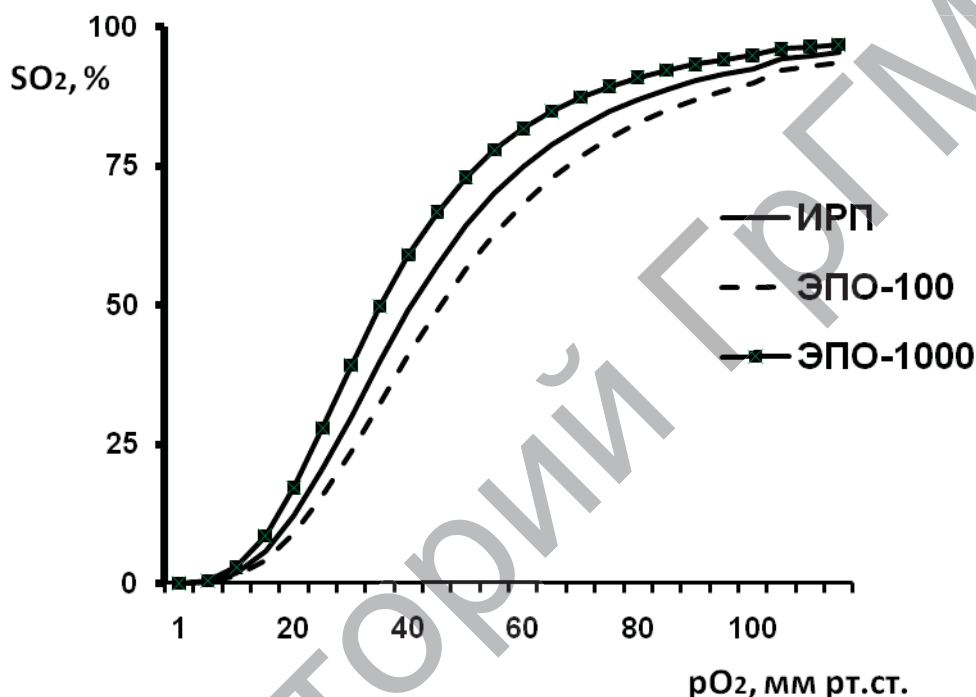


Рисунок 25. – Влияние эритропоэтина на положение кривой диссоциации оксигемоглобина ($p50_{\text{реал}}$) смешанной венозной крови на 120-й минуте реперфузии у крыс: ИРП – 2-я группа животных, ЭПО-100 – 3-я группа животных, ЭПО-1000 – 4-я группа животных

Одновременно выявлено, что показатель pO_2 смешанной венозной крови у животных 2-й группы в конце реперфузионного периода повышался на 26,9% ($p < 0,05$) по отношению к животным контрольной группы. Установлено также, что у крыс 2-й группы ИРП приводила к росту ДК и ОШ в плазме крови в конце экспериментов по отношению к контрольным в 4,2 ($p < 0,001$) и в 8,7 ($p < 0,001$) раза, соответственно (табл. 29). При этом у животных 2-й группы понижалась концентрация α -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-й группы снижалась на 57,5% ($p<0,001$). Схожие изменения исследуемых параметров прооксидантно-антиоксидантного баланса наблюдались в печени в конце реперфузионного периода (табл. 29). Данные нарушения параметров КТФ крови и прооксидантно-антиоксидантного состояния при ишемии-реперфузии печени приводили росту активности АлАТ и АсАТ в 10,4 ($p<0,001$) и 8,5 ($p<0,001$) раза по отношению к контролю, соответственно (рис. 26). Следует отметить, что у животных 2-й экспериментальной группы наблюдалось понижение суммарного содержания NOx в крови на 49,6% ($p<0,05$) по отношению к контрольным крысам 1-й группы (рис. 27).

Вместе с тем у крыс 3-й экспериментальной группы наблюдали повышение ДК и ОШ в плазме крови в конце реперфузии по отношению к контрольным только в 2,0 ($p<0,01$) и в 4,0 ($p<0,01$) раза, соответственно, что было существенно меньше, чем во 2-й группе (табл. 27). В печени в конце постишемического периода в 3-й группе содержание ДК и ОШ было выше по отношению к контролю в 2,2 ($p<0,001$) и 2,0 ($p<0,001$) раза, соответственно, однако ниже, чем у крыс 2-й группы. Важно, что у животных 3-й группы в конце ИРП не наблюдалось понижения концентрации α -токоферола и ретинола в крови и в гомогенате печени по отношению к животным 1-й группы. Активность каталазы в конце реперфузионного периода у крыс 3-й группы повышалась в эритроцитах на 51,2% ($p<0,05$), а в гепатоцитах – на 142,1% ($p<0,001$).

Таблица 21. – Влияние разных доз эритропоэтина на показатели прооксидантно-антиоксидантного состояния у крыс при ишемии-реперфузии печени ($M \pm m$)

Показатель	Контроль	ИРП	ИРП + ЭПО-100	ИРП + ЭПО-1000
n	9	8	8	9
ДК _{пл} , $\Delta E_{233}/\text{мл}$	0,94 $\pm$ 0,12	3,96 $\pm$ 0,4*	3,34 $\pm$ 0,19*	1,87 $\pm$ 0,1*#
ДК _{эр} , $\Delta E_{233}/\text{мл}$	5,48 $\pm$ 0,39	10,47 $\pm$ 0,8*	8,75 $\pm$ 0,61*	6,09 $\pm$ 0,31#
ДК _{печ} , $\Delta E_{233}/\text{г}$	9,33 $\pm$ 0,67	47,3 $\pm$ 3,71*	45,05 $\pm$ 1,1*	18,3 $\pm$ 2,3*#
ОШ _{пл} , ЕД/мл	21,74 $\pm$ 1,93	188,24 $\pm$ 11,53*	150,59 $\pm$ 17,85*	81,38 $\pm$ 6,36*#
ОШ _{эр} , ЕД/мл	39,44 $\pm$ 1,64	81,8 $\pm$ 4,97*	80,09 $\pm$ 6,25*	43,14 $\pm$ 4,34#
ОШ _{печ} , ЕД/г	129,4 $\pm$ 11,2	500,8 $\pm$ 58,7*	432,6 $\pm$ 26,7*	158,8 $\pm$ 18,8#
Токоферол _{пл} , мкмоль/л	20,5 $\pm$ 0,39	17,55 $\pm$ 0,54*	18,4 $\pm$ 0,28*	19,72 $\pm$ 0,31#
Токоферол _{эр} , мкмоль/л	116,89 $\pm$ 1,14	101,06 $\pm$ 4,67*	106,52 $\pm$ 2,5*	114,69 $\pm$ 1,2#
Токоферол _{печ} , мкмоль/г	189,76 $\pm$ 6,33	145,34 $\pm$ 5,65*	158,91 $\pm$ 6,52*	186,44 $\pm$ 4,04#
ретинол _{пл} , мкмоль/л	2,51 $\pm$ 0,1	1,75 $\pm$ 0,03*	1,9 $\pm$ 0,02*#	2,32 $\pm$ 0,06#
ретинол _{эр} , мкмоль/л	8,92 $\pm$ 0,29	7,36 $\pm$ 0,27*	7,73 $\pm$ 0,23*	8,54 $\pm$ 0,28#
ретинол _{печ} , мкмоль/г	21,85 $\pm$ 0,65	16,41 $\pm$ 0,48*	18,47 $\pm$ 0,41*#	20,72 $\pm$ 0,39#
Каталаза _{эр} , мм/л*гНб*с	0,94 $\pm$ 0,07	0,4 $\pm$ 0,11*	0,92 $\pm$ 0,12#	1,35 $\pm$ 0,11*#
Каталаза _{печ} , мм/л*г*с	3,14 $\pm$ 0,33	1,1 $\pm$ 0,3*	2,49 $\pm$ 0,34#	5,74 $\pm$ 0,43*#

Примечание – ИРП – ишемия-реперфузия печени (2-я группа), ЭПО-100 – эритропоэтин в дозе 100 МЕ/кг (3-я группа), ЭПО-1000 эритропоэтин в дозе 1000 МЕ/кг (4-я группа); * – достоверное различие по отношению к контролю ($p < 0,05$), # – достоверное различие по отношению ко 2-й группе (ИРП) ($p < 0,05$)

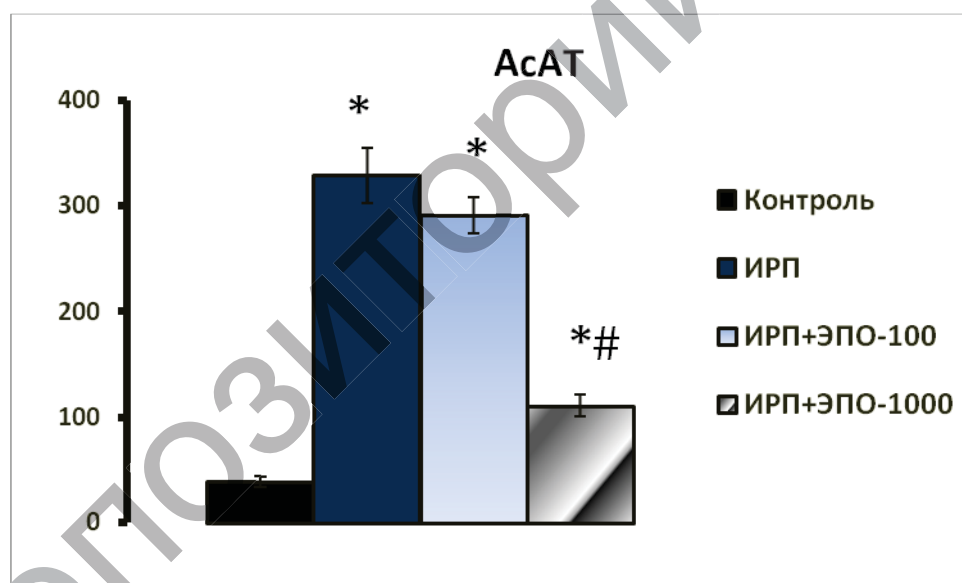
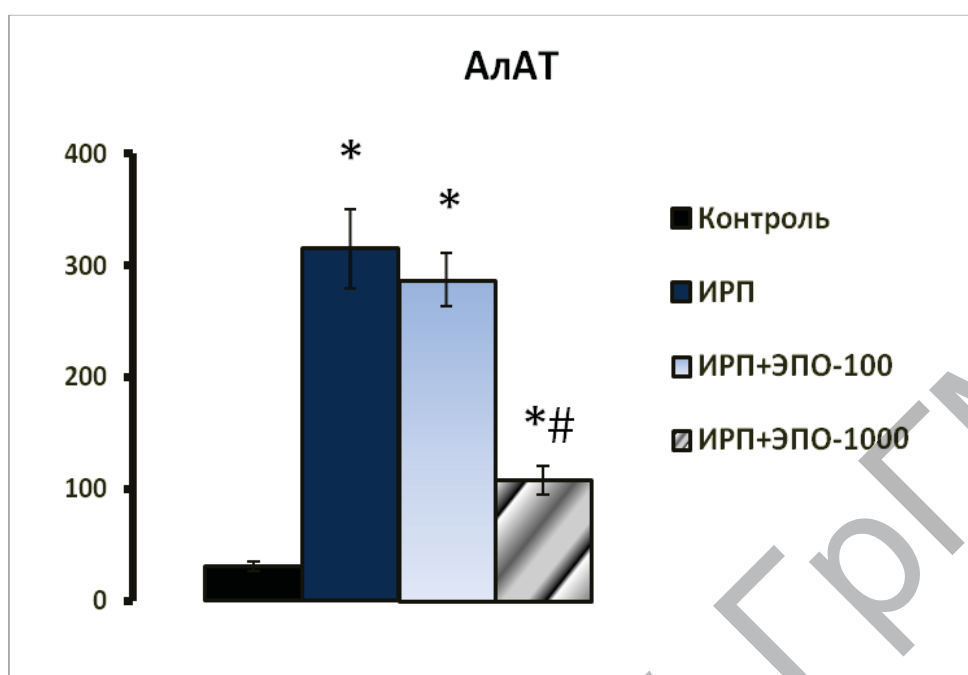


Рисунок – 26. Влияние эритропоэтина на активность АлАТ и АсАТ (ЕД/л) в плазме смешанной венозной крови экспериментальных животных: контроль – 1-я группа животных, ИРП – 2-я группа животных, ЭПО-100 – 3-я группа животных, ЭПО-1000 – 4-я группа животных; *, # – табл. 21

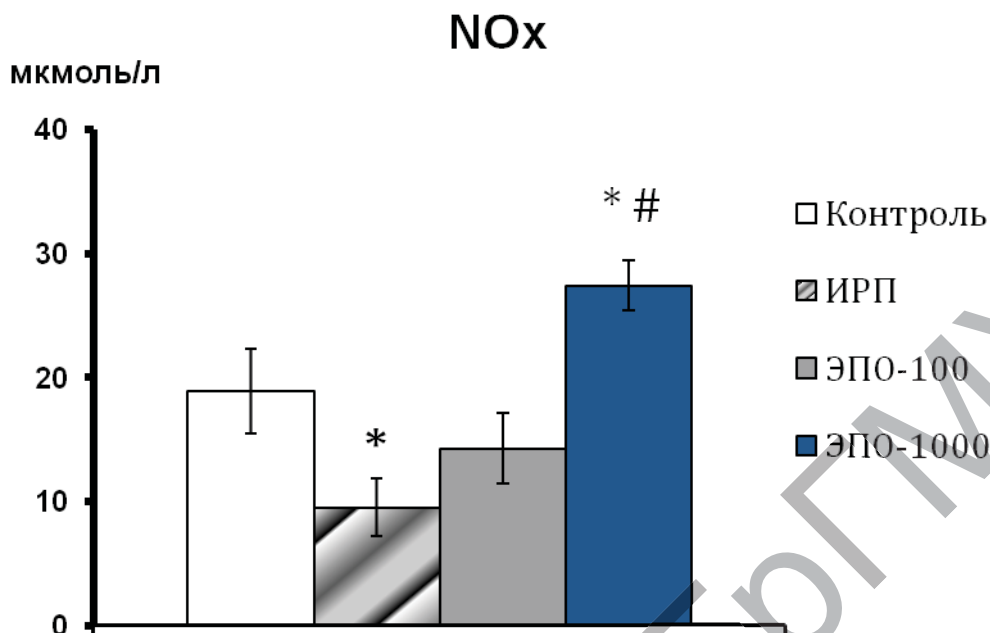


Рисунок 27. – Влияние эритропоэтина на содержание нитратов/нитритов (NOx) в крови экспериментальных животных: контроль – 1-я группа животных, ИРП – 2-я группа животных, ЭПО-100 – 3-я группа животных, ЭПО-1000 – 4-я группа животных; *, # – табл. 27

Использование ЭПО в дозе 100 МЕ/кг у животных 3-й группы не приводило к существенному улучшению прооксидантно-антиоксидантного и функционального состояния печени (табл. 21 и рис. 26). Так, рост ДК и ОШ в плазме крови в 3-й группе составил 3,5 раза ($p < 0,001$) и 6,9 раза ($p < 0,001$) по отношению к контролю, соответственно. Следует отметить, что уровень продуктов ПОЛ в конце реперфузии у крыс 3-й группы не отличался от такового во 2-й группе животных. Содержание α -токоферола в 3-й группе опытных крыс в эритроцитах и плазме крови по отношению к контрольным снижалось на 8,9% ($p < 0,001$) и 10,3% ($p < 0,001$), соответственно. Активность АлАТ и АсАТ в плазме крови у животных 3-й группы повышалась в 9,4 ($p < 0,001$) и 7,5 ($p < 0,001$) раза по отношению к контролю, соответственно (рис. 26). Вместе с тем следует отметить нормализацию активности каталазы эритроцитов и гомогената печени в конце реперфузии, а также повышение уровня ретинола в крови и печени у крыс 3-й группы по отношению ко 2-й группе животных. Сдвиг КДО вправо, наблюдавшийся у животных 2-й группы, в 3-й группе

усиливался, достигая максимума среди всех экспериментальных групп (рис. 25). Так, показатель $p50_{\text{реал}}$ и $p50_{\text{станд}}$ в конце реперфузии у крыс 3-й экспериментальной группы увеличивался на 40,8% ($p<0,001$) и 25,7% ($p<0,001$) по отношению к контролю, соответственно. Следует отметить, что показатель $p50_{\text{реал}}$ и $p50_{\text{станд}}$ в конце реперфузии у крыс 3-й экспериментальной группы увеличивался на 9,5% ($p<0,01$) и 14,2% ($p<0,001$) по отношению ко 2-й группе животных. Показатель pO_2 в конце ИРП у крыс 3-й группы оставался выше, чем в контроле. Суммарное содержание NOx в крови у животных 3-й группы не отличалось от контроля (рис. 27).

Инфузия ЭПО (1000 МЕ/кг) крысам 4-й группы сопровождалась улучшением параметров КТФ крови в конце реперфузии (табл. 20). Так, по отношению к животным 2-й группы здесь наблюдалось увеличение показателей pH, HCO_3^- , TCO_2 , ABE, SBE и SBC. Одновременно установлено смещение КДО влево по отношению к животным 2-й группы в конце реперфузии (судя по показателю $p50_{\text{реал}}$). У крыс 4-й экспериментальной группы наблюдалось повышение ДК и ОШ в плазме крови в конце реперфузии по отношению к контрольным только в 2,0 ($p<0,001$) и в 3,7 ($p<0,001$) раза, соответственно, что было существенно меньше, чем во 2-й группе (табл. 21). В печени в конце постишемического периода содержание ДК было выше по отношению к контролю в 2,0 ($p<0,01$) раза, соответственно, однако ниже чем у крыс 2-й и 3-й групп. Важно отметить, что у животных 4-й группы в конце ИРП не изменялось содержание ОШ в гомогенате печени, а также отсутствовало снижение концентрации α -токоферола и ретинола в плазме крови и в гомогенате исследуемого органа по отношению к контрольным животным. Активность каталазы в конце реперфузионного периода у крыс 4-й группы повышалась в эритроцитах на 43,1% ($p<0,05$), а в гепатоцитах – на 83,0% ($p<0,001$). Данные изменения прооксидантно-антиоксидантного состояния у животных 4-й группы были лучше, чем у крыс 2-й и 3-й групп, но оставались хуже, чем у животных 1-й группы (табл. 21). В 4-й опытной группе активность АлАТ и АсАТ крови была меньше, чем во 2-й и 3-й группах (рис. 26). Следует отметить, что у животных 4-й экспериментальной группы наблюдалось повышение суммарного содержания NOx в крови по отношению к крысам 1-й, 2-й и 3-й опытных групп (рис. 27).

Установлено, что моделирование ИРП у животных 2-й группы приводило к снижению показателей кислотно-основного состояния (pH, ABE, SBE и SBC) крови, свидетельствуя о развитии метаболического ацидоза, который является неизбежным следствием ишемии данного внутреннего органа [Kanoria S. et al., 2004]. Одновременно реперфузия печени сопровождалась значительным снижением СГК крови (судя по росту показателей $p50_{\text{реал}}$ и $p50_{\text{станд}}$), а также повышением её pO_2 , что способствовало усилению потока кислорода в ткани и созданию условий «относительной гипероксии» в реперфузионном периоде. Известно, что после ишемии в тканях нарушается утилизация кислорода в связи с накоплением восстановленных переносчиков (NADH, NADPH) и частичным блокированием ими дыхательной цепи митохондрий [Биленко М. В., 1989]. Выявленное снижение СГК крови у животных 2-й группы могло способствовать усилению дисбаланса между донорами и акцепторами электронов, что приводило к росту активности свободнорадикальных процессов ПОЛ (рост содержания ДК и ОШ), истощению параметров антиоксидантной системы (уменьшение уровня α -токоферола, ретинола и активности каталазы), указывая на сдвиг прооксидантно-антиоксидантного равновесия в сторону радикалообразования и развитие окислительного стресса. В результате увеличения доли неполного восстановления кислорода (т.н. «утечки» электронов) и образования его активных свободнорадикальных форм, роста активности процессов ПОЛ и повреждения клеточных и субклеточных мембранных структур гепатоцитов повышалась активность АлАТ и АсАТ у крыс 2-й группы. В целом правосторонний сдвиг КДО и увеличение потока кислорода в ткани в реперфузионном периоде способствовали усилению дисбаланса между способностью тканей к нормальной утилизации O_2 и его доставкой, в результате чего наблюдались глубокие нарушения прооксидантно-антиоксидантного состояния, результатом которых явилось повреждение целостности мембран гепатоцитов процессами ПОЛ. Следует отметить, что у животных 2-й группы снижалось суммарное содержание NOx, указывая на функциональную недостаточность L-аргинин-NO системы. Известно, что при отсутствии достаточного количества субстратов и кофакторов эндотелиальная NO-синтаза может переключаться на синтез АФК вместо NO, потенцируя окислительный стресс [Pacher P. et al., 2007].

Введение ЭПО опытным животным способствовало дозозависимому улучшению отдельных параметров прооксидантно-антиоксидантного состояния и L-аргинин-NO системы, однако приводило разнонаправленным сдвигам КДО в реперфузионном периоде. Так, использование ЭПО в дозе 100 МЕ/кг приводило к нормализации активности каталазы эритроцитов и гомогената печени, повышению уровня ретинола в плазме крови и гепатоцитах по отношению к животным 2-й группы. Показано, что направленное снижение СГК в раннем постишемическом периоде с помощью RSR13 способствовало уменьшению повреждений нейронов головного мозга у крыс при неполной ишемии, однако не оказывало протективного эффекта при более глубокой ишемии органа [Grocott H. P. et al., 1998]. Возможно, глубокая ишемия мозга способствовала более выраженной блокаде дыхательной цепи митохондрий, а правосторонний сдвиг КДО и увеличение отдачи кислорода в ткани при реперфузии усугубляли дисбаланс между донорами и акцепторами электронов, усиливая генерацию АФК. В подтверждение данного предположения свидетельствует факт сохранения высокой активности процессов ПОЛ у животных 3-й группы, что вело к повреждению мембран гепатоцитов в реперфузионном периоде (судя по активности АлАТ и АсАТ). В данном случае правосторонний сдвиг КДО мог препятствовать улучшению прооксидантно-антиоксидантного состояния при реперфузии печени, в результате которого усиливалось состояние «относительной гипероксии», когда доставка кислорода кровью с обычным или повышенным его содержанием приводит к усилению генерации АФК тканями после ишемии и развитию окислительного стресса [Биленко М. В., 1989; Зинчук В. В., Ходосовский М. Н., 2006].

Использование ЭПО в дозе 1000 МЕ/кг перед ИРП у экспериментальных животных существенно улучшало параметры прооксидантно-антиоксидантного состояния по отношению к крысам 2-й и 3-й групп. Важным фактором улучшения прооксидантно-антиоксидантного баланса являлось повышение активности каталазы печени и эритроцитов крови, что в комплексе с другими механизмами привело к улучшению данного баланса и функционального состояния печени у крыс 4-й группы. Улучшение прооксидантно-антиоксидантного состояния проходило на фоне повышения СГК крови в реперфузионном периоде по отношению к

животным 2-й и 3-й опытных групп. Известно, что сдвиг КДО влево способствует уменьшению отдачи кислорода в ткани [Hsia C. C., 1998]. Лимитирование отдачи кислорода в ткани после ишемии, возможно, явилось важным стабилизирующим фактором для работы митохондрий. Показано, что создание умеренной гипоксии при ИРП у кроликов уменьшало активность свободно-радикальных процессов [Зинчук В. В., Ходосовский М. Н., 2006]. Важно отметить, что в 4-й группе в конце реперфузии повышалось содержание NOх. Механизм левостороннего сдвига КДО в 4-й группе животных мог быть опосредован NO. Под влиянием оксида азота могут образовываться разные формы гемоглобина, разнонаправленно изменяющие СГК. Так, высокие концентрации метгемоглобина и S-нитрозогемоглобина (SNO-Hb) смещают КДО влево, тогда как повышенные концентрации нитрозилгемоглобина ($\text{HbFe}^{2+}\text{NO}$) сдвигают данную кривую вправо. Учитывая отсутствие изменений в содержании метгемоглобина у исследуемых животных, можно предположить, что смещение КДО влево у крыс 4-й группы было обусловлено повышением концентрации SNO-Hb. Установлено, что предварительное введение ЭПО кроликам за 30 минут до инъекции липополисахарида способствовало улучшению параметров КТФ крови, повышению СГК через NO-зависимый механизм, снижению окислительного стресса [Зинчук В. В. и др., 2010]. Согласно исследованию структуры SNO-Hb, NO, соединяясь с $\beta 93$ -цистеином, ингибирует образование солевых мостиков между $\beta 146$ -гистидином и $\beta 94$ -аспарагином, что неминуемо приводит к повышению СГК [Clementi M. E. et al., 2003]. Нельзя исключить прямые модулирующие эффекты ЭПО на кислородсвязывающие свойства крови.

Известно, что активация продукции ЭПО в организме опосредуется ГИФ, ответственным за активацию транскрипции эритропоэтиновой информационной РНК, синтез фактора роста эндотелия сосудов, индуктора ангиогенеза, увеличивающего потребление кислорода тканями [Захаров Ю. М., 2007]. Возможно, окислительный стресс при ИРП препятствует реализации физиологических защитных эффектов ГИФ, тогда как введение ЭПО перед ИРП напрямую активирует рецепторы чувствительных к нему клеток, что приводит к коррекции реперфузионных повреждений органа. Важно отметить, что повышение продукции оксида азота при ИРП должно сопровождаться жестким контролем

со стороны антиоксидантной системы, так как взаимодействие NO с АФК приводит к образованию мощного окислителя – пероксинитрита (ONOO^-), способного повреждать белки, липиды и ДНК клеток [Di Meo S. et al., 2016]. В этой связи выявленная высокая активность каталазы у крыс 4-й группы способствовала защитному влиянию ЭПО на печень при ИРП, тогда как простая нормализация активности фермента у животных 3-й группы, по-видимому, оказалась функционально недостаточной. Кроме того, гемоглобин, образуя SNO-Hb, может отвлекать определенную часть NO от свободнорадикальных реакций, одновременно снижая поступление O_2 в ткани и генерацию в них АФК в постишемическом периоде. Также известно, что СГК крови может принимать участие в механизмах антиоксидантной защиты тканей, контролируя поток кислорода и тканевое pO_2 [Зинчук В. В., Ходосовский М. Н., 2006; Зинчук В. В. и др., 2010].

Таким образом, ИРП приводит к нарушению кислотно-основного состояния и снижению СГК крови, нарушению прооксидантно-антиоксидантного баланса, недостаточности L-аргинин-NO системы и ухудшению функционального состояния органа у экспериментальных животных. Введение ЭПО опытным животным способствовало дозозависимому улучшению параметров прооксидантно-антиоксидантного состояния и L-аргинин-NO системы. Выявленные эффекты введения ЭПО перед ИРП у крыс включают: модификацию кислородсвязывающих свойств крови при реперфузии; повышение активности каталазы и улучшение прооксидантно-антиоксидантного состояния; повышение продукции NO, что может улучшать условия микроциркуляции в печени. Выявленное повышение СГК крови при моделировании ИРП у крыс может быть важным механизмом защитного влияния ЭПО, который снижает эффекты окислительного стресса при данной патологии.

6.2 Вклад сероводорода в механизм протективного действия эритропозтина при ишемии-реперфузии печени

Поскольку ЭПО и сероводород при ишемии способны модулировать активность одних и тех же проадаптивных генов [Meng H. et al., 2014; Shimada S. et al., 2015], нами выяснялась роль эндогенного сероводорода в механизме защитного действия

эритропоэтина на печень при синдроме ишемии-реперфузии у крыс [Ходосовский М. Н. и др., 2017].

Животных разделили на 4 группы: 1-я (n=10) группа – контрольная; во 2-й (n=10) – моделировали ИРП; в 3-й (n=10) группе – за 30 минут перед ИРП крысам вводили рекомбинантный человеческий эритропоэтин альфа (ЭПО, INTAS, 1000 МЕ/кг, в/б), в 4-й (n=10) группе введение ЭПО комбинировали с ингибитором синтеза сероводорода – Dl-пропаргилглицином (ПАГ, Sigma, 50 мг/кг, 60 мин. до ИРП, в/б) [Tan G. et al., 2011]. Содержание сероводорода в плазме крови определяли спектрофотометрическим методом, который основан на реакции между сульфид-анионом и кислым раствором N,N-диметил-p-фенилендиамина в присутствии хлорида железа (III) [Norris E. J. et al., 2011].

Изучались показатели КТФ крови, прооксидантно-антиоксидантного состояния (ДК, МДА, ОШ, GSH, α -токоферол, ретинол и активность каталазы), NOx, АлАТ, АсАТ, гистохимическую картину печени, как указано в главе 3.

Изменения параметров прооксидантно-антиоксидантного баланса в экспериментальных группах представлены в табл. 22.

Установлено, что моделирование ИРП у крыс приводило к росту содержания продуктов ПОЛ, истощению структурных антиоксидантов (токоферол, ретинол), снижению активности каталазы в крови и печени опытных животных (табл. 22). Моделирование синдрома ИРП у крыс 2-й группы приводило к снижению уровня сероводорода в плазме смешанной венозной крови в конце реперфузии на 35,2% ($p < 0,01$) по отношению к контролю (рис. 27). Инфузия ЭПО способствовала восстановлению уровня H_2S в крови при ИРП, тогда как ингибирование цистатионин- γ -лиазы с помощью ПАГ в условиях введения ЭПО снижало уровень сероводорода по отношению ко всем экспериментальным группам и контролю (рис. 28).

В группе животных, получавших рекомбинантный человеческий эритропоэтин, альфа в дозе 1000 МЕ/кг (ЭПО, 3-я группа), наблюдалось улучшение большинства исследуемых параметров. Так, уровень ДК и ОШ в эритроцитах по отношению к животным, которым препарат не вводили, понижался на 62,9% ($p < 0,001$) и 39,2% ($p < 0,001$), соответственно.

Таблица 22. – Изменение параметров прооксидантно-антиоксидантного состояния у крыс при ИРП в условиях введения ЭПО и ингибирования синтеза сероводорода ($M \pm m$)

Показатель	Контроль	ИРП	ЭПО	ЭПО +ПАГ
n	10	10	10	10
ДК _{пл} , $\Delta E_{233}/\text{мл}$	0,85 $\pm$ 0,08	4,01 $\pm$ 0,38*	1,2 $\pm$ 0,1*#	3,4 $\pm$ 0,2*&
ДК _{эр} , $\Delta E_{233}/\text{мл}$	5,68 $\pm$ 0,48	16,73 $\pm$ 0,9*	6,14 $\pm$ 0,52#	15,5 $\pm$ 1,2*&
ДК _{печ} , $\Delta E_{233}/\text{г}$	8,52 $\pm$ 0,74	46,6 $\pm$ 2,65*	10,2 $\pm$ 0,83#	35,8 $\pm$ 2,9*#
МДА _{пл} , мкМ/л	2,93 $\pm$ 0,91	6,45 $\pm$ 2,99	2,38 $\pm$ 0,3	2,95 $\pm$ 0,38
МДА _{эр} , мкМ/л	7,69 $\pm$ 0,96	6,07 $\pm$ 0,79	3,0 $\pm$ 0,88*#	7,4 $\pm$ 1,17&
МДА _{печ} , мкМ/г	24,9 $\pm$ 1,59	39,42 $\pm$ 2,1*	30,0 $\pm$ 1,0*#	35,9 $\pm$ 1,7*&
ОШ _{пл} , ЕД/мл	20,05 $\pm$ 1,2	184,5 $\pm$ 10,1*	46,16 $\pm$ 7,3*#	150 $\pm$ 9,5*#&
ОШ _{эр} , ЕД/мл	39,0 $\pm$ 2,52	65,1 $\pm$ 4,05*	42,82 $\pm$ 5,3#	57,7 $\pm$ 3,7*&
ОШ _{печ} , ЕД/г	115,1 $\pm$ 5,3	469,9 $\pm$ 33,5*	126,9 $\pm$ 8,0#	389 $\pm$ 28,9*&
Токоферол _{пл} , мкмоль/л	20,96 $\pm$ 0,38	17,4 $\pm$ 0,34*	20,22 $\pm$ 0,37#	17,4 $\pm$ 0,34*&
Токоферол _{эр} , мкмоль/л	96,29 $\pm$ 3,74	64,48 $\pm$ 2,97*	94,91 $\pm$ 2,69#	69,92 $\pm$ 3,1*&
Токоферол _{печ} , мкмоль/г	177,33 $\pm$ 4,23	141,22 $\pm$ 3,79*	165,5 $\pm$ 9,91*#	145,75 $\pm$ 1,85*&
Ретинол _{пл} , мкмоль/л	2,32 $\pm$ 0,07	1,72 $\pm$ 0,03*	2,16 $\pm$ 0,07#	1,89 $\pm$ 0,05*#&
Ретинол _{эр} , мкмоль/л	7,16 $\pm$ 0,3	5,67 $\pm$ 0,19*	6,94 $\pm$ 0,25#	6,47 $\pm$ 0,3#
Ретинол _{печ} , мкмоль/г	20,37 $\pm$ 0,52	16,7 $\pm$ 0,4*	19,71 $\pm$ 0,71#	17,29 $\pm$ 0,42*
GSH _{эр} , мкМ/гНб	50,67 $\pm$ 1,84	50,98 $\pm$ 1,97	59,71 $\pm$ 3,65*#	57,96 $\pm$ 4,99*
GSH _{печ} , мм/г	4,09 $\pm$ 0,36	1,27 $\pm$ 0,26*	5,85 $\pm$ 0,2*#	5,99 $\pm$ 0,1*#
Каталаза _{эр} , ммоль/л*гНб*с	1,0 $\pm$ 0,13	0,38 $\pm$ 0,06*	1,62 $\pm$ 0,17*#	0,76 $\pm$ 0,13#&
Каталаза _{печ} , ммоль/л*гбел*с	3,6 $\pm$ 0,18	1,47 $\pm$ 0,16*	3,78 $\pm$ 0,12#	1,97 $\pm$ 0,23*&

Примечание – * – достоверное различие по отношению к контролю ($p < 0,05$), # – достоверное различие по отношению ко 2-й группе ($p < 0,05$), & – достоверное различие по отношению к 3-й группе (ЭПО) животных ($p < 0,05$)

Содержание ДК и ОШ в печени в конце реперфузии по отношению к крысам, у которых моделировали только ишемию-реперфузию органа, 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 с ишемией-реперфузией органа без ЭПО (табл. 22). Так, в печени в конце реперфузии уровни α -токоферола, ретинола и активность каталазы у животных группы ЭПО не отличались от контрольных, а содержание GSH эритроцитов повышалось на 20,7% ($p<0,05$). Результаты исследования указывают, что введение эритропоэтина крысам способствует улучшению прооксидантно-антиоксидантного баланса при ишемии-реперфузии печени.

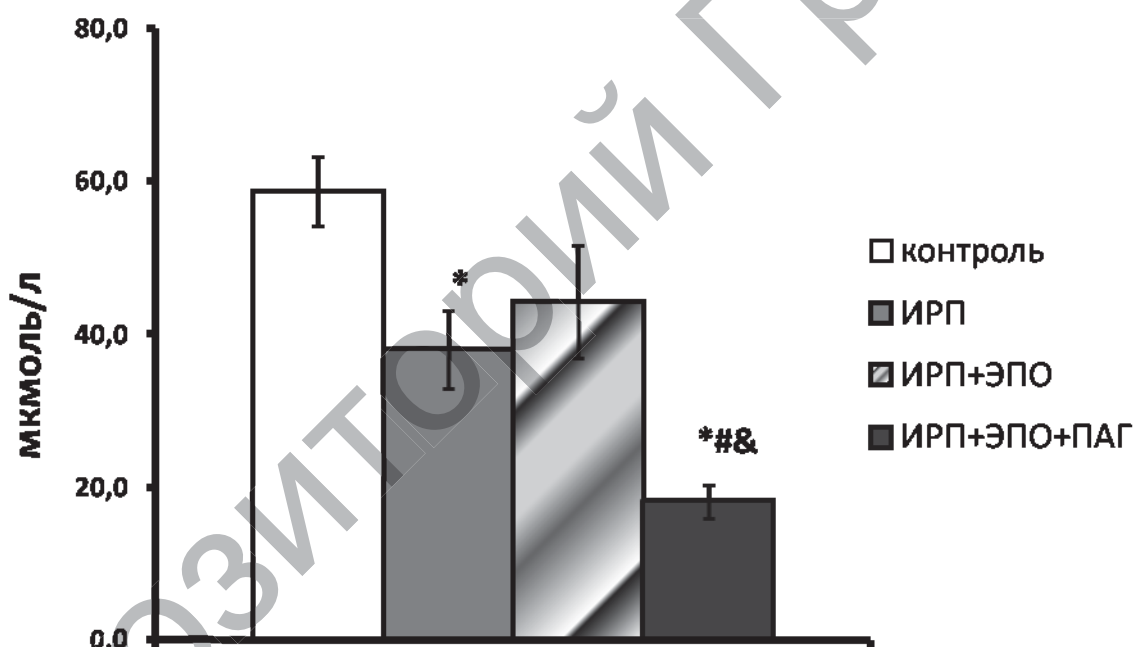


Рисунок 28. – Изменение уровня сероводорода плазмы у опытных крыс в конце реперфузионного периода, где * – достоверное различие по отношению к контрольной группе ($p<0,05$), # – достоверное различие по отношению ко 2-й группе (ИРП) животных ($p<0,05$), & – достоверное различие по отношению к 3-й группе (ЭПО) животных ($p<0,05$)

Применение ЭПО в условиях ингибирования эндогенного синтеза сероводорода (ЭПО+ПАГ, 4-я группа) ухудшало параметры прооксидантно-антиоксидантного состояния крови и печени после ишемии (табл. 22). Активность АлАТ и АсАТ в конце реперфузионного периода при использовании ЭПО снижалась в

3,8 ($p < 0,001$) и 4,0 ($p < 0,001$) раза, соответственно, по отношению к животным, у которых ИРП моделировали без ЭПО. Использование ПАГ у крыс 4-й группы нивелировало протективный эффект ЭПО при ИРП (табл. 22). Так, уровень продуктов ПОЛ в плазме крови в конце реперфузионного периода по отношению к крысам 3-й группы возрастал: ДК – в 2,8 раза ($p < 0,001$), ОШ – в 3,5 раза ($p < 0,001$); активность каталазы эритроцитов падала в 2,1 раза ($p < 0,001$). Содержание α -токоферола и ретинола плазмы снижалось на 14,8% ($p < 0,001$) и 17,7% ($p < 0,001$) соответственно, по отношению к контрольным животным. Схожая динамика изменений показателей прооксидантно-антиоксидантного баланса наблюдалась в печени (табл. 22).

Установлено, что моделирование синдрома ИРП у крыс 2-й группы приводило к развитию тяжелых нарушений параметров КТФ смешанной венозной крови, связанных с развитием метаболического ацидоза и снижением СГК крови (табл. 23). Так, показатель $p50_{\text{реал}}$ у крыс 2-й группы в конце реперфузии увеличился по отношению к контролю на 35,2% ($p < 0,05$), что свидетельствовало о сдвиге КДО вправо (рис. 29).

Введение опытным животным ЭПО перед ИРП способствовало улучшению отдельных параметров кислородтранспортной функции крови, таких как $p50_{\text{реал}}$ и ТСO_2 (табл. 23). Так, показатель $p50_{\text{реал}}$ у крыс 3-й группы был меньше на 11,5% ($p < 0,05$), чем у крыс 2-й группы в конце реперфузии, что указывало на повышение СГК крови (рис. 29). Применение ЭПО в условиях ингибирования эндогенного синтеза сероводорода с помощью ПАГ (4-я группа) существенно не влияло на параметры кислородсвязывающей функции крови и функционального состояния печени после ишемии (табл. 23). Вместе с тем отдельные параметры КТФ крови у крыс 4-й группы были лучше, чем во 2-й группе (табл. 23).

Изменение суммарного содержания нитратов/нитритов (NOx) у крыс представлено на рис. 30. Моделирование ИРП у животных 2-й группы приводило к снижению NOx в конце реперфузионного периода по отношению к контролю на 43,5% ($p < 0,01$). Использование ЭПО в 3-й и 4-й группах восстанавливало уровень NOx в конце реперфузии по отношению к 1-й группе экспериментальных животных (рис. 30), что указывает на способность ЭПО улучшать NO -синтазную функцию организма при ИРП.

Таблица 23. – Изменение показателей кислородтранспортной функции крови, активности АЛАТ и АсАТ крови у крыс при ишемии-реперфузии печени в условиях введения ЭПО и ингибирования синтеза сероводорода ($M \pm m$)

Показатель	Контроль	ИРП	ЭПО	ЭПО + ПАГ
n	10	10	10	10
p50 _{реал} , мм рт. ст.	34,4±1,6	46,6±2,1*	40,9±1,0*#	42,3±1,3*
p50 _{станд} , мм рт. ст.	32,0±2,1	32,2±1,9	33,7±2,0	35,1±1,3
Hb, г/л	126,2±6,5	142,5±6,2	131,7±3,4	111,6±4,5#&
MetHb, %	1,1±0,1	3,0±2,3	1,2±0,1	0,8±0,1&
HbCO, %	0	0,4±0,3	0	0
pO ₂ , мм рт. ст.	28,1±3,9	34,0±2,5	29,8±3,1	29,1±1,8
pH, ед.	7,316±0,033	7,078±0,049*	7,204±0,052	7,217±0,021*#
pCO ₂ , мм рт. ст.	57,2±5,1	78,8±3,9*	80,2±7,3*	81,1±2,26*
HCO ₃ ⁻ , ммоль/л	29,1±1,5	24,5±2,6	31,6±1,8	33,3±0,9*#
TCO ₂ , ммоль/л	30,8±1,5	26,9±2,6	34,2±1,8#	35,8±0,9*#
ABE, ммоль/л	2,3±1,5	-6,8±3,1*	2,0±2,6	4,2±1,1#
SBE, ммоль/л	2,7±1,7	-5,7±3,3*	3,5±2,6	5,3±1,2#
SBC, ммоль/л	25,1±1,2	17,7±2,4*	24,7±2,1	26,7±0,9#
АЛАТ, МЕ/л	33,5±5,1	314,5±36,5*	89,9±13,7*#	213,7±26,2*#&
АсАТ, МЕ/л	38,8±5,7	351,5±39,1*	88,17±10,4*#	204,6±29,8*#&

Примечание – * – достоверное различие по отношению к контрольной группе ($p < 0,05$), # – достоверное различие по отношению ко 2-й группе (ИРП) животных ($p < 0,05$), & – достоверное различие по отношению к 3-й группе (ЭПО) животных ($p < 0,05$)

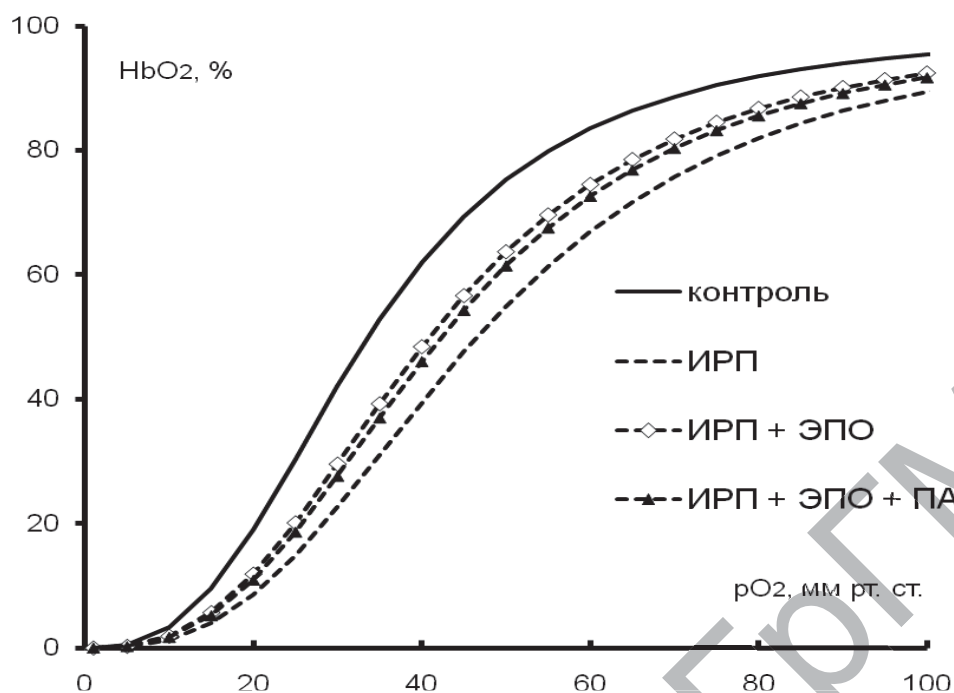


Рисунок 29. – Кривые диссоциации оксигемоглобина у крыс при ишемии-реперфузии печени в условиях инфузии эритропоэтина (ЭПО) и пропаргилглицина (ПАГ), рассчитанные по показателю $p50_{\text{реал}}$

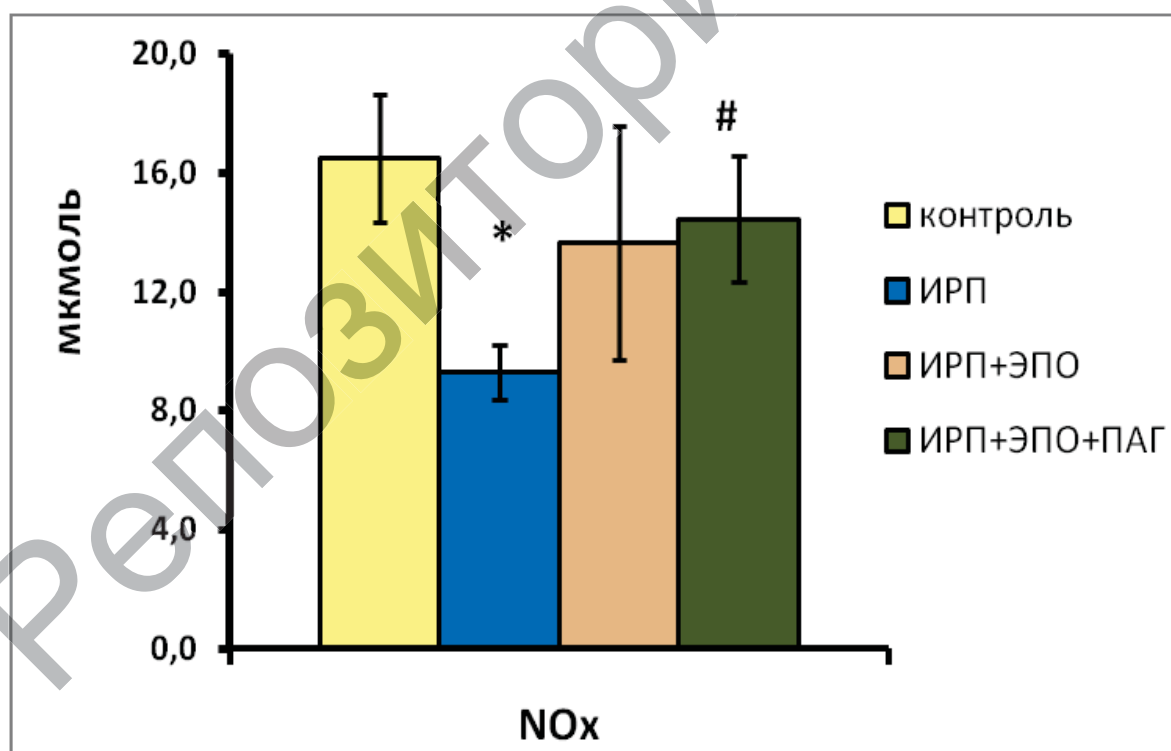


Рисунок 30. – Изменение суммарного содержания нитратов/нитритов (NOx) у опытных крыс: ИРП – 2-я группа, ИРП+ЭПО – 3-я группа, ИРП+ЭПО+ПАГ – 4-я группа, где * – достоверное различие по отношению к контрольной группе ($p < 0,05$), # – достоверное различие по отношению ко 2-й группе (ИРП) животных ($p < 0,05$)

При оценке гистохимической картины печени выявлена нормализация активности НАДН-дегидрогеназы, что указывает на улучшение процесса транспорта электронов в митохондриях гепатоцитов в группе животных с ЭПО (табл. 24). Установлено, что активность КФ в печени у крыс, получавших ЭПО, не отличается от контроля, что свидетельствует об улучшении клеточного пищеварения и защиты.

Таблица 24. – Активность ферментов (ед. отп. пл.) в цитоплазме гепатоцитов печени крыс контрольной и опытных групп при использовании ЭПО

Фермент	Контроль	ИРП	ИРП + ЭПО
СДГ	0,26 (0,24; 0,27)	0,32* (0,31; 0,34)	0,29* (0,27; 0,31)
ЛДГ	0,59 (0,58; 0,60)	0,54* (0,53; 0,56)	0,53* (0,51; 0,57)
НАДН-ДГ	0,93 (0,92; 0,95)	0,84* (0,82; 0,85)	0,90 • (0,87; 0,93)
КФ	0,97 (0,94; 0,99)	0,85* (0,81; 0,87)	0,93 (0,86; 0,98)

Примечание – данные представлены в виде Ме (25%; 75%); * – $p < 0,05$ в сравнении с контролем, • – $p < 0,05$ в сравнении с ишемией-реперфузией

При ингибировании эндогенного синтеза сероводорода с помощью ПАГ у крыс 6-й группы защитный эффект ЭПО на процессы транспорта электронов в митохондриях гепатоцитов сохранялся, судя по нормализации активности НАДН-дегидрогеназы (табл. 25). Однако установлено, что активность КФ в печени у крыс, получавших комбинацию ЭПО и ПАГ, снижалась по отношению к контролю, свидетельствуя об ухудшении процессов клеточного пищеварения и защиты.

Результаты исследования указывают, что использование ЭПО перед ИРП значительно улучшает прооксидантно-антиоксидантное состояние, КТФ крови и морфофункциональное состояние печени опытных животных, тогда как применение ингибитора эндогенного синтеза H_2S приводило к снижению данного протективного эффекта.

Показано, что в печени под влиянием ЭПО увеличивается экспрессия рецепторов к нему, что приводит к ингибированию TLR2 рецепторов и снижению уровня NF-κB и провоспалительных цитокинов (TNF-α, IL-1, IL-6) при ишемии-реперфузии [Liu Q. S. et al., 2015].

Таблица 25. – Активность ферментов (ед. отп. пл.) в цитоплазме гепатоцитов печени крыс контрольной и опытных групп при использовании ЭПО

Фермент	Контроль	ИРП	ЭПО + ПАГ
СДГ	0,27 (0,26; 0,27)	0,32* (0,31; 0,33)	0,29* (0,28; 0,33)
ЛДГ	0,58 (0,58; 0,59)	0,51* (0,48; 0,52)	0,53** (0,52; 0,54)
НАДН-ДГ	0,89 (0,87; 0,92)	0,83* (0,81; 0,84)	0,87 • (0,85; 0,89)
КФ	0,96 (0,94; 0,97)	0,84* (0,83; 0,87)	0,87* (0,85; 0,90)

Примечание – данные представлены в виде Me (25%; 75%); * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$ в сравнении с контролем, • – $p < 0,05$ в сравнении с ишемией-реперфузией печени (ИРП)

Взаимодействие ЭПО с эритропоэтиновыми рецепторами приводит к активации внутриклеточного сигнального каскада с участием фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K) и протеинкиназы В (Akt), что способствует активации транскрипционных факторов, в т.ч. ядерного фактора эритроидного происхождения Nrf2, отвечающего за экспрессию антиоксидантных протеинов и защиту от окислительного стресса [Захаров, Ю. М., 2007; Liu Q. S. et al., 2015; Meng H. et al., 2014]. Так, в работе Meng H. et al. (2014) установлено, что активация Nrf2 под влиянием ЭПО при ишемии мозга сопровождалась значительным антиоксидантным эффектом, связанным с уменьшением накопления перекиси водорода в тканях этого органа. Результаты Meng H. et al. (2014) согласуются с полученными нами данными об улучшении большинства параметров прооксидантно-антиоксидантного состояния, в т.ч. о повышении активности каталазы при ИРП в условиях введения ЭПО. Вместе с тем полученные нами данные о влиянии ЭПО при ИРП у крыс трудно объяснить активацией ядерного аппарата

клеток, т.к. последнее требует большей продолжительности экспериментов.

Показано, что Akt может активировать цистатионин-γ-лиазу без участия генетического аппарата клеток путем прямого фосфорилирования фермента, являющегося основным продуцентом эндогенного сероводорода в печени [Renga B. et al., 2015]. Использование специфического ингибитора цистатионин-γ-лиазы – ПАГ – в наших опытах препятствовало развитию большинства протективных эффектов ЭПО на прооксидантно-антиоксидантное состояние. По-видимому, сероводород был основным мессенджером защитного действия ЭПО при ИРП у крыс. Эндогенный сероводород быстро захватывается металлсодержащими протеинами и метаболизируется в митохондриях клеток [Улащик В. С., 2012]. Показано, что H₂S способствует улучшению работы митохондрий, поддержанию процессов окислительного фосфорилирования, препятствует высвобождению цитохрома С и апоптозу, индуцированному ионами кальция, снижает генерацию свободных радикалов кислорода в дыхательной цепи, что предотвращает развитие окислительного стресса в печени [Mani S. et al., 2014]. Повышение продукции H₂S эндотелием сосудов способно модифицировать кислородсвязывающие свойства гемоглобина в результате его сульфгидрирования [Добродей, М. А. и др., 2016; Ходосовский М. Н., 2016], что может существенно влиять на редокс-состояние тканей при ИРП.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что протективный эффект эритропоэтина на параметры кислородтранспортной функции крови, прооксидантно-антиоксидантного баланса и морфофункционального состояния печени при моделировании синдрома ишемии-реперфузии в условиях ингибирования синтеза сероводорода снижается, что отражает участие данного газотрансммиттера в механизме протективного действия ЭПО при развитии реперфузионного синдрома в печени.

ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМА ЗАЩИТНОГО ДЕЙСТВИЯ ГИПОКСИЧЕСКОГО ПРЕКОНДИЦИОНИРОВАНИЯ НА ПЕЧЕНЬ ПРИ СИНДРОМЕ ИШЕМИИ-РЕПЕРФУЗИИ

Повышение устойчивости тканей к гипоксии – важный механизм защиты органов от окислительного стресса при ишемии и последующей реперфузии. Индукция коротких периодов ишемии перед основным (ишемическое прекондиционирование (ИП, *ischemic preconditioning*)) оказывает выраженное протективное воздействие на постишемические ткани [Alchera E. et al., 2010]. Установлено, что ИП печени способно снижать активность процессов ПОЛ, выраженность лейкоцитарной инфильтрации и апоптоза в реперфузионном периоде, что улучшает функционирование органа после ишемии. Предполагают, что механизм защитного эффекта данного способа связан с повышением продукции NO и улучшением условий микроциркуляции в органе, активацией белков теплового шока, снижением продукции провоспалительных и проапоптотических цитокинов, увеличением синтеза гипоксией индуцируемого фактора-1 (ГИФ-1) [Alchera E. et al., 2010; Song X. et al., 2012]. Общая природа механизмов адаптации к гипоксии в разных тканях объясняет успех еще одного вида прекондиционирования печени – дистантное прекондиционирование (*remote preconditioning*), которое заключается во временном пережатии мезентериальных артериальных сосудов или брюшного отдела аорты для повышения устойчивости органа к реперфузионным повреждениям [Czigány Z. et al., 2013; Kageyama S. et al., 2015]. Несмотря на экспериментальный характер исследований, авторы считают эффективным данный способ в борьбе с окислительным стрессом, увеличением провоспалительных цитокинов и нарушением микроциркуляции в печени при реперфузии.

Успешное применение ИП и дистантного прекондиционирования привело исследователей к изучению возможности использования коротких периодов общей гипоксии организма (гипоксическое прекондиционирование – ГП) для повышения устойчивости к синдрому ишемии-реперфузии органов [Lai I. R. et al., 2004; Маслов Л. Н. и др., 2010; Choukèr A. et al., 2012; Самойлов М. О. и др., 2012]. Преимуществом метода считается его неинвазивность, что сокращает время оперативного вмеша-

ства. Анализ способов проведения ГП печени показал, что существует значительная вариабельность по степени и кратности гипоксического воздействия на организм с целью повышения его устойчивости к ишемии и последующей реперфузии. Так, работе [Lai I. R. et al., 2004] для коррекции реперфузионных повреждений печени у крыс использовали 2-недельную адаптацию животных по 15 ч/день в гипобарической камере на высоте 5500 м. В другой работе [Choukèr A. et al., 2012] ГП печени моделировали путем короткого 10-минутного периода дыхания 10% O₂ газовой смеси с последующим переходом на дыхание 21% O₂ (10 мин.) перед основным ишемическим периодом. В обоих случаях исследователями получен протективный эффект, выражавшийся в снижении активности трансаминаз и цитокинов крови, уменьшении активности процессов ПОЛ и морфологических нарушений при ишемии-реперфузии печени (ИРП). Известно, что в адаптации организма к гипоксии важную роль играет изменение кислородсвязывающих свойств крови [Simonson T. S. et al., 2014]. Вместе с тем изменение параметров КТФ крови может существенно влиять на степень окислительных повреждений при реперфузии печени [Ходосовский М. Н., Зинчук В. В., 2014]. Так как вопрос о влиянии ГП на кислородсвязывающие свойства крови при ИРП оставался не ясным, изучили эффект ГП на состояние механизмов транспорта кислорода и окислительных повреждений печени у экспериментальных животных [Ходосовский М. Н., 2016].

7.1 Влияние гипоксического preconditionирования на параметры кислородтранспортной функции крови и окислительные повреждения при ишемии-реперфузии печени у кроликов

Опыты выполнены на взрослых кроликах-самцах массой 3,5-4,5 кг, предварительно выдержанных в стандартных условиях вивария. Под комбинированным внутривенным наркозом (гексенал 30 мг/кг; калипсол 100 мг/кг) вводили катетеры: один – в *v. hepatica* для забора печёночной венозной крови, другой – в правое предсердие для получения смешанной венозной крови. Ишемию печени вызывали маневром Прингла (*Pringle maneuver*) в течение 30 минут. После снятия зажима реперфузионный период длился 120 минут. Забор образцов крови для оценки параметров

КТФ, ПОЛ и антиоксидантной системы в крови осуществляли до и после ишемии, а также в конце реперфузионного периода. Функциональное состояние печени оценивали по активности АлАТ и АсАТ кинетическим методом с помощью стандартного набора реактивов фирмы “Cormay” (Польша). 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 2 экспериментальные группы: в 1-й группе (ИРП, $n=11$) моделировали ИРП; во 2-й группе (ГП, $n=9$) животных до эксперимента подвергали «подъему» на высоту 3500 м [Тиньков А. Н. и др., 2005] в гипобарической камере, где они находились в течение 1 часа. Подъемы в гипобарической камере проводили через день, 3 раза в течение недели, ИРП моделировали через 70 часов после последнего подъема. Показатели КТФ крови и прооксидантно-антиоксидантного баланса оценивали, как изложено в предыдущих главах. Статистическую обработку результатов проводили непараметрическими методами. Для оценки достоверности отклонения показателя внутри группы использовали критерий Вилкоксона, между группами – Манна-Уитни (U-тест). Достоверными считали различия при $p<0,05$.

Изменение маркерных ферментов повреждения печени в печеночной и смешанной венозной крови при моделировании синдрома ИРП у кроликов представлено в табл. 9 и 10 (см. приложение). Установлено, что у экспериментальных животных 1-й группы в конце ишемии активность АлАТ в плазме печеночной и смешанной венозной крови повышалась в 5,22 ($p<0,001$) и 5,18 ($p<0,001$) раза, АсАТ – в 4,63 ($p<0,001$) и 4,0 ($p<0,001$) раза, соответственно. В реперфузионном периоде рост активности трансаминаз в печеночной и смешанной венозной крови продолжался и превышал исходный уровень АлАТ в 11,22 ($p<0,001$) и 12,56 ($p<0,001$) раза, АсАТ – в 10,42 ($p<0,001$) и 11,0 ($p<0,001$) раз, соответственно. Данные изменения указывают на развитие тяжелых реперфузионных повреждений гепатоцитов при моделировании синдрома ИРП. Проведение животным 2-й группы курса ГП сопровождалось ростом активности АлАТ и АсАТ в печеночной венозной крови в конце ишемического периода в 2,95 ($p<0,001$) и 2,7 ($p<0,001$) раза, что было на 40,4% ($p<0,01$) и 38,6 % ($p<0,05$)

меньше, чем активность данных трансаминаз у кроликов 1-й группы в печеночной венозной крови в соответствующем периоде. Схожая динамика изменения активности АлАТ и АсАТ наблюдалась в смешанной венозной крови (табл. 10, приложение). В конце реперфузии у кроликов 2-й группы уровни АлАТ и АсАТ в печеночной венозной крови превосходили исходные в 3,4 ($p<0,001$) и 3,2 ($p<0,001$) раза, а в смешанной венозной крови – в 3,0 ($p<0,001$) и 2,6 ($p<0,001$) раза, соответственно. Данная активность трансаминаз крови в конце реперфузии у кроликов 2-й группы была существенно ниже таковой по отношению к животным 1-й группы (табл. 9 и 10, приложение), что указывает на улучшение функционального состояния печени в реперфузионном периоде под влиянием ГП.

Изменения основных показателей КТФ печёночной и смешанной венозной крови у экспериментальных животных 1-й группы указывали на развитие нарушений в механизмах транспорта кислорода (табл. 9 и 10, приложение). Так, у кроликов 1-й группы ишемия печени приводила к уменьшению pO_2 на 46,15% ($p<0,05$) и к увеличению показателя pCO_2 на 41,67% ($p<0,05$) по отношению к исходному уровню в крови, оттекающей от печени. В конце реперфузионного периода показатель pO_2 не отличался от исходного, тогда как pCO_2 оставался выше на 8,28% ($p<0,05$). Показатели кислотно-основного состояния у кроликов 1-й группы на протяжении ИРП в обоих образцах крови снижались. Так, на 30 минуте ишемии в печеночной венозной крови показатель HCO_3^- понизился на 23,2% ($p<0,05$), TCO_2 – на 19,86% ($p<0,05$), а SBC – на 33,6% ($p<0,05$) по отношению к исходному уровню. В конце реперфузионного периода в печеночной венозной крови показатели HCO_3^- , TCO_2 и SBC были ниже исходного уровня на 29,96% ($p<0,05$), 26,24% ($p<0,05$) и 33,6% ($p<0,05$), соответственно. В смешанной венозной крови на 120-й минуте реперфузии у животных 1-й группы показатели pO_2 и pCO_2 не изменялись, тогда как параметры pH , HCO_3^- , TCO_2 , ABE , SBE , SBC проявляли схожую динамику изменений как в печеночной венозной крови (табл. 10, приложение). В конце ишемического периода у кроликов 1-й экспериментальной группы наблюдалось увеличение $p50_{\text{реал}}$ на 20,55% ($p<0,05$) и 28,53% ($p<0,05$) в печеночной и смешанной венозной крови, соответственно (табл. 9, приложение). В конце реперфузии в печеночной и смешанной венозной крови

снижение СГК сохранялось: $p50_{\text{реал}}$ был выше исходного на 29,75% ($p<0,05$) и 25,1% ($p<0,05$) соответственно, что указывает на сдвиг КДО вправо (рис. 31). Данные изменения показателей КТФ крови в 1-й группе животных сопровождались ростом активности процессов ПОЛ и трансаминаз крови. Так, на 120-й минуте реперфузии в печеночной и смешанной венозной крови по отношению к исходному уровень ДК повышался в 4,0 ($p<0,05$) и 4,04 ($p<0,05$) раза, содержание ОШ увеличивалось на 54,97% ($p<0,05$) и 48,1% ($p<0,05$), соответственно (табл. 9 и 10, приложение).

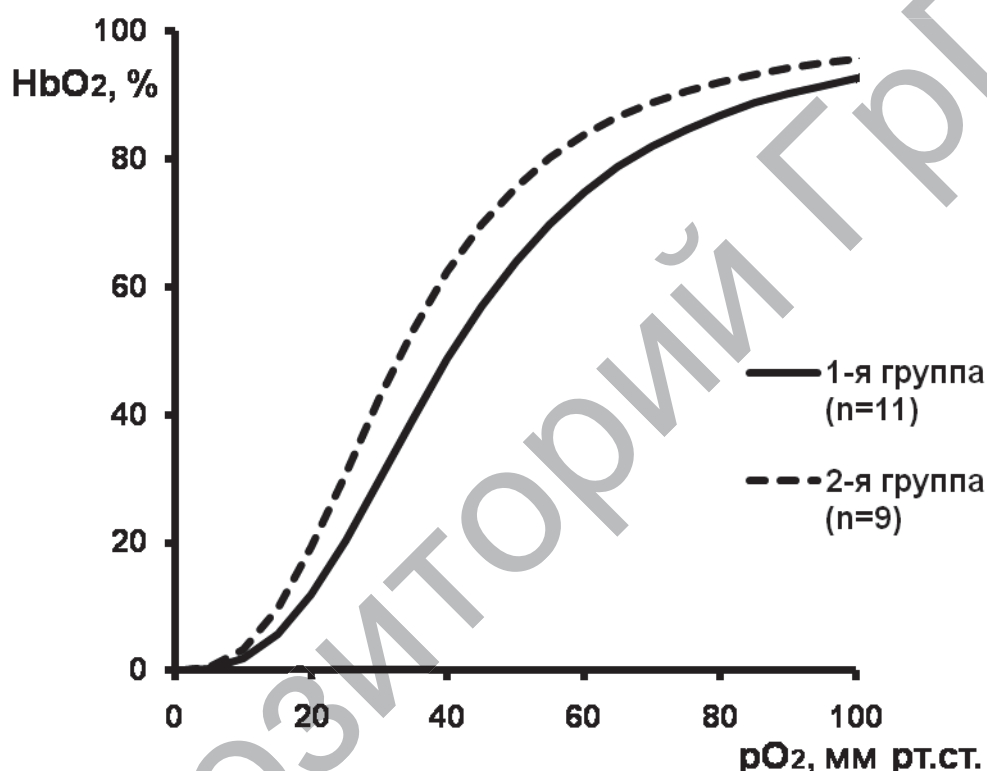


Рисунок 31. – Влияние гипоксического preconditionирования на положение кривых диссоциации оксигемоглобина, рассчитанных по показателям $p50_{\text{реал}}$ смешанной венозной крови, на 120-й минуте реперфузии у кроликов

У животных, которым проводили курс ГП (2-я группа), наблюдалось улучшение показателей КТФ крови на протяжении ишемии-реперфузии печени (табл. 9 и 10, приложение). Установлено, что курс ГП способствовал снижению исходного $p50_{\text{реал}}$ печеночной венозной крови на 10,4% ($p<0,05$) по отношению к исходному значению показателя в 1-й группе. В конце ишемического периода показатель pO_2 печеночной венозной крови понизился

на 35,0% ($p < 0,05$), параметры pH , HCO_3^- , ABE, SBE, SBC снижались, а показатели $p50_{\text{реал}}$ и TCO_2 существенно не изменялись по отношению к исходным уровням, при этом $p50_{\text{реал}}$ был ниже, чем у животных 1-й группы, на 14,5% ($p < 0,05$) (табл. 9, приложение). В смешанной венозной крови на 30-й минуте ишемии у животных 2-й группы показатели $p50_{\text{реал}}$, pH , ABE, SBE, SBC были существенно лучше, чем у кроликов 1-й группы (табл. 10, приложение).

На 120-й минуте реперфузии у кроликов группы ГП в смешанной венозной крови большинство показателей КТФ крови не отличались от исходного уровня, а показатели $p50_{\text{реал}}$, pH , HCO_3^- , TCO_2 , ABE, SBE, SBC были лучше, чем в 1-й группе. В печеночной венозной крови в конце реперфузионного периода наблюдалась схожая динамика изменений показателей КТФ крови. ГП способствовало снижению уровня продуктов ПОЛ после ишемии. Так, у животных 2-й группы в конце реперфузионного периода в печеночной и смешанной венозной крови по отношению к кроликам 1-й группы уровень ДК понижался в 3,9 ($p < 0,01$) и 3,2 ($p < 0,01$) раза, содержание ОШ падало на 31,4% ($p < 0,01$) и 20,9% ($p < 0,01$), соответственно (табл. 9 и 10, приложение). Схожая динамика изменений продуктов ПОЛ в конце реперфузии наблюдалась в тканях печени (рис. 32). Одновременно под воздействием ГП улучшались параметры антиоксидантной системы (рис. 33).

Установлено, что ишемия печени, вызванная маневром Прингла, приводила к развитию метаболического ацидоза у кроликов 1-й группы (судя по показателям pH , ABE, SBE и SBC). Повышение показателя pCO_2 в исследуемой крови могло быть следствием застойных явлений и нарушения микроциркуляции в печени. Снижение СГК крови при ишемии (судя по росту показателей $p50_{\text{реал}}$), носило адаптивный характер, способствуя снижению дефицита O_2 в тканях органа.

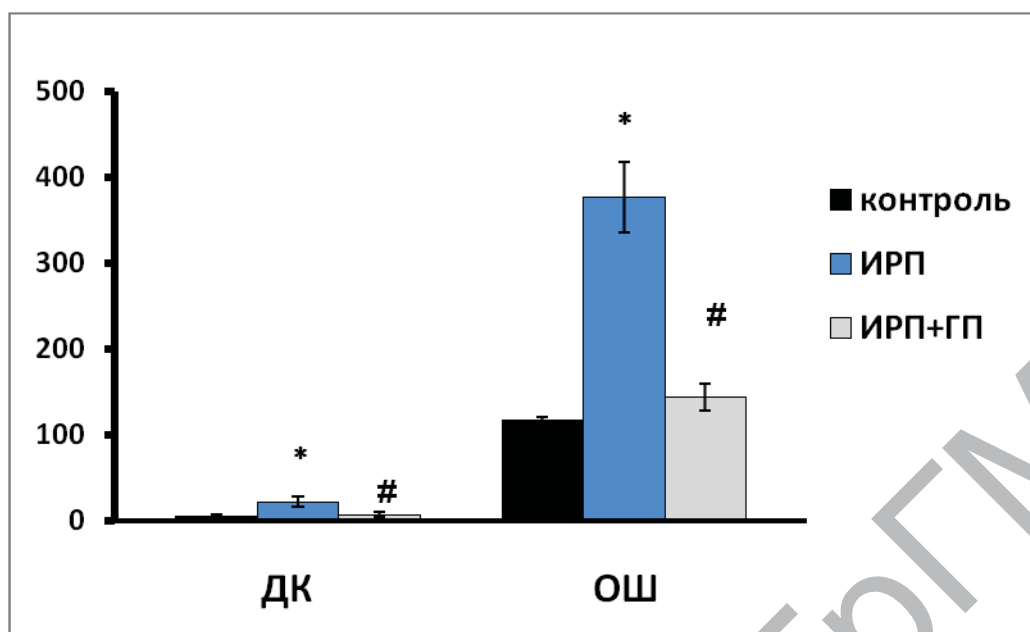


Рисунок 32. – Влияние гипоксического preconditionирования на содержание продуктов ПОЛ в гомогенате печени у кроликов (ЕД/г),
 * – достоверные различия по отношению к контролю ($p < 0,05$),
 # – достоверные различия по отношению к группе ИРП ($p < 0,05$)

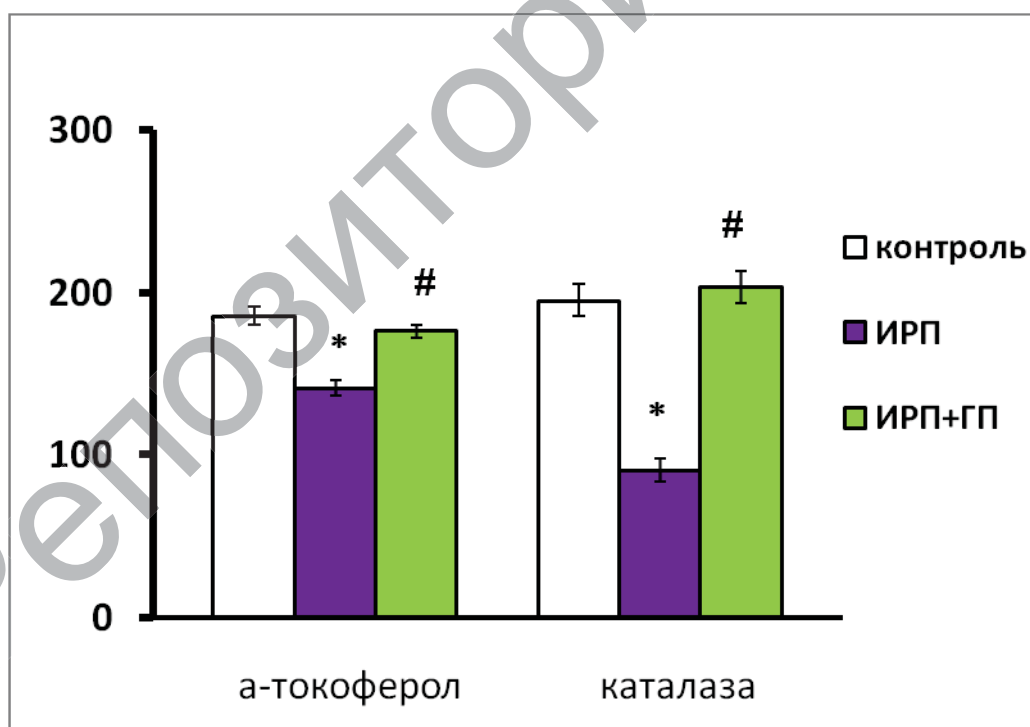


Рисунок 33. – Содержание α-токоферола (нмоль/г) и активность каталазы (ммоль H₂O₂ * мин / г белка) в печени экспериментальных животных

Вместе с тем сохранение сниженного СГК в реперфузионном периоде могло приводить к избыточному потоку кислорода в ткани и созданию условий для «относительной гипероксии» и окислительного стресса [Биленко М. В., 1989]. Это предположение подтверждается повышением содержания ДК и ОШ в крови в конце реперфузии у кроликов 1-й группы. Рост активности ПОЛ сопровождался повреждением гепатоцитов (судя по активности АЛАТ и АсАТ крови) у кроликов данной группы. Развитию окислительного стресса в печени могло способствовать истощение механизмов антиоксидантной защиты, которое наблюдали после ишемии органа у крыс 1-й группы вместе со снижением СГК при реперфузии. Восстановление pO_2 в печеночной венозной крови в конце реперфузии у кроликов 1-й группы могло носить патофизиологический характер, усиливая, наряду со сниженным СГК, дисбаланс между способностью тканей к полноценному восстановлению кислорода и его поступлением. Повышение доли неполного восстановления кислорода (т.н. «утечки» электронов) в митохондриях гепатоцитов способствует последующему повреждению клеточных и субклеточных мембранных структур свободнорадикальными процессами ПОЛ.

Проведение курса ГП у кроликов приводило к улучшению параметров кислотно-основного равновесия на протяжении экспериментов. Так, несмотря на снижение pH, ABE, SBE и SBC после ишемии, к концу реперфузионного периода эти показатели не отличались от исходных уровней в данной группе и были лучше, чем у животных 1-й группы. Очевидно, что ГП у кроликов приводило к меньшим метаболическим нарушениям в печени, возможно, за счет большей сопряженности процессов окислительного фосфорилирования, т.е. повышения эффективности тканевого дыхания снижает утечку электронов и интенсивность окислительного стресса при реперфузии [Hummitzsch L. et al., 2014]. Кроме того, трехкратное ГП способствует повышению экспрессии транскрипционных факторов, таких как ГИФ-1альфа, c-Fos, NF- κ B и др., что приводит к активации генов, продуцирующих проадаптивные белки, в частности, пептидные антиоксиданты, антиапоптотические белки семейства bcl-2, семейства стресс-белков HSP, эритропоэтин и другие, вовлекаемые в процессы выживания клеток при повреждающем воздействии [Самойлов М. О. и др., 2012]. Выявленные изменения СГК после ГП у жи-

вотных 2-й группы указывают на смещение кривой диссоциации оксигемоглобина влево на протяжении экспериментов в печеночной венозной крови и в конце реперфузии – в смешанной венозной крови по отношению к кроликам 1-й группы (рис. 30). Важно отметить, что на фоне повышенного СГК печеночной венозной крови сохранялось снижение pO_2 при небольшом увеличении показателя pCO_2 на 120-й минуте реперфузии у кроликов с ГП.

Факты повышения СГК, улучшения параметров кислотно-основного баланса и снижения уровня продуктов ПОЛ (судя по изменению ДК и ОШ) указывают на улучшение метаболических процессов и устранение условий для «относительной гипероксии» в печени в постишемическом периоде. Повышение СГК печеночной венозной крови с одновременным снижением в ней pO_2 при реперфузии печени может быть одним из механизмов, препятствующих деградации ГИФ-1альфа, с активностью которого связывают индукцию многих защитных эффектов при ишемии-реперфузии, таких как противовоспалительный, антиапоптотический, антиокислительный и метаболический [Akhtar M. Z. et al., 2014]. Показано, что ГИФ-1альфа способен активировать синтез гемоксигеназы-1, что улучшает функцию митохондрий гепатоцитов и снижает продукцию активных форм кислорода при ИРП [Zhong Z. et al., 2008]. Возможно, протективный эффект активации ГО-1 при ИРП связан с газотрансмиссивными свойствами монооксида углерода, который эндогенно образуется при активации данного фермента. Известно, что повышение СГК крови является одним из прямых эффектов СО на гемоглобин [Crocker G. H. et al., 2013]. Однако вопрос об участии СО в механизме протективного действия ГП при ИРП нуждается в дополнительных исследованиях.

Таким образом, ГП способствует повышению СГК крови, улучшает параметры кислотно-основного баланса и препятствует развитию окислительного стресса, что улучшает функциональное состояние печени при ишемии-реперфузии данного органа у кроликов. Протективный эффект ГП в большой степени обусловлен коррекцией механизмов транспорта кислорода кровью, что положительно влияет на метаболические процессы при ИРП.

7.2 Вклад монооксида углерода в протективный эффект гипоксического preconditionирования при синдроме ишемии-реперфузии печени

В предыдущем разделе показано, что гипоксическое preconditionирование (ГП) способно существенно улучшать параметры КТФ крови, прооксидантно-антиоксидантного баланса и функционального состояния печени при ИРП [Ходосовский М. Н., 2016], однако механизм данного эффекта остается до конца не изученным. Ранее сообщалось, что у крыс ГП приводит к индукции гемоксигеназы-1 (ГО-1), которая оказывает протективный эффект при ИРП [Lai I. R. et al., 2004]. Известно, что гемоксигеназа (ЕС:1.14.99.3), являясь неотъемлемым клеточным ферментом для всех эукариот, использующих гемопротейны в аэробных процессах окисления, способствует ферментативному распаду гема на биливердин, железо и монооксид углерода (СО) [Liu A. et al., 2014]. Однако в настоящее время, антиоксидантные свойства доказаны как для биливердина [Ollinger R. et al., 2007], так и для СО [Brugger J. et al., 2010]. Поэтому целью дальнейших исследований было изучение вклада монооксида углерода в механизм протективного влияния ГП на печень при моделировании синдрома ее ишемии-реперфузии у кроликов.

Кроликов разделили на 2 экспериментальные группы: в 1-й группе (n=8) животным выполняли курс ГП, после чего моделировали ишемию-реперфузию печени в условиях введения ингибитора ГО-1 – цинк-протопорфирин IX (ZnPP, Sigma, 0,5 мг/кг); во 2-й группе (n=7) опыты проводили как в 1-й группе, однако за 5 минут до начала реперфузии кролики получали донатор СО, трикарбонилхлоро(глицинат)рутениума(II) – CORM-3 (в/в, 20 мкмоль/кг). Химический синтез CORM-3 осуществляли по методике [Clark J. E. et al., 2003]. С целью ГП животных до эксперимента подвергали трехкратному «подъему» на высоту 3500 м в гипобарической камере, где они находились в течение 1 часа [Ходосовский М. Н., 2016]. Исследовали параметры КТФ крови, ПОЛ, АлАТ и АсАТ, как указано ранее (гл. 3). Статистическую обработку результатов проводили непараметрическими методами. Для оценки достоверности отклонения показателя внутри группы использовали критерий Вилкоксона, между группами –

Манна-Уитни (U-тест). Достоверными считали различия при $p < 0,05$.

Влияние ингибирования ГО-1 и введения на этом фоне донатора СО при ГП у кроликов с ИРП на параметры КТФ, ПОЛ и активность трансаминаз печеночной и смешанной венозной крови показано в табл.11 и 12 (приложение). Так, на 120-й минуте реперфузии у кроликов 1-й группы в печеночной и смешанной венозной крови по отношению к исходной активности АлАТ увеличивалась в 10,4 ($p < 0,001$) и 10,9 ($p < 0,001$) раза, активность АсАТ возрастала в 9,9 ($p < 0,05$) и 10,5 ($p < 0,05$) раза, соответственно. У животных 2-й группы в конце реперфузионного периода в печеночной и смешанной венозной крови по отношению к кроликам 1-й группы активность АлАТ понижалась на 65,9% ($p < 0,001$) и 67,2% ($p < 0,001$), соответственно, активность АсАТ уменьшалась на 62,8% ($p < 0,001$) и 71,4% ($p < 0,001$), соответственно (табл. 11 и 12, приложение).

Установлено, что в 1-й и 2-й группах моделирование ишемии печени методом Прингла приводило к уменьшению pO_2 печеночной венозной крови по отношению к исходному уровню на 66,7% ($p < 0,001$) и 60,6% ($p < 0,001$), соответственно (табл. 11, приложение). В смешанной венозной крови в 1-й и 2-й группах на 30-й минуте ишемии данный показатель снижался менее значительно, на 10,8% ($p < 0,05$) и 18,8% ($p < 0,05$), соответственно (табл. 12, приложение). Наблюдалось повышение показателя pCO_2 по отношению к исходному уровню в крови, оттекающей от печени, в 1-й группе – на 102,7% ($p < 0,05$), во 2-й группе – на 49,8% ($p < 0,05$) (табл. 11, приложение).

В смешанной венозной крови у кроликов 1-й и 2-й групп в конце ишемии показатель pCO_2 по отношению к исходному уровню увеличивался на 35,7% ($p < 0,05$) и 41,5% ($p < 0,05$), соответственно (табл. 12, приложение). В конце реперфузионного периода показатель pO_2 печеночной венозной крови у кроликов 2-й группы не отличался от исходного, тогда как в 1-й группе pO_2 оставался ниже на 14,7 % ($p < 0,05$). Показатель pCO_2 печеночной венозной крови в конце реперфузии по отношению к исходному уровню в обеих группах не изменялся (табл. 11, приложение). Показатели pO_2 и pCO_2 смешанной венозной крови на 120-й минуте реперфузии не отличались от исходных (табл. 12, приложение).

Параметры кислотно-основного состояния: pH, HCO_3^- , TCO_2 , ABE, SBE, SBC у кроликов 1-й и 2-й групп на протяжении ИРП в обоих образцах крови понижались (табл. 11 и 12, приложение). Так, на 30-й минуте ишемии в 1-й и 2-й группах животных в печеночной венозной крови показатель HCO_3^- понизился на 31,7% ($p<0,05$) и 29,6% ($p<0,05$), TCO_2 – на 22,2% ($p<0,05$) и 26,3% ($p<0,05$), а SBC – на 62,2% ($p<0,05$) и 41,9% ($p<0,05$), соответственно. Схожая динамика изменения данных показателей наблюдалась в смешанной венозной крови у животных обеих групп. В конце реперфузионного периода в 1-й группе в печеночной венозной крови показатели HCO_3^- , TCO_2 и SBC были ниже исходного уровня на 37,9% ($p<0,05$), 34,8% ($p<0,05$) и 44,7% ($p<0,05$), во 2-й группе – на 34,0% ($p<0,05$), 29,5% ($p<0,05$) и 35,2% ($p<0,05$), соответственно. В смешанной венозной крови на 120-й минуте реперфузии у животных обеих групп наблюдалась схожая динамика к снижению показателей HCO_3^- , TCO_2 и SBC (табл. 12, приложение).

В конце ишемического периода у кроликов 1-й и 2-й групп наблюдалось уменьшение $p50_{\text{станд}}$ на 56,2% ($p<0,05$) и 32,4% ($p<0,05$) в печеночной венозной крови, соответственно, тогда как показатель $p50_{\text{реал}}$ не изменялся (табл. 11, приложение). В конце ишемии в 1-й и 2-й группах в смешанной венозной крови $p50_{\text{реал}}$ был выше исходного на 32,3% ($p<0,05$) и 28,3% ($p<0,05$), соответственно. Выявлено, что в конце реперфузии $p50_{\text{реал}}$ у животных 1-й группы оставался повышенным в печеночной и смешанной венозной крови на 25,2% ($p<0,05$) и 22,7% ($p<0,05$), соответственно. Установлено, что у кроликов 2-й группы на 120-й минуте реперфузии уровень $p50_{\text{реал}}$ в печеночной венозной крови не отличался от исходного, а в смешанной – повышался на 18,7% ($p<0,05$). При этом в обоих образцах венозной крови у животных 2-й группы показатель $p50_{\text{реал}}$ был ниже, чем у кроликов 1-й группы в конце реперфузионного периода (табл. 11 и 12, приложение).

Ингибирование ГО-1 у кроликов 1-й группы приводило к росту содержания продуктов ПОЛ в обоих образцах венозной крови (табл. 11 и 12, приложение). Так, уровень ДК в печеночной и смешанной венозной крови в конце реперфузии повышался в 4,5 ($p<0,001$) и 5,4 ($p<0,001$) раза, ОШ – в 1,5 ($p<0,05$) и 1,4 ($p<0,05$) раза, соответственно. Инфузия донатора СО – CORM-3 – перед

началом реперфузионного периода способствовала снижению продуктов ПОЛ в плазме печеночной и смешанной венозной крови у кроликов 2-й группы по отношению к животным 1-й группы. Так, показатель ДК в печеночной и смешанной венозной крови в конце реперфузии снижался по отношению к 1-й группе на 67,8% ($p<0,001$) и 71,8% ($p<0,001$), ОШ – на 28,3% ($p<0,05$) и 27,9% ($p<0,05$), соответственно. Важно отметить, что во 2-й группе уровни ДК и ОШ в обоих образцах крови в конце реперфузии не отличались от исходных (табл. 11 и 12, приложение). Схожая динамика изменения ДК и ОШ в конце реперфузии наблюдалась у опытных животных в печени (рис. 34).

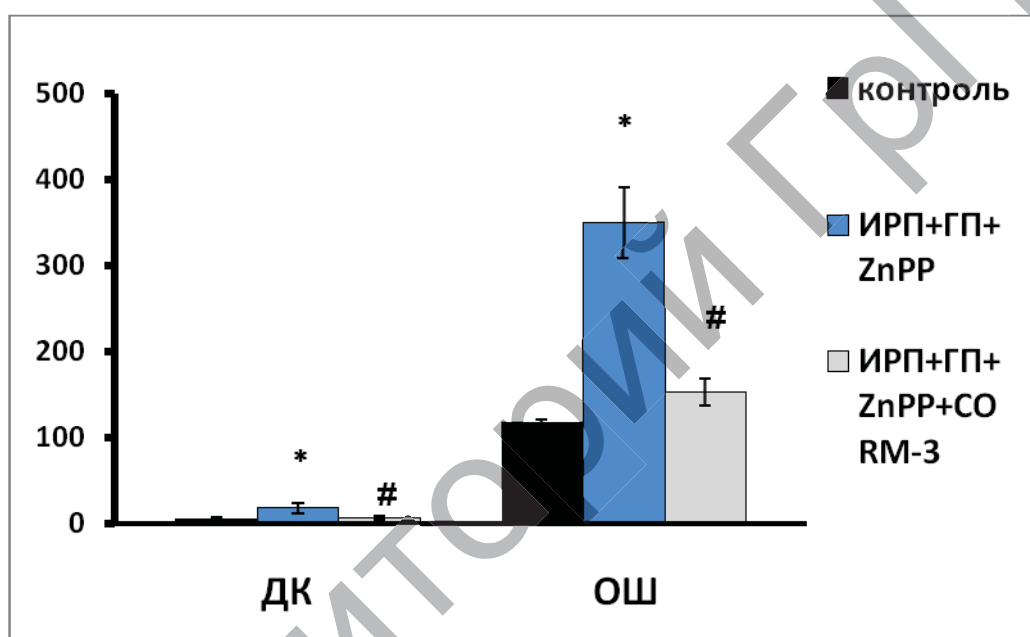


Рисунок 34. – Содержание продуктов ПОЛ в гомогенате печени у кроликов (ЕД/г), * – достоверные различия по отношению к контролю ($p<0,05$), # – достоверные различия по отношению к 1-й группе ($p<0,05$)

Активация процессов ПОЛ в 1-й группе сопровождалась истощением факторов антиоксидантной защиты в конце реперфузии, тогда как инфузия CORM-3 способствовала восстановлению параметров антиоксидантной защиты, которое обусловлено ГП (рис. 35).

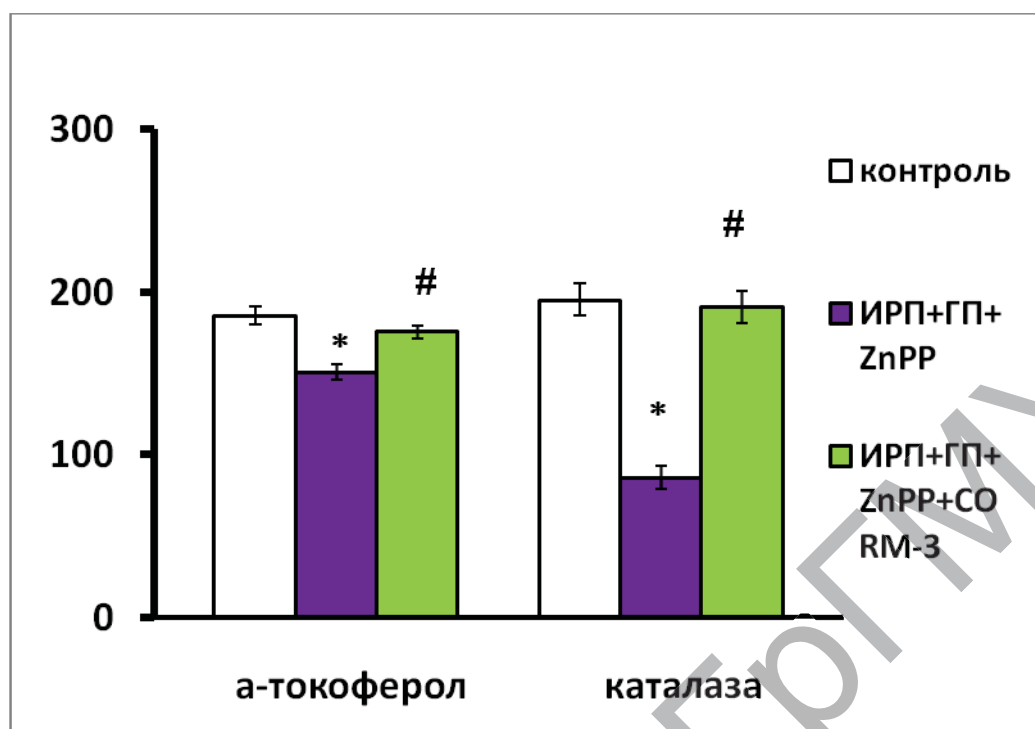


Рисунок 35. – Содержание α-токоферола (нмоль/г) и активность каталазы (ммоль H₂O₂ * мин/г белка) в печени экспериментальных животных

Данные исследований показали, что при ИРП у кроликов 1-й группы наблюдалось развитие метаболического ацидоза (судя по показателям pH, ABE, SBE и SBC). Повышение показателя pCO₂ в печеночной венозной крови могло быть следствием застойных явлений и нарушения микроциркуляции в печени. Снижение СГК крови в 1-й группе при ИРП (судя по росту показателя p50_{реал}) сопровождалось повышением активности процессов ПОЛ (увеличение ДК и ОШ) и повреждением ими мембранных структур клеток печени, приводившим к многократному росту активности трансаминаз крови (АлАТ и АсАТ). Результаты, полученные у животных 1-й группы, согласуются с данными работы [Lai I. R. et al. 2004], в которой установили снижение протективного эффекта ГП при ингибировании ГО-1 с помощью ZnPP по уровню АлАТ. По-видимому, снижение СГК крови и увеличение потока O₂ в ткани вначале реперфузии в 1-й группе способствовало усилению окислительных повреждений печени вследствие значительного нарушения редокс-состояния митохондрий [Go K. L. et al., 2015]. Показано, что повышение проницаемости мембран митохондрий под влиянием окислитель-

ного стресса при ИРП приводит к гибели гепатоцитов путем некроза или апоптоза [Kim J. S. et al., 2012].

Известно, что ишемия/гипоксия является главным условием, препятствующим деградации гипоксией индуцированного фактора-1-альфа (ГИФ-1а), который вызывает запуск многих защитных механизмов при ишемии-реперфузии [Zhong Z et al., 2008; Schneider M et al., 2010]. Очевидно, что снижение СГК крови и повышение потока O_2 в ткани способствовало ускорению гидроксигилирования ГИФ-1а в реперфузионном периоде. Последнее могло нивелировать независимые от ГО-1 пути протекции ГИФ-1а, что приводило к реперфузионным повреждениям печени у экспериментальных животных 1-й группы (судя по АлАТ и АсАТ). Вместе с тем известна способность ГО-1 стабилизировать работу митохондрий, препятствовать воспалению и апоптозу за счет антиоксидантных эффектов СО и биливердина при ИРП [Liu B., Qian J. M., 2015]. Чтобы исключить антиоксидантные эффекты билирубина или биливердина при активации ГО-1, вызванной ГП, у животных во 2-й группе на фоне ингибирования ГО-1 проводили инфузию донатора СО (CORM-3).

Выявлено, что ранее установленный защитный эффект ГП при ИРП [Ходосовский М. Н., 2016] практически полностью восстанавливается у кроликов 2-й группы (судя по активности процессов ПОЛ, АлАТ и АсАТ). Изменения $p50_{\text{реал}}$ у животных 2-й группы указывают на повышение СГК крови в конце реперфузии по отношению к кроликам 1-й группы, что может быть фактором лимитирования активности ПОЛ и окислительных повреждений (судя по изменению ДК и ОШ). Повышение СГК печеночной венозной крови при реперфузии печени может быть одним из механизмов, препятствующих деградации гипоксией индуцированного ГИФ-1а, с активностью которого связывают индукцию таких защитных эффектов при ИРП, как противовоспалительный, антиапоптотический и антиоксидантный [Schneider M. et al., 2010]. Показано, что ГИФ-1а способен улучшать функцию митохондрий гепатоцитов и снижать продукцию активных форм кислорода при ИРП [Zhong Z. et al., 2008]. Известно, что СО является мощным цитопротектором при сердечно-сосудистых заболеваниях, при сепсисе и шоке, трансплантации органов, острых поражениях легких, почек и печени [Bauer I., Pannen B. H., 2009]. СО в малых дозах может проявлять антиокислительную активность

путем активации генов антиоксидантных ферментов [Kim H. J. et al., 2011]. В целом ингибирование ГО-1 при коррекции реперфузионных повреждений печени у кроликов методом гипоксического preconditionирования приводит ухудшению кислородсвязывающих свойств крови и усилению окислительных повреждений органа. Применение донатора СО на фоне ингибирования ГО-1 восстанавливает защитный эффект гипоксического preconditionирования, препятствуя нарушениям механизмов транспорта кислорода и окислительному стрессу. Таким образом, газотрансмиссивные свойства СО вносят существенный вклад в эффективность гипоксического preconditionирования при ИРП.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Восстановление кислородного снабжения в ишемизированных тканях является абсолютно необходимым условием восстановления их функции. Вместе с тем возникновение реперфузионных осложнений в печени является важной проблемой современной трансплантологии, гепатологии и хирургии. Большинство механизмов реперфузионных повреждений печени прямо или косвенно связаны с поступлением кислорода в ткани и повышением генерации его активных свободнорадикальных форм. Повышенная генерация АФК с одновременной недостаточностью механизмов защиты от их токсического действия (окислительный стресс) в печени запускает ряд сложных патогенетических звеньев, которые приводят клетки к гибели при реперфузии [Guan L. Y. et al., 2014]. Прямое цитотоксическое действие АФК связано с повреждением белков, липидов, углеводов и ДНК [Владимиров Ю. А., Арчаков А. И., 1972; Jaeschke H., Woolbright B. L., 2012]. Высокая реакционная способность АФК позволяет им реагировать практически с любыми биологическими молекулами, но легче окисляются липиды биологических мембран, содержащие в своем составе жирные полиненасыщенные кислоты. Перекисное окисление последних, индуцируемое АФК, может привести к самым повреждающим эффектам при реперфузии [Zhang Q. L. et al., 2011].

Поскольку O_2 необходим для стадий инициации, продолжения и разветвления цепей реакций ПОЛ, pO_2 и СГК притекающей крови при возобновлении кровотока в печени могут существенно влиять на интенсивность протекания свободнорадикальных процессов. Установлено положительное влияние умеренной гипоксии и отрицательный эффект гипероксии при моделировании ишемии-реперфузии у кроликов [Zinchuk V. V. et al., 2003]. Данный факт позволяет предположить, что при реперфузии способность тканей к полноценному четырёхэлектронному восстановлению кислорода вследствие повреждения дыхательной цепи при ишемии существенно снижается, а сдвиг КДО вправо и увеличение потока O_2 в ткани только усугубляет дисбаланс между донорами и акцепторами электронов, что приводит к повышенной генерации АФК и последующим реперфузионным повреждениям. Действительно, в проведенных исследованиях установлено, что в

конце реперфузионного периода у животных при ИРП смещение КДО вправо сопровождалось накоплением продуктов ПОЛ, истощением факторов антиоксидантной системы, ростом активности АлАТ и АсАТ (гл. 2-6). Интересно отметить, что развитие окислительных повреждений происходило на фоне недостаточности L-аргинин-NO системы (судя по снижению NOx), расширения синусоидов и стаза в печени, что могло приводить к замедлению кровотока в органе (гл. 3, 6). В проведенных нами экспериментах на кроликах показано, что донаторы NO – нитроглицерин и нитропруссид натрия – обладают мощным защитным эффектом при ИРП [Ходосовский, М. Н., 2006, 2008]. Эффекты NO связывают с улучшением условий микроциркуляции, снижением синтеза молекул межклеточной адгезии, уменьшением инфильтрации печени лейкоцитами, повышением уровня АТФ в печени вследствие повышения сопряженности процессов окисления и фосфорилирования в митохондриях, что снижает освободнорадикальное повреждение последних [Abu-Amara M., 2012]. Более того, установлено, что донаторы NO могут улучшать параметры кислородтранспортной функции крови при реперфузии, снижая уровень ацидоза и повышая кислородсвязывающие свойства гемоглобина, тем самым уменьшая дисбаланс между способностью тканей полноценно утилизировать кислород и его доставкой в реперфузионном периоде [Ходосовский, М. Н., 2012]. Показано улучшение параметров антиоксидантной защиты под влиянием донаторов NO при ИРП [Ходосовский М. Н., 2008]. В целом донаторы монооксид азота (нитроглицерин и нитропруссид натрия) в остром реперфузионном периоде путем модификации кислородсвязывающих свойств крови, улучшения работы механизмов антиоксидантной защиты и коррекции дисбаланса между вазоконстрикторами и вазодилататорами способствуют уменьшению окислительных повреждений печени у опытных животных.

Использование донатора монооксид углерода у крыс также способствовало повышению СГК крови в конце реперфузии. Одновременно у крыс, получавших CORM-3, наблюдалось улучшение параметров кислотно-основного состояния крови (pH, HCO₃⁻, TCO₂, ABE, SBE, SBC), снижалась активность АлАТ и АсАТ. Уровень NOx у животных в опытной группе, получавших CORM-3, не отличался от контроля, что указывает на нормализацию функционирования L-аргинин-NO системы. Возможно, ис-

пользование донатора СО при ишемии-реперфузии приводило к стабилизации митохондриальных мембран и снижению гибели клеток механизмами апоптоза [Sener A. et al., 2013]. В работе [Lo Iacono L. et al., 2011] показано, что использование небольших доз CORM-3 (от 1 до 20 мкМ) существенно повышает эффективность тканевого дыхания и способствует уменьшению наработки перекиси водорода комплексом II митохондрий. Эти результаты согласуются с данными, полученными в нашем исследовании, о нормализации активности СДГ и НАДН-ДГ в печени в конце реперфузионного периода, что свидетельствует об улучшении транспорта электронов в дыхательной цепи митохондрий и активации цикла трикарбоновых кислот под влиянием небольших доз СО. С другой стороны, СО может снижать экспрессию мРНК провоспалительных цитокинов (ИЛ-6, α -TNF), что снижает при реперфузии интенсивность окислительного стресса, связанного с лейкоцитарной инфильтрацией паренхимы печени [Kaizu T. et al., 2008]. Нельзя исключить прямых антиоксидантных эффектов монооксида углерода при использовании CORM-3 у экспериментальных животных [Bauer I., Pannen B. H., 2009].

Полученные данные свидетельствуют о том, что у крыс при использовании донатора сероводорода в условиях ИРП наблюдается улучшение параметров КТФ крови, прооксидантно-антиоксидантного баланса в крови и тканях печени, отдельных морфометрических и гистохимических показателей печени. Повышение СГК крови у крыс, получавших NaHS, могло оказывать схожий положительный эффект на прооксидантно-антиоксидантное состояние, лимитируя долю O_2 в свободнорадикальных процессах ПОЛ. NaHS не нарушал активность НАДН-ДГ при ИРП и способствовал восстановлению активности СДГ и КФ в печени в конце реперфузии. Восстановление активности КФ у крыс, получавших NaHS, указывает на улучшение процессов внутриклеточного пищеварения и защиты. Последнее подтверждается повышением активности каталазы и уровня GSH, а также нормализацией содержания α -токоферола и ретинола в печени крыс, получавших NaHS при ИРП. Результаты исследования согласуются с данными других авторов, которыми установлена антиокислительная и антиапоптотическая функция H_2S [Jha S. et al., 2008], а также способность изменять тонус синусоидов печени [Norris E. J. et al., 2013].

Проведенные исследования показали, что 1-МНА оказывает протективный эффект при ИРП, который выражается в улучшении кислородсвязывающих свойств крови, параметров кислотно-основного состояния, снижении концентрации продуктов ПОЛ, повышении уровня ряда антиоксидантов и уменьшении активности маркеров повреждения печени – АлАТ и АсАТ. Изучение механизма данного эффекта 1-МНА при ИРП выявило зависимость между использованием препарата, эндогенной продукцией сероводорода и активностью простаглицлиновых рецепторов. Показано, что H₂S способен повышать активность циклооксигеназы-2 и образование простаглицлина [Li Y. et al., 2014], что играет важную роль в регуляции баланса между вазоконстрикторами и вазодилататорами. Кроме того, антиоксидантный эффект 1-МНА может реализовываться через повышение уровня и активности сиртуина-1 в печени путем торможения его убиквитинизации [Pissios P., 2017]. Установлено, что H₂S легко вступает в реакцию с АФК, оказывая прямой антиоксидантный эффект, сравнимый с эффектами классических антиоксидантов цистеина и GSH [Li Q., Lancaster J. R. Jr., 2013]. При этом сероводород гасит свободные радикалы как химический восстановитель и защищает эндотелий от окислительного стресса [Al-Magableh, M. R. et al., 2014; Xie Z. Z. et al., 2016]. Опыты с ингибированием цистатионин-γ-лиазы с помощью ПАГ у крыс показали, что 1-МНА реализует свой протективный эффект при ИРП преимущественно за счет газотрансмиттерных свойств сероводорода.

Установлено, что мелатонин в дозе 10 мг/кг при ИРП вызывает улучшение параметров КТФ крови, антиоксидантной системы, сдвиг КДО влево, снижение активности процессов ПОЛ и повышение активности каталазы в эритроцитах и печени, что согласуется с другими исследованиями, установившими протективный эффект препарата при повреждении печени токсического генеза [Shaker M. E. et al., 2009]. Снижение активности процессов ПОЛ под влиянием мелатонина могло быть связано с уменьшением потока O₂ и образования его свободных радикалов в тканях печени после ишемии вследствие повышения СГК крови, а также с улучшением работы антиоксидантных ферментов под влиянием мелатонина. Известно, что мелатонин может прямо взаимодействовать с гидроксильным радикалом, образуя 3-гидроксимелатонин, который затем выводится с мочой [Tan D.

Х. et al., 2007]. Кроме того, мелатонин может взаимодействовать с перекисью водорода и другими активными формами кислорода, устраняя последние в так называемом «антиоксидантном каскаде мелатонина» [Mathes A. M., 2010]. Вместе с тем показано, что мелатонин может уменьшать экспрессию индуцибельной, и повышать активность конституциональной NO-синтазы, тем самым увеличивая уровень оксида азота в ткани при ИРП [Park S. W. et al., 2007]. Оптимизируя уровни NO, мелатонин может модифицировать кислородсвязывающие свойства крови, препятствует участию избытка оксида азота в формировании токсических продуктов, таких как пероксинитрит, и последующее усиление свободнорадикальных процессов в печени при реперфузии [Зинчук В. В. и др., 2013]. Ингибирование NO-синтазы с помощью L-NAME нивелировало защитный эффект мелатонина при ИРП на параметры КТФ крови, прооксидантно-антиоксидантного состояния крови и печени. Таким образом, механизм протективных влияний мелатонина на параметры КТФ крови, прооксидантно-антиоксидантного баланса опосредован его влиянием на NO-синтазную функцию организма.

Установлено, что протективный эффект эритропоэтина на параметры кислородтранспортной функции крови, прооксидантно-антиоксидантного баланса и морфофункционального состояния печени при моделировании синдрома ишемии-реперфузии в условиях ингибирования синтеза сероводорода снижается, что может отражать участие данного газотрансммитера в механизме протективного действия ЭПО при развитии реперфузионного синдрома в печени. Известно, что предварительное введение ЭПО кроликам за 30 минут до инъекции липополисахарида способствовало улучшению параметров КТФ крови, повышению SGK через NO-зависимый механизм, снижению окислительного стресса [Зинчук В. В. и др., 2010]. Активация продукции ЭПО в организме опосредуется гипоксией индуцируемым фактором 1-альфа, ответственным за активацию транскрипции эритропоэтиновой информационной РНК, синтез фактора роста эндотелия сосудов, индуктора ангиогенеза, увеличивающего потребление кислорода тканями [Захаров Ю. М., 2007]. Возможно, окислительный стресс при ИРП препятствует реализации физиологических защитных эффектов гипоксией индуцируемого фактора 1-альфа, тогда как введение ЭПО перед ИРП напрямую активирует рецеп-

торы чувствительных к нему клеток, что приводит к коррекции реперфузионных повреждений органа. Цитопротективный эффект краткосрочного использования ЭПО связывают со способностью этого гликопротеина ингибировать механизмы апоптоза, подавлять экспрессию провоспалительных цитокинов, процессы перекисного окисления липидов, улучшать функцию эндотелия и условия микроциркуляции [Bahcekapili N. et al., 2007; Shawky H. M. et al., 2012].

Установлено, что при ингибировании ГО-1 у кроликов протективный эффект ГП при ИРП снижается. Полученные результаты согласуются с данными работы [Lai I. R. et al. 2004], в которой установили снижение протективного эффекта ГП при ингибировании ГО-1 с помощью ZnPP по уровню АлАТ. По-видимому, снижение СГК крови и увеличение потока О₂ в ткани вначале реперфузии в 1-й группе способствовало усилению окислительных повреждений печени вследствие значительного нарушения редокс-состояния митохондрий [Go K. L. et al., 2015]. Показано, что повышение проницаемости мембран митохондрий под влиянием окислительного стресса при ИРП приводит к гибели гепатоцитов путем некроза или апоптоза [Kim J. S. et al., 2012]. Известно, что ишемия/гипоксия является главным условием, препятствующим деградации ГИФ-1а, который вызывает запуск многих защитных механизмов при ишемии-реперфузии [Zhong Z et al., 2008; Schneider M et al., 2010]. Очевидно, что снижение СГК крови и повышение потока О₂ в ткани способствовало ускорению гидроксилирования ГИФ-1а в реперфузионном периоде. Последнее могло нивелировать независимые от ГО-1 пути протекции ГИФ-1а, что приводило к реперфузионным повреждениям печени у экспериментальных животных (судя по АлАТ и АсАТ). Вместе с тем, известна способность ГО-1 стабилизировать работу митохондрий, препятствовать воспалению и апоптозу за счет антиоксидантных эффектов СО и биливердина при ИРП [Liu B., Qian J. M., 2015]. Чтобы исключить антиоксидантные эффекты билирубина или биливердина при активации ГО-1, вызванной ГП, на фоне ингибирования ГО-1 проводили инфузию донатора СО (CORM-3). Выявлено, что у животных с CORM-3 ранее установленный защитный эффект ГП при ИРП [Ходосовский М. Н., 2016] полностью восстанавливается (судя по СГК, активности процессов ПОЛ, АлАТ и АсАТ). Повышение СГК крови может

быть фактором лимитирования активности ПОЛ и окислительных повреждений (судя по изменению ДК и ОШ), а также одним из механизмов, препятствующих деградации ГИФ-1а, с активностью которого связывают индукцию таких защитных эффектов при ИРП, как противовоспалительный, антиапоптотический и антиоксидантный [Schneider M. et al., 2010]. Показано, что ГИФ-1а способен улучшать функцию митохондрий гепатоцитов и снижать продукцию активных форм кислорода при ИРП [Zhong Z. et al., 2008]. Известно, что СО является мощным цитопротектором при сердечно-сосудистых заболеваниях, при сепсисе и шоке, трансплантации органов, острых поражениях легких, почек и печени [Bauer I., Pannen B. H., 2009]. СО в малых дозах может проявлять антиокислительную активность путем активации генов антиоксидантных ферментов [Kim H. J. et al., 2011]. В целом ингибирование гемоксигеназы-1 при коррекции реперфузионных повреждений печени у кроликов методом ГП приводит к ухудшению кислородсвязывающих свойств крови и усилению окислительных повреждений органа. Применение донатора СО на фоне ингибирования гемоксигеназы-1 восстанавливает защитный эффект ГП, препятствуя нарушениям механизмов транспорта кислорода и окислительному стрессу. Таким образом, газотрансмиссивные свойства СО во многом определяют эффективность гипоксического preconditionирования при ИРП.

Анализ данных вклада газотрансмиссивов в механизмы разных способов коррекции реперфузионных повреждений печени выявил их схожие эффекты на параметры КТФ крови, прооксидантно-антиоксидантный статус и морфофункциональное состояние печени, что схематично отражено на рис. 36.

Таким образом, моделирование синдрома ишемии-реперфузии печени у крыс приводит к нарушению параметров КТФ крови, снижению СГК, смешанному ацидозу, недостаточности L-аргинин-NO системы, полнокровию синусоидных капилляров с эритростазами, ухудшению прооксидантно-антиоксидантного состояния в крови и тканях печени, что отражает развитие окислительного стресса и реперфузионных повреждений органа. Использование донатора монооксид углерода и сероводорода в условиях ишемии-реперфузии печени улучшает механизмы транспорта кислорода, состояние L-аргинин-NO системы прооксидантно-антиоксидантного и функциональное со-

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Биленко, М. В. Ишемические и реперфузионные повреждения органов (молекулярные механизмы, пути предупреждения и лечения) / М. В. Биленко. – М.: Медицина, 1989. – 267 с.
2. Бучаченко, А. Л. Зависимость митохондриального синтеза АТФ от ядерного магнитного момента ионов магния / А. Л. Бучаченко [и др.] // Доклады академии наук. – 2004. – Т. 396, № 6. – С. 828-830.
3. Владимиров, Ю. А. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах / Ю. А. Владимиров, А. И. Арчаков // М.: Наука, 1972. – 252 с.
4. Гаврилов, В. Б. Измерение диеновых конъюгатов в плазме крови по УФ-поглощению гептановых и изопропанольных экстрактов / В. Б. Гаврилов, А.Р. Гаврилова, А. Ф. Хмара // Лаб. дело.- 1988.- № 2. – С. 60-64.
5. Добродей, М. А. Кислородтранспортная функция крови, уровень газотрансмиттеров и прооксидантно-антиоксидантное состояние при хронической обструктивной болезни легких / М. А. Добродей [и др.] // Журнал ГрГМУ. – 2016. – № 2. – С. 92-97.
6. Захаров, Ю. М. Неэритропоэтические функции эритропоэтина / Ю. М. Захаров // Росс. физиол. журн. им. Сеченова. – 2007. – Т. 93, № 6. – С. 592-608.
7. Зинчук, В. В. Влияние мелатонина на кислородзависимые процессы / В. В. Зинчук [и др.] // Эксперим. и клин. фармакол. – 2013. – Т. 76, № 2. – С. 32-36.
8. Зинчук, В. В. Влияние эритропоэтина на кислородтранспортную функцию крови и прооксидантно-антиоксидантное состояние у кроликов при введении липополисахарида / В. В. Зинчук, Е. В. Шульга, И. Э. Гуляй // Росс. физиол. журн. им. Сеченова. – 2010. – Т. 96, № 1. – С. 43-49.
9. Зинчук, В. В. Кислородсвязывающие свойства гемоглобина и монооксид азота / В. В. Зинчук, Н. В. Глуткина // Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. – 2013. – Т. 99, № 5. – С. 537-554.

10. Зинчук, В. В. Роль кислородсвязывающих свойств крови и газотрансмиттеров в развитии оксидативных повреждений и гипоксических состояний / В. В. Зинчук // Новости медико-биологических наук. – 2016. – Т. 14, № 4. – С. 55-63.
11. Зинчук, В. В. Участие кислородзависимых процессов в патогенезе реперфузионных повреждений печени / В. В. Зинчук, М. Н. Ходосовский // Успехи физиол. наук. – 2006. – Т. 37, № 4. – С. 45-56.
12. Зинчук, В. В. Эритропоэтин и кислородтранспортная функция крови / В. В. Зинчук, С. В. Глуткин, Е. В. Шульга // Эксперим. и клин. фармакол. – 2012. – Т. 75, № 1. – С. 39-42.
13. Камышников, В. С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике: в 2 т. / В.С. Камышников. – 2-е изд. – Мн.: Беларусь, 2002. – Т. 1. – 465 с.
14. Королюк, М. А. Измерение активности каталазы в биологических средах / М. А. Королюк, Л. И. Иванова, И. Г. Майорова, В. Е. Токарев // Лаб. дело.- 1988. – № 1. – С. 16-19.
15. Костюкевич, Н. Трансплантолог Олег Руммо о том, как, кому и за сколько в Беларуси пересаживают органы [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://news.tut.by/society/497067.html>. – Дата доступа: 20.05.2016.
16. Кузнецов, Д. А. Влияние изотопии магниевого пула на восстановление митохондриального синтеза АТР, подавленного 1-метилникотинамидом / Д. А. Кузнецов [и др.] // Биомед. химия. – 2006. – Т. 52, № 2. – С. 146–152.
17. Маслов, Л. Н. Гипоксическое preconditionирование феномен, обеспечивающий повышение толерантности кардиомиоцитов к гипоксии/реоксигенации / Л. Н. Маслов [и др.] // Росс. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. – 2010. – Т. 96, № 12. – С.1170-1189.
18. Петрова, И. В. Влияние сероводорода на коллаген-индуцированную агрегацию тромбоцитов человека / И. В. Петрова [и др.] // Росс. физиол. журнал им. И. М. Сеченова. – 2015. – № 10. – С. 1191-1201.
19. Реутов, В. П. Исследование механизмов регуляторного и токсического действия нитритов и NO-генерирующих веществ в биологических системах / В. П. Реутов [и др.] // Активные формы кислорода, азота и хлора в регуляции клеточных

функций в норме и при патологии: Материалы Международного симпозиума, 28-29 сентября 2006 г.: в 2 ч. / Ин-т фармакологии и биохимии НАН РБ ; редкол.: И. И. Степура (отв. ред.) [и др.]. – Гродно, 2006. – Ч. 2. – С. 83–90.

20. Руммо, О. О. Семь лет трансплантации печени в Республике Беларусь / О. О. Руммо // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2015. – Т. 17, № 2. – С.100-104.
21. Самойлов, М. О. Сигнальные молекулярные и гормональные механизмы формирования протективных эффектов гипоксического preconditionирования / М. О. Самойлов, Е. А. Рыбникова, А. В. Чурилова // Патол. физиол. и эксперим. терапия. – 2012. – № 3. – С. 3-10.
22. Тиньков, А.Н. Оценка показателей электрической нестабильности сердца у больных инфарктом миокарда в ходе амбулаторно-поликлинического этапа реабилитации с применением метода барокамерной гипоксии / А. Н. Тиньков, А. Б. Прокофьев, М. В. Гринцова // Вестник аритмологии. – 2005. – № 39. – С. 31-34.
23. Улащик, В. С. Современные представления о биологической роли эндогенного сероводорода / В. С. Улащик // Здоровоохранение. – 2012. – № 1. – С.42-48.
24. Ходосовский, М. Н. Влияние донора сероводорода на параметры прооксидантно-антиоксидантного баланса при ишемии-реперфузии печени у крыс / М. Н. Ходосовский, В. В. Зинчук, И. Э. Гуляй // Эксперим. и клин. фармакол. – 2017. – Т. 80, № 5. – С. 22-26.
25. Ходосовский, М. Н. Участие сероводорода в механизме защитного действия эритропоэтина на печень при синдроме ишемии-реперфузии / М. Н. Ходосовский, В. В. Зинчук, И. Э. Гуляй // Журнал ГрГМУ. – 2017. – № 1. – С. 57-61.
26. Ходосовский, М. Н. Роль кислородтранспортной функции крови в реализации защитных эффектов монооксида углерода при синдроме ишемии-реперфузии печени / М. Н. Ходосовский, В. В. Зинчук // Патогенез. – 2016. – Т. 14, № 1. – С. 57-61.
27. Ходосовский, М. Н. Роль кислородтранспортной функции крови в механизме протективного действия ишемического preconditionирования на печень / М. Н. Ходосовский

- // Росс. физиол. журнал им. И.М. Сеченова. – 2016. – Т. 102, № 8. – С. 940-951.
28. Ходосовский, М. Н. Влияние гидросульфида натрия на параметры кислородтранспортной функции крови при ишемии-реперфузии печени у крыс / М. Н. Ходосовский // Росс. физиол. журнал им. И.М. Сеченова. – 2016. – Т. 102, № 6. – С. 698-704.
29. Ходосовский, М. Н. Влияние гипоксического preconditionирования на механизмы транспорта кислорода и окислительные повреждения при синдроме ишемии-реперфузии печени у кроликов / М. Н. Ходосовский // Фізіол. журн. – 2016. – Т. 62, № 3. – С.39-47.
30. Ходосовский, М. Н. Влияние монооксида углерода на параметры прооксидантно-антиоксидантного баланса при ишемии-реперфузии печени у крыс / М. Н. Ходосовский, В. В. Зинчук, И. Э. Гуляй // Росс. физиол. журнал им. И. М. Сеченова. – 2015. – № 10. – С. 1150-1157.
31. Ходосовский, М. Н. Влияние нитроглицерина на прооксидантно-антиоксидантный баланс и функциональное состояние печени при ишемии-реперфузии / М. Н. Ходосовский, В. В. Зинчук // Бюлл. эксперим. биологии и медицины. – 2006. – № 12. – С. 631-634.
32. Ходосовский, М. Н. Влияние нитропруссиды натрия на кислородсвязывающие свойства крови при ишемии-реперфузии печени у кроликов / М. Н. Ходосовский, В. В. Зинчук // Росс. физиол. журнал им. И. М. Сеченова. – 2012. – № 5. – С. 610-617.
33. Ходосовский, М. Н. Влияние нитропруссиды натрия на прооксидантно-антиоксидантную систему печени при ее ишемии-реперфузии у кроликов / М. Н. Ходосовский // Весці НАН Беларусі. Сер. мед. навук. – 2008. – № 3. – С.23-27.
34. 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.
35. Ходосовский, М. Н. Роль NO-зависимых механизмов в реализации антиоксидантных эффектов мелатонина при ишемии-

- реперфузии печени / М. Н. Ходосовский, В. В. Зинчук // Эксперим. и клин. фармакол. – 2014. – № 6. – С. 33-38.
36. Ходосовский, М. Н. Изменение параметров кислородтранспортной функции крови при ишемии-реперфузии печени у крыс в условиях введения 1-метилникотинамида / М. Н. Ходосовский, В. В. Зинчук // Журнал ГрГМУ. – 2009, № 2. – С. 52 -54.
37. Ходосовский, М. Н. Влияние 1-метилникотинамида на параметры прооксидантно-антиоксидантного баланса у крыс при ишемии-реперфузии печени / М. Н. Ходосовский, В. В. Зинчук, С. Хлопицкий // Эксперим. и клин. фармакол. – 2010. – Т. 73, № 4. – С. 11-13.
38. Черняускене, Р.Ч. Одновременное флюориметрическое определение концентрации витаминов А и Е в сыворотке крови / Р.Ч. Черняускене, З.З. Варшкявичене, П.С. Грибаускас // Лаб. дело. – 1984. – №.6. – С.362-365.
39. Шульга, Е. В. Эффект 1-метилникотинамида на кислородтранспортную функцию крови и свободнорадикальные процессы при введении липополисахарида / Е. В. Шульга, В. В. Зинчук // Новости медико-биологических наук. – 2009. – № 3. – С. 17-22.
40. Abe, K. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator / K. Abe, H. Kimura // J. Neurosci. – 1996. – Vol. 16, N 3. – P. 1066-1071.
41. Abu-Amara, M. Liver ischemia/reperfusion injury: processes in inflammatory networks / M. Abu-Amara [et al.] // Liver Transpl. – 2010. – Vol. 16, N 9. – P.1016-1032.
42. Abu-Amara, M. The nitric oxide pathway – evidence and mechanisms for protection against liver ischaemia reperfusion injury / M. Abu-Amara [et al.] // Liver Int. – 2012. –Vol. 32, N 4. – P.531-543.
43. Adamiec, M. Search for drugs of the combined anti-inflammatory and anti-bacterial properties: 1-methyl-N'-(hydroxymethyl)nicotinamide / M. Adamiec [et al.] // Pharmacol. Rep. – 2006. – Vol. 58, № 2. – P. 246-249.
44. Akbari, G. The Hepatoprotective and MicroRNAs Downregulatory Effects of Crocin Following Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury in Rats / G. Akbari [et al.] // Oxid. Med. Cell. Longev. – 2017. – Vol. 2017, ID 1702967. – P. 1-11.

45. Akhtar, M. Z. The role of hypoxia-inducible factors in organ donation and transplantation: the current perspective and future opportunities / M. Z. Akhtar [et al.] // *Am. J. Transplant.* – 2014. – Vol. 14, N 7. – P. 1481-1487.
46. Alchera, E. Molecular mechanisms of liver preconditioning / E. Alchera [et al.] // *World J. Gastroenterol.* – 2010. – Vol. 16, N 48. – P. 6058-6067.
47. Allan, P. F. Reversal of hemorrhagic shock-associated hepatic ischemia-reperfusion injury with N-acetylcysteine / P. F. Allan, B. B. Bloom, S. Wanek // *Mil. Med.* – 2011. – Vol. 176, N 3. – P. 332-335.
48. Al-Magableh, M. R. Mechanism of vasorelaxation and role of endogenous hydrogen sulfide production in mouse aorta / M. R. Al-Magableh, J. L. Hart // *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* – 2011. – Vol. 383, N 4. – P. 403-413.
49. Al-Magableh, M. R. Hydrogen sulfide protects endothelial nitric oxide function under conditions of acute oxidative stress in vitro / M. R. Al-Magableh [et al.] // *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* – 2014. – Vol. 387, N 1. – P. 67-74.
50. Andreadou, I. The role of gasotransmitters NO, H₂S and CO in myocardial ischaemia/reperfusion injury and cardioprotection by preconditioning, postconditioning and remote conditioning / I. Andreadou [et al.] // *Br. J. Pharmacol.* – 2015. – Vol. 172, N 6. – P. 1587-1606.
51. Arauz, J. Redox state and methods to evaluate oxidative stress in liver damage: From bench to bedside / J. Arauz, E. Ramos-Tovar, P. Muriel // *Ann. Hepatol.* – 2016. – Vol. 15, N 2. – P. 160-173.
52. Asea, A. Heat shock proteins and toll-like receptors / A. Asea // *Handb. Exp. Pharmacol.* – 2008. – Vol. 183. – P. 111-127.
53. Ayer, A. Heme Oxygenases in Cardiovascular Health and Disease / A. Ayer [et al.] // *Physiol. Rev.* – 2016. – Vol. 96, N 4. – P. 1449-1508.
54. Bahcekapili, N. The relationship between erythropoietin pretreatment with blood-brain barrier and lipid peroxidation after ischemia/reperfusion in rats / N. Bahcekapili [et al.] // *Life Sci.* – 2007. – Vol. 80, N 14. – P. 1245-1251.
55. Bagul, A. Carbon monoxide protects against ischemia-reperfusion injury in an experimental model of controlled nonheartbeating

- donor kidney / A. Bagul, S.A. Hosgood, M. Kaushik, M.L. Nicholson // Transplantation. – 2008. – Vol. 85, N 4. – P. 576-581.
56. Barr, L. A. Discoveries of hydrogen sulfide as a novel cardiovascular therapeutic / L. A. Barr, J. W. Calvert // Circ. J. – 2014. – Vol. 78, N 9. – P. 2111-2118.
57. Bauer, I. Bench-to-bedside review: Carbon monoxide--from mitochondrial poisoning to therapeutic use / I. Bauer, B. H. Pannan // Crit. Care. – 2009. – Vol. 13, N 4. – P. 220.
58. Bhatia, M. H₂S and substance P in inflammation / M. Bhatia // Methods Enzymol. – 2015. – Vol. 555. – P. 195-205.
59. Bizjak, D. A. Increase in Red Blood Cell-Nitric Oxide Synthase Dependent Nitric Oxide Production during Red Blood Cell Aging in Health and Disease: A Study on Age Dependent Changes of Rheologic and Enzymatic Properties in Red Blood Cells / D. A. Bizjak [et al.] // PLoS One. – 2015. – Vol. 10, N 4. – P. e0125206.
60. Bley, K. R. RO1138452 and RO3244794: characterization of structurally distinct, potent and selective IP (prostacyclin) receptor antagonists / K. R. Bley [et al.] // Br. J. Pharmacol. – 2006. – Vol. 147, N 3. – P. 335-345.
61. Bolisetty, S. Heme Oxygenase 1 as a Therapeutic Target in Acute Kidney Injury / S. Bolisetty, A. Zarjou, A. Agarwal // Am. J. Kidney Dis. – 2017. – Vol. 69, N 4. – P. 531-545.
62. Bolondi, G. Predictive factors of short term outcome after liver transplantation / G. Bolondi [et al.] // World J. Gastroenterol. – 2016. – № 26. – P. 5936-5949.
63. Bonaventura, C. Molecular controls of the oxygenation and redox reactions of hemoglobin / C. Bonaventura [et al.] // Antioxid. Redox Signal. – 2013. – Vol. 18, N 17. – P. 2298-2313.
64. Brown, C. Methemoglobinemia in bronchoscopy: a case series and a review of the literature / C. Brown, M. Bowling // J. Bronchology Interv. Pulmonol. – 2013. – Vol. 20, N 3. – P. 241-246.
65. Brugger, J. Carbon monoxide has antioxidative properties in the liver involving p38 MAP kinase pathway in a murine model of systemic inflammation / J. Brugger [et al.] // Microcirculation. – 2010. – Vol. 17, N 7. – P. 504-513.
66. Bryan, N.S. Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples / N. S. Bryan, M. B. Grisham // Free Radic. Biol. Med. – 2007. – Vol. 43, № 5. – P. 645-657.

67. Bryniarski, K. Anti-inflammatory effect of 1-methylnicotinamide in contact hypersensitivity to oxazolone in mice; involvement of prostacyclin / K. Bryniarski [et al.] // *Eur. J. Pharmacol.* – 2008. – Vol. 578, № 2-3. – P. 332-338.
68. Brzozowski, T. Therapeutic potential of 1-methylnicotinamide against acute gastric lesions induced by stress: role of endogenous prostacyclin and sensory nerves / T. Brzozowski [et al.] // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2008. – Vol. 326, № 1. – P. 105-116.
69. Cannistrà, M. Hepatic ischemia reperfusion injury: A systematic review of literature and the role of current drugs and biomarkers / M. Cannistrà [et al.] // *Int. J. Surg.* – 2016. – Vol. 33, N 1. – P. S57-S70.
70. Carvalho, F. A. The relation between the erythrocyte nitric oxide and hemorheological parameters / F. A. Carvalho [et al.] // *Clin. Hemorheol. Microcirc.* – 2006. – Vol. 35, № 1-2. – P. 341-347.
71. Cebová, M. Cardiovascular effects of gasotransmitter donors / M. Cebová, M. Košútová, O. Pechánová // *Physiol. Res.* – 2016. – Vol. 65, N 3. – P. S291-S307.
72. Chen, K. 15-Deoxy- $\Delta(12,14)$ -prostaglandin J2 alleviates hepatic ischemia-reperfusion injury in mice via inducing antioxidant response and inhibiting apoptosis and autophagy / K. Chen [et al.] // *Acta Pharmacol. Sin.* – 2017. – Vol. 38, N 5. – P. 672-687.
73. Chen, Y. Hydrogen sulphide attenuates renal and cardiac injury after total hepatic ischemia and reperfusion / Y. Chen, Z. Liu, X. Xie // *J. Surg. Res.* – 2010. – Vol. 164, N 2. – P. e305-e313.
74. Chlopicki, S. 1-Methylnicotinamide (MNA), a primary metabolite of nicotinamide, exerts anti-thrombotic activity mediated by a cyclooxygenase-2/prostacyclin pathway / S. Chlopicki [et al.] // *Br. J. Pharmacol.* – 2007. – Vol. 152, № 2. – P. 230-239.
75. Cho, S. Syringaresinol protects against hypoxia/reoxygenation-induced cardiomyocytes injury and death by destabilization of HIF-1 α in a FOXO3-dependent mechanism / S. Cho [et al.] // *Oncotarget.* – 2015. – Vol. 6, N 1. – P. 43-55.
76. Choukèr, A. In vivo hypoxic preconditioning protects from warm liver ischemia-reperfusion injury through the adenosine A2B receptor / A. Choukèr [et al.] // *Transplantation.* – 2012. – Vol. 94, N 9. – P.894-902.

77. Clark, J. E. Cardioprotective actions by a water-soluble carbon monoxide-releasing molecule / J. E. Clark [et al.] // *Circ. Res.* – 2003. – Vol. 93, N 2. – P. e2-8.
78. Clementi, M. E. Effect of nitric oxide on the transport and release of oxygen in fetal blood / M. E. Clementi [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2003. – Vol. 302, N 3. – P. 515-519.
79. Coceani, F. Carbon monoxide and dilation of blood vessels / F. Coceani // *Science*. -1993. – Vol. 260, N 5109. – P. 739.
80. Coburn, R. F. Endogenous carbon monoxide production in man / R. F. Coburn, W. S. Blakemore, R. E. Forester // *J. Clin. Invest.* – 1963. – Vol. 42. – P. 1172-1178.
81. Crocker, G. H. Combined effects of inspired oxygen, carbon dioxide, and carbon monoxide on oxygen transport and aerobic capacity / G. H. Crocker, B. Toth, J. H. Jones // *J. Appl. Physiol.* (1985). – 2013. – Vol. 115, N 5. – P. 643-652.
82. Czigány, Z. Remote ischemic preconditioning protects the liver from ischemia-reperfusion injury / Z. Czigány [et al.] // *J. Surg. Res.* – 2013. – Vol. 185, N 2. – P. 605-613.
83. Dawson, T. M. Gases as biological messengers: nitric oxide and carbon monoxide in the brain / T. M. Dawson, S. H. Snyder // *J. Neurosci.* – 1994. – Vol. 14, N 9. – P. 5147-5159.
84. Deng, W. S. Effects of melatonin on liver function and lipid peroxidation in a rat model of hepatic ischemia/reperfusion injury / W. S. Deng [et al.] // *Exp. Ther. Med.* – 2016. – Vol. 11, N 5. – P. 1955-1960.
85. Di Meo, S. Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions / S. Di Meo [et al.] // *Oxid. Med. Cell. Longev.* – 2016. – Vol. 2016, ID 1245049. – P. 1-44.
86. Dixon, E. Vascular occlusion to decrease blood loss during hepatic resection / E. Dixon, C.M. Vollmer, O.F. Bathe, F. Sutherland // *Am. J. Surg.* -2005.- Vol. 190.- P. 75-86.
87. Dragun, P. Matrix metalloproteinases activity during the evolution of hypoxic-ischemic brain damage in the immature rat. The effect of 1-methylnicotinamide (MNA) / P. Dragun [et al.] // *J. Physiol. Pharmacol.* – 2008. – Vol. 59, № 3. – P. 441-455.
88. Elias-Miró, M. Current knowledge on oxidative stress in hepatic ischemia/reperfusion / M. Elias-Miró [et al.] // *Free Radic. Res.* – 2013. – Vol. 47, N 8. – P. 555-568.

89. Emborg, T. J. Multiple heme oxygenase family members contribute to the biosynthesis of the phytochrome chromophore in *Arabidopsis* / T. J. Emborg [et al.] // *Plant Physiol.* - 2006. – Vol. 140, N 3. – P. 856-868.
90. Esposti, D. D. Autophagy is induced by ischemic preconditioning in human livers formerly treated by chemotherapy to limit necrosis / D. D. Esposti [et al.] // *Autophagy*. – 2010. – Vol. 6, N 1. – P. 172-174.
91. Ewing, J. F. In situ hybridization and immunohistochemical localization of heme oxygenase-2 mRNA and protein in normal rat brain: Differential distribution of isozyme 1 and 2 / J. F. Ewing, M. D. Maines // *Mol. Cell. Neurosci.* – 1992. – Vol. 3, N 6. – P. 559-570.
92. Exner, M. Kinetic and mechanistic studies of the peroxynitrite-mediated oxidation of oxymyoglobin and oxyhemoglobin / M. Exner, S. Herold // *Chem. Res. Toxicol.* – 2000. – Vol. 13. – P. 287–293.
93. Fago, A. Oxygen binding to partially nitrosylated hemoglobin / A Fago [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2013. – Vol. 1834, N 9. – P.1894-900.
94. Fandrey, J. Rounding up the usual suspects in O₂ sensing: CO, NO, and H₂S! / J. Fandrey // *Sci. Signal.* – 2015. – Vol. 8, N 373. – P. fs10.
95. Farrugia, G., Szurszewski J.H. Carbon monoxide, hydrogen sulfide, and nitric oxide as signaling molecules in the gastrointestinal tract / G. Farrugia, J. H. Szurszewski // *Gastroenterology*. – 2014. – Vol. 147, N 2. – P. 303-313.
96. Fedorowicz, A. Activation of the nicotinamide [N-methyltransferase (NNMT)-1-methylnicotinamide (MNA) pathway in pulmonary hypertension / A. Fedorowicz [et al.] // *Respir. Res.* – 2016. – Vol. 17, N 1. – P.108.
97. Fletcher, B.L. Measurement of fluorescent lipid peroxidation products in biological systems and tissues / B.L. Fletcher, C.J. Dillard, A.L. Tappel // *Anal. Biochem.* - 1973.- Vol. 52, № 1. – P. 1-9.
98. Fonseca, M. D. NOSH-aspirin (NBS-1120), a dual nitric oxide and hydrogen sulfide-releasing hybrid, reduces inflammatory pain / M. D.Fonseca [et al.] // *Pharmacol. Res. Perspect.* – 2015. – Vol. 3, N 3. – P.e00133.

99. Fuhrmann, D. C. Mitochondrial composition and function under the control of hypoxia / D. C. Fuhrmann, B. Brüne // *Redox Biol.* – 2017. – Vol. 12. – P. 208-215.
100. Gade, A. R. Hydrogen sulfide as an allosteric modulator of ATP-sensitive potassium channels in colonic inflammation / A. R. Gade, M. Kang, H. I. Akbarali // *Mol. Pharmacol.* – 2013. – Vol. 83, N 1. – P. 294-306.
101. Gao, L. Caveolin-1 protects against hepatic ischemia/reperfusion injury through ameliorating peroxynitrite-mediated cell death / L. Gao [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* – 2016. – Vol. 95. – P. 209-215.
102. Gao, L. Hydrogen sulfide inhibits human platelet aggregation in vitro in part by interfering gap junction channels: effects of ACS14, a hydrogen sulfide-releasing aspirin / L. Gao [et al.] // *Heart Lung Circ.* – 2015. – Vol. 24, N 1. – P. 77-85.
103. Gebicki, J. 1-Methylnicotinamide: a potent anti-inflammatory agent of vitamin origin / J. Gebicki [et al.] // *Pol. J. Pharmacol.* – 2003. – Vol. 55, № 1. – P. 109-112.
104. Go, K. L. Mitochondrial Dysfunction and Autophagy in Hepatic Ischemia/Reperfusion Injury / K. L. Go [et al.] // *Biomed. Res. Int.* – 2015. – Vol. 2015. – P. 183469.
105. Granger, D. N. Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept / D. N. Granger, P. R. Kvietys // *Redox Biol.* – 2015. – Vol. 6. – P. 524-551.
106. Grau, M. Regulation of red blood cell deformability is independent of red blood cell-nitric oxide synthase under hypoxia / M. Grau [et al.] // *Clin. Hemorheol. Microcirc.* – 2016. – Vol. 63, N 3. – P. 199-215.
107. Grocott, H. P. Effects of a synthetic allosteric modifier of hemoglobin oxygen affinity on outcome from global cerebral ischemia in the rat / H. P. Grocott [et al.] // *Stroke.* – 1998. – Vol. 29, N 8. – P. 1650-1655.
108. Guan, L. Y. Mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and protective effects of nitric oxide / L. Y. Guan [et al.] // *World J. Gastrointest. Surg.* – 2014. – Vol. 6, N. 7. – P. 122-128.
109. Guenther A. L. Reactions of the melatonin metabolite AMK (N1-acetyl-5-methoxykynuramine) with reactive nitrogen species: formation of novel compounds, 3-acetamidomethyl-6-

- methoxycinnolinone and 3-nitro-AMK / AL Guenther [et al.]
// J. Pineal Res. – 2005. – Vol. 39, N 3. – P. 251-260.
110. Guicciardi, M. E. Apoptosis and necrosis in the liver / M. E. Guicciardi [et al.] // Compr. Physiol. – 2013. – Vol. 3, N 2. – P. 977-1010.
111. Gurusamy, K. S. Current protective strategies in liver surgery / K. S. Gurusamy, H. D. Gonzalez, B. R. Davidson // World J. Gastroenterol. – 2010. – Vol. 16, N 48. – P. 6098–6103.
112. Haugaa, H. Effects of inhalation of low-dose nitrite or carbon monoxide on post-reperfusion mitochondrial function and tissue injury in hemorrhagic shock swine / H. Haugaa [et al.] // Crit. Care. – 2015. – Vol. 19, N 1. – P. 184.
113. Hines, I. N. Divergent roles of superoxide and nitric oxide in liver ischemia and reperfusion injury / I. N. Hines, M. B. Grisham // J. Clin. Biochem. Nutr. – 2011. – Vol. 48, N 1. – P. 50-56.
114. Hoshino, J. Methylation of nicotinamide in rat liver cytosol and its correlation with hepatocellular proliferation / J. Hoshino, U. Kühne, H. Kröger // Biochim. Biophys. Acta. – 1982. – Vol. 719, № 3. – P. 518-526.
115. Hoshino, J. Nicotinamide methylation and its relation to NAD synthesis in rat liver tissue culture. Biochemical basis for the physiological activities of 1-methylnicotinamide / J. Hoshino, U. Schlüter // Biochim Biophys Acta. – 1984. – Vol. 801, № 2. – P. 250-258.
116. Huang, H. F. Heme oxygenase-1 protects rat liver against warm ischemia/reperfusion injury via TLR2/TLR4-triggered signaling pathways. / H. F. Huang [et al.] // World J. Gastroenterol. – 2015. – Vol. 21, N 10. – P. 2937-2948.
117. Hummitzsch, L. Culture media from hypoxia conditioned endothelial cells protect human intestinal cells from hypoxia/reoxygenation injury / L. Hummitzsch [et al.] // Exp. Cell. Res. – 2014. – Vol. 322, N 1. – P. 62-70.
118. Hu, Q. Mitochondrial Damage-Associated Molecular Patterns (MTDs) Are Released during Hepatic Ischemia Reperfusion and Induce Inflammatory Responses / Q. Hu [et al.] // PLoS One. – 2015. – Vol. 10, N 10. – ID: e0140105. – P. 1-17.
119. Hu, Y. Sirtuin 6 is essential for sodium sulfide-mediated cytoprotective effect in ischemia/reperfusion-stimulated brain endothelial

- cells / Y. Hu [et al.] // J. Stroke Cerebrovasc. Dis. – 2015. – Vol. 24, N 3. – P. 601-609.
120. Ishima, Y. UW solution improved with high anti-apoptotic activity by S-nitrosated human serum albumin / Y. Ishima [et al.] // Nitric Oxide. – 2013. – Vol. 30. – P.36-42.
 121. Jaeschke H., Farhood A. Kupffer cell activation after no-flow ischemia versus hemorrhagic shock // Free Radic. Biol. Med.- 2002.- Vol. 33, № 2.- P. 210-219.
 122. Jaeschke, H. Current strategies to minimize hepatic ischemia-reperfusion injury by targeting reactive oxygen species / H. Jaeschke, B. L. Woolbright // Transplant. Rev.(Orlando) – 2012. – Vol. 26, № 2. – P.103-114.
 123. Jakubowski, A. 1-Methylnicotinamide protects against liver injury induced by concanavalin A via a prostacyclin-dependent mechanism: A possible involvement of IL-4 and TNF- α / A. Jakubowski [et al.] // Int. Immunopharmacol. – 2016. – Vol. 31. – P. 98-104.
 124. Jegatheeswaran, S. Experimental and clinical evidence for modification of hepatic ischaemia-reperfusion injury by N-acetylcysteine during major liver surgery / S. Jegatheeswaran, A. K. Siriwardena // HPB (Oxford). – 2011. – Vol.13, N 2. – P. 71-78.
 125. Jha, S. Hydrogen sulfide attenuates hepatic ischemia-reperfusion injury: role of antioxidant and antiapoptotic signaling / S. Jha [et al.] // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. – 2008. – Vol.295, N 2. – P. H801- H806.
 126. Jiang, L. Reductive carboxylation supports redox homeostasis during anchorage-independent growth / L. Jiang [et al.] // Nature. – 2016. – Vol. 532. – P. 255-258.
 127. Jiang, Q. Protection of rat liver against hepatic ischemia-reperfusion injury by a novel selenocysteine-containing 7-mer peptide / Q. Jiang [et al.] // Mol. Med. Rep. – 2016. – Vol. 14, N 3. – P. 2007-2015.
 128. Kabil, O. H₂S and its role in redox signaling / O. Kabil, N. Motl, R. Banerjee. // Biochim. Biophys. Acta. – 2014. – Vol. 1844, N 8. – P. 1355-1366.
 129. Kageyama, S. Intestinal ischemic preconditioning ameliorates hepatic ischemia/reperfusion injury in rats: role of heme oxygenase

- 1 in the second window of protection / S. Kageyama [et al.] // *Liver Transpl.* – 2015. – Vol. 21, N 1. – P.112-122.
130. Kaizu, T. Protection of transplant-induced hepatic ischemia/reperfusion injury with carbon monoxide via MEK/ERK1/2 pathway downregulation / T. Kaizu [et al.] // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* – 2008. – Vol. 294, N 1. – P. G236-G244.
131. Kalayarasan, S. Diallyl sulfide enhances antioxidants and inhibits inflammation through the activation of Nrf2 against gentamicin-induced nephrotoxicity in Wistar rats / S. Kalayarasan [et al.] // *Eur. J. Pharmacol.* – 2009. – Vol. 606, N 1-3. – P. 162-171.
132. Kalyanaraman B. Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms / B. Kalyanaraman // *Redox Biol.* – 2013. – Vol. 1, N 1. – P. 244-257.
133. Kang, K. Role of hydrogen sulfide in hepatic ischemia-reperfusion-induced injury in rats / K. Kang [et al.] // *Liver Transpl.* – 2009. – Vol. 15, N 10. – P. 1306-1314.
134. Kanoria, S. A model to study total hepatic ischemia-reperfusion injury / S. Kanoria [et al.] // *Transplant. Proc.* – 2004. – Vol. 36, N 9. – P. 2586-2589.
135. Karwi, Q. G. Pharmacological postconditioning against myocardial infarction with a slow-releasing hydrogen sulfide donor, GYY4137 / Q. G. Karwi [et al.] // *Pharmacol. Res.* – 2016. – Vol. 111. – P. 442-451.
136. Kato, Y. Intralobular heterogeneity of oxidative stress and cell death in ischemia-reperfused rat liver / Y. Kato, J. Tanaka, K. Koyama // *J. Surg. Res.* – 2001. – Vol. 95, № 2. – P. 99-106.
137. Kaizu, T. Protection of transplant-induced hepatic ischemia/reperfusion injury with carbon monoxide via MEK/ERK1/2 pathway downregulation / T. Kaizu [et al.] // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* – 2008. – Vol. 294, N 1. – P. G236-244.
138. Kerr, J. F. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics / J. F. Kerr, A. H. Wyllie, A. R. Currie // *Br. J. Cancer.* – 1972. – Vol. 26, № 4. – P. 239-257.
139. Kim, H. J. Carbon monoxide protects against hepatic ischemia/reperfusion injury by modulating the miR-34a/SIRT1 pathway / H. J. Kim [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2015. – Vol. 1852, N 7. – P. 1550-1559.

140. Kim, H. J. CO/HO-1 Induces NQO-1 Expression via Nrf2 Activation / H. J. Kim [et al.] // Immune Netw. – 2011. – Vol. 11, N 6. – P. 376-382.
141. Kim, H. Y. Activation of NLRP3 and AIM2 inflammasomes in Kupffer cells in hepatic ischemia/reperfusion / H. Y. Kim, S. J. Kim, S. M. Lee // FEBS J. – 2015. – Vol. 282, N 2. – P. 259-270.
142. Kim, J. S. Mitochondrial permeability transition in rat hepatocytes after anoxia/reoxygenation: role of Ca²⁺-dependent mitochondrial formation of reactive oxygen species / J. S. Kim, J. H. Wang, J. J. Lemasters // Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. – 2012. – Vol. 302, N 7. – P. G723-G731.
143. Kim-Shapiro, D. B. Mechanisms of nitrite bioactivation / D. B. Kim-Shapiro, M. T. Gladwin // Nitric Oxide. – 2014. – Vol. 38. – P. 58-68.
144. Kimura, H. Hydrogen sulfide: its production and functions / H. Kimura // Exp. Physiol. – 2011. – Vol. 96, N 9. – P. 833-835.
145. Kimura, H. Physiological Roles of Hydrogen Sulfide and Polysulfides / H. Kimura // Handb. Exp. Pharmacol. – 2015. – Vol. 230. – P. 61-81.
146. Kimura, Y. Hydrogen sulfide increases glutathione production and suppresses oxidative stress in mitochondria / Y. Kimura, Y. Goto, H. Kimura // Antioxid. Redox Signal. – 2010. – Vol. 12, N 1. – P. 1-13.
147. Kleinbongard, P. Red blood cells express a functional endothelial nitric oxide synthase / Kleinbongard P. [et al.] // Blood. – 2006. – Vol. 107, N 7. – P. 2943-2951.
148. Knudsen, A. R. Correlation between liver cell necrosis and circulating alanine aminotransferase after ischaemia/reperfusion injuries in the rat liver / A. R. Knudsen [et al.] // Int. J. Exp. Pathol. – 2016. – Vol. 97, N 2. – P. 133-138.
149. Kohli, V. Endothelial cell and hepatocyte deaths occur by apoptosis after ischemia-reperfusion injury in the rat liver / Kohli V. [et al.] // Transplantation. – 1999. – Vol. 67, № 8. – P. 1099-1105.
150. Lai, I. R. The protective role of heme oxygenase-1 on the liver after hypoxic preconditioning in rats / I. R. Lai [et al.] // Transplantation. – 2004. – Vol. 77, N 7. – P. 1004-1008.
151. Lee, L. Y. Carbon monoxide induces hypothermia tolerance in Kupffer cells and attenuates liver ischemia/reperfusion injury in

- rats / L. Y. Lee [et al.] // Liver Transpl. – 2011. – Vol.17, N 12. – P. 1457-1466.
- 152.Lemasters, J. J. Mitochondrial Calcium and the Permeability Transition in Cell Death / J. J. Lemasters [et al.] // Biochim. Biophys. Acta. – 2009. – Vol. 1787, N 11. – P. 1395-1401.
- 153.Li, J. The mechanisms and strategies to protect from hepatic ischemia-reperfusion injury / J. Li [et al.] // Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci. – 2015. – Vol.19, № 11. – P. 2036-2047.
- 154.Li, J. Y. GdCl₃ abates hepatic ischemia-reperfusion injury by inhibiting apoptosis in rats / J. Y. Li [et al.] // Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int. – 2009. – Vol. 8, N 5. – P. 518-523.
- 155.Li, Q. Chemical foundations of hydrogen sulfide biology / Q. Li, J. R. Jr. Lancaster // Nitric Oxide. – 2013. – Vol.35. – P. 21-34.
- 156.Li, Y. H₂S inhibition of chemical hypoxia-induced proliferation of HPASMCs is mediated by the upregulation of COX-2/PGI₂ / Y. Li [et al.] // Int. J. Mol. Med. – 2014. – Vol. 33, N 2. – P. 359-366.
- 157.Liu, A. Ischemic preconditioning protects against liver ischemia/reperfusion injury via heme oxygenase-1-mediated autophagy / A. Liu [et al.] // Crit Care Med. – 2014. – Vol. 42, N. 12. – P. e762-e771.
- 158.Liu, B. Cytoprotective role of heme oxygenase-1 in liver ischemia reperfusion injury / B. Liu, J. M. Qian // Int. J. Clin. Exp. Med. – 2015. – Vol. 8, N 11. – P.19867-19873.
- 159.Lo Iacono, L. A carbon monoxide-releasing molecule (CORM-3) uncouples mitochondrial respiration and modulates the production of reactive oxygen species / L. Lo Iacono [et al.] // Free Radic. Biol. Med. – 2011. – Vol.50, N 11. – P.1556-1564.
- 160.Lopez-Andujar, R. Comparative prospective study of two liver graft preservation solutions: University of Wisconsin and Celsior / R. Lopez-Andujar [et al.] // Liver Transpl. – 2009. – Vol.15, N 12. – P.1709-1717.
- 161.Lu, N. The dual effects of nitrite on hemoglobin-dependent redox reactions / N. Lu [et al.] // Nitric Oxide. – 2014. – Vol.40. – P.1-9.
- 162.Ludolph, B. Short-term effect of the HMG-CoA reductase inhibitor rosuvastatin on erythrocyte nitric oxide synthase activity / B. Ludolph [et al.] // Vasc. Health. Risk. Manag. – 2007. – Vol. 3, № 6. – P. 1069-1073.

163. Maia, L. B. Nitrite reductase activity of rat and human xanthine oxidase, xanthine dehydrogenase, and aldehyde oxidase: evaluation of their contribution to NO formation in vivo / L. B. Maia [et al.] // *Biochemistry*. – 2015. – Vol. 54, N 3. – P. 685-710.
164. Mani, S. Hydrogen sulfide and the liver / S. Mani [et al.] // *Nitric Oxide*. – 2014. – Vol. 41. – P. 62-71.
165. Margaritis, A. The role of protein sulfhydryl groups and protein disulfides of the platelet surface in aggregation processes involving thiol exchange reactions / A. Margaritis [et al.] // *Pharmacol. Res.* – 2011. – Vol. 63, N 1. – P. 77-84.
166. Mateuszuk, L. Activation of nicotinamide N-methyltransferase and increased formation of 1-methylnicotinamide (MNA) in atherosclerosis / Mateuszuk L. [et al.] // *Pharmacol. Rep.* – 2009. – Vol. 61, № 1. – P. 76-85.
167. Mathes, A. M. Hepatoprotective actions of melatonin: possible mediation by melatonin receptors / A. M. Mathes // *World J. Gastroenterol.* – 2010. – Vol. 16, N 48. – P. 6087-6097.
168. Meng, H. Erythropoietin activates Keap1-Nrf2/ARE pathway in rat brain after ischemia / Meng H. [et al.] // *Int. J. Neurosci.* – 2014. – Vol. 124, N 5. – P. 362-368.
169. Messiha, B. A. Protective effects of fish oil, allopurinol, and verapamil on hepatic ischemia-reperfusion injury in rats / B. A. Messiha, A. M. Abo-Youssef // *J. Nat. Sci. Biol. Med.* – 2015. – Vol. 6, N 2. – P. 351-355.
170. Modis, K. Regulation of mitochondrial bioenergetic function by hydrogen sulfide. Part II. Pathophysiological and therapeutic aspects / K. Modis [et al.] // *Br. J. Pharmacol.* – 2014. – Vol. 171, N 8. – P. 2123-2146.
171. Moeini, M. Protective role of recombinant human erythropoietin in kidney and lung injury following renal bilateral ischemia-reperfusion in rat model / M. Moeini [et al.] // *Int. J. Prev. Med.* – 2013. – Vol. 4, N 6. – P. 648-655.
172. Mogielnicki, A. N-methylnicotinamide failed to induce endothelial prostacyclin release in perfused rat hindquarters / A. Mogielnicki [et al.] // *Pharmacol. Rep.* – 2008. – Vol. 60, N 6. – P. 1025-1029.
173. Moody, B. F. Emergent role of gasotransmitters in ischemia-reperfusion injury / B. F. Moody, J. W. Calvert // *Med. Gas. Res.* – 2011. – Vol. 1, N 3. – P. 1-9.

174. Mujumdar, V. S. Induction of oxidative stress by homocyst(e)ine impairs endothelial function / V. S. Mujumdar, G. M. Aru, S. C. Tyagi // *J. Cell. Biochem.* – 2001. – Vol. 82, № 3. – P. 491-500.
175. Murphy, M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species / M. P. Murphy // *Biochem. J.* – 2009. – Vol. 417, N 1. – P. 1-13.
176. Mustafa, A. K. Hydrogen sulfide as endothelium-derived hyperpolarizing factor sulfhydrates potassium channels / A. K. Mustafa [et al.] // *Circ. Res.* – 2011. – Vol. 109, N 11. – P. 1259-1268.
177. Nandra, K. K. Pharmacological preconditioning with erythropoietin attenuates the organ injury and dysfunction induced in a rat model of hemorrhagic shock / K. K. Nandra [et al.] // *Dis. Model. Mech.* – 2013. – Vol. 6, N 3. – P. 701-709.
178. Nakao, A. Application of carbon monoxide for transplantation / A. Nakao, Y. Toyoda // *Curr. Pharm. Biotechnol.* – 2012. – Vol. 13, N 6. – P. 827-836.
179. Nastos, C. Global consequences of liver ischemia/reperfusion injury / C. Nastos [et al.] // *Oxid. Med. Cell. Longev.* – 2014. – Vol. 2014. – P. 906965.
180. Ngo, B. T. Hyperacute rejection in the xenogenic transplanted rat liver is triggered by the complement system only in the presence of leukocytes and free radical species / B. T. Ngo [et al.] // *Xenotransplantation.* – 2013. – Vol. 20, N 3. – P. 177-187.
181. Niu, X. Iron-induced oxidative rat liver injury after non-heart-beating warm ischemia is mediated by tumor necrosis factor α and prevented by deferoxamine / X. Niu [et al.] // *Liver Transpl.* – 2014. – Vol. 20, N 8. – P. 904-911.
182. Norris, E. J. The liver as a central regulator of hydrogen sulfide / E. J. Norris [et al.] // *Shock.* – 2011. – Vol. 36, N 3. – P. 242-250.
183. Okamoto, M. Protective effect of hydrogen sulfide on pancreatic beta-cells / M. Okamoto, T. Ishizaki, T. Kimura // *Nitric Oxide.* – 2015. – Vol. 46. – P. 32-36.
184. Olas, B. Carbon monoxide is not always a poison gas for human organism: Physiological and pharmacological features of CO / B. Olas // *Chem. Biol. Interact.* – 2014. – Vol. 222. – P. 37-43.
185. Olas, B. Gasomediators ($\cdot$ NO, CO, and H₂S) and their role in hemostasis and thrombosis / B. Olas // *Clin. Chim. Acta.* – 2015. – Vol. 20, N 445. – P. 115-121.

186. Ollinger, R. Therapeutic applications of bilirubin and biliverdin in transplantation / R. Ollinger [et al.] // *Antioxid. Redox Signal.* – 2007. – Vol. 9, N 12. – P. 2175-2185.
187. Olthof, P. B. Protective mechanisms of hypothermia in liver surgery and transplantation / P. B. Olthof [et al.] // *Mol. Med.* – 2015. – Vol. 21, N 1. – P. 833–846.
188. Olthof, P. B. Warm ischemia time-dependent variation in liver damage, inflammation, and function in hepatic ischemia/reperfusion injury / P. B. Olthof [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2017. – Vol. 1863, N 2. – P. 375-385.
189. Origassa, C. S. Cytoprotective role of heme oxygenase-1 and heme degradation derived end products in liver injury / C. S. Origassa, N. O. Câmara // *World J. Hepatol.* – 2013. – Vol. 5, N 10. – P. 541-549.
190. Otterbein, L. E. Heme Oxygenase-1 and Carbon Monoxide in the Heart: The Balancing Act Between Danger Signaling and Pro-Survival / L. E. Otterbein, R. Foresti, R. Motterlini // *Circ. Res.* – 2016. – Vol. 118, N 12. – P. 1940-1959.
191. Ozüyan, B. RBC NOS: regulatory mechanisms and therapeutic aspects / B. Ozüyan [et al.] // *Trends Mol. Med.* – 2008. – Vol. 14, N 7. – P. 314-322.
192. Pacher, P. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease / P. Pacher, J. S. Beckman, L. Liaudet // *Physiol. Rev.* – 2007. – Vol. 87, N 1. – P. 315–424.
193. Papapetropoulos, A. Hydrogen sulfide is an endogenous stimulator of angiogenesis / A. Papapetropoulos [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 2009. – Vol. 106, N 51. – P. 21972-21977.
194. Park, S. W. Effect of melatonin on altered expression of vasoregulatory genes during hepatic ischemia/reperfusion / S. W. Park, S. M. Choi, S. M. Lee // *Arch. Pharm. Res.* – 2007. – Vol. 30, N 12. – P. 1619-1624.
195. Patel, V. B. Hydrogen sulfide: an old gas with new cardioprotective effects / Patel V. B. [et al.] // *Clin. Sci. (Lond).* – 2015. – Vol. 128, N 5. – P. 321-323.
196. Paul, V. Effects of sodium nitroprusside, a nitric oxide donor, on gamma-aminobutyric acid concentration in the brain and on picrotoxin-induced convulsions in combination with phenobarbitone in rats / V. Paul, P. Ekambaram // *Pharmacol. Biochem. Behav.* – 2005. – Vol. 80, N 3. – P. 363-370.

197. Pawloski, J. R. Export by red blood cells of nitric oxide bioactivity / J. R. Pawloski, D. T. Hess, J. S. Stamler // *Nature*. – 2001. – Vol. 409, N 6820. – P. 622-626.
198. Peers, C. Modulation of ion channels by hydrogen sulfide / C. Peers [et al.] // *Antioxid. Redox Signal.* – 2012. – Vol. 17, N 1. – P. 95-105.
199. Peralta, C. Hepatic ischemia and reperfusion injury: effects on the liver sinusoidal milieu / C. Peralta, M. B. Jiménez-Castro, J. Gracia-Sancho // *J. Hepatol.* – 2013. – Vol. 59, N 5. – P. 1094-1106.
200. Phillips, L. Nitric oxide mechanism of protection in ischemia and reperfusion injury / L. Phillips [et al.] // *J. Invest. Surg.* – 2009. – Vol. 22, N 1. – P. 46-55.
201. Pissios, P. Nicotinamide N-Methyltransferase: More Than a Vitamin B3 Clearance Enzyme / P. Pissios // *Trends Endocrinol. Metab.* – 2017. – Vol. 28, N 5. – P. 340-353.
202. Polhemus, D. J. Emergence of hydrogen sulfide as an endogenous gaseous signaling molecule in cardiovascular disease / D. J. Polhemus, D. J. Lefer // *Circ. Res.* – 2014. – Vol. 114, N 4. – P. 730-737.
203. Poss, W. B. Regulation of xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase activity by hypoxia / W. B. Poss [et al.] // *Am. J. Physiol.* – 1996. – Vol. 270, N 6. – P. L941-L946.
204. Qiao, Y. L. Butyrate protects liver against ischemia reperfusion injury by inhibiting nuclear factor kappa B activation in Kupffer cells / Y. L. Qiao [et al.] // *J. Surg. Res.* – 2014. – Vol. 187, N 2. – P. 653-659.
205. Quesnelle, K. M. Molecular responses to ischemia and reperfusion in the liver / K. M. Quesnelle, P. V. Bystrom, L. H. Toledo-Pereyra // *Arch. Toxicol.* – 2015. – Vol. 89, N 5. – P. 651-657.
206. Reeder, B. J. The redox activity of hemoglobins: from physiologic functions to pathologic Mechanisms / B. J. Reeder // *Antioxid. Redox Signal.* – 2010. – Vol. 13, N 7. – P. 1087-1123.
207. Renga, B. Reversal of Endothelial Dysfunction by GPBAR1 Agonism in Portal Hypertension Involves a AKT/FOXO1 Dependent Regulation of H2S Generation and Endothelin-1 / B. Renga [et al.] // *PLoS One*. – 2015. – Vol. 10, N 11. – P. e0141082.
208. Reznik, O. N. The use of oxygenated perfluorocarbon emulsion for initial in situ kidney perfusion / O. N. Reznik [et al.] // *Transplant Proc.* – 2008. – Vol. 40, N 4. – P. 1027-1028.

209. Riederer, M. Adipose tissue as a source of nicotinamide N-methyltransferase and homocysteine / M. Riederer [et al.] // *Atherosclerosis*. – 2009. – Vol. 204, № 2. – P. 412-417.
210. Rifkind, J. M. Hemoglobin redox reactions and red blood cell aging / J. M. Rifkind, E. Nagababu // *Antioxid. Redox Signal.* – 2013. – Vol. 18, N 17. – P. 2274-2283.
211. Robertson, F. P. A systematic review and meta-analysis of donor ischaemic preconditioning in liver transplantation / F. P. Robertson [et al.] // *Transpl. Int.* – 2016. – Vol. 29, N 11. – P. 1147-1154.
212. Romero, N. Hemoglobin and red blood cells as tools for studying peroxynitrite biochemistry / N. Romero, R. Radi // *Methods Enzymol.* – 2005. – Vol. 396. – P. 229-245.
213. Ruddock, M. W. Metabolites of the radiosensitizer nicotinamide are unlikely to contribute to the degree of emesis observed with the parent drug / M. W. Ruddock, D. G. Hirst // *Oncol. Res.* – 2007. – Vol. 16, № 12. – P. 569-574.
214. Ryter, S. W. Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications / S. W. Ryter, J. Alam, A. M. Choi // *Physiol. Rev.* – 2006. – Vol. 86, N 2. – P. 583-650.
215. Saeedi, A. Effects of long-term exposure to hydrogen sulfide on human red blood cells / A. Saeedi, A. Najibi, A. Mohammadi-Bardbori // *Int. J. Occup. Environ. Med.* – 2015. – Vol. 6, N 1. – P. 20-25.
216. Salhany, J. M. The oxidative denitrosylation mechanism and nitric oxide release from human fetal and adult hemoglobin, an experimentally based model simulation study / J. M. Salhany // *Blood Cells Mol. Dis.* – 2013. – Vol. 50, N 1. – P. 8-19.
217. Salloum, F. N. Hydrogen sulfide and cardioprotection--Mechanistic insights and clinical Translatability / F. N. Salloum // *Pharmacol. Ther.* – 2015. – Vol. 152. – P. 11-17.
218. Sasaki, H. Superoxide induces hepatocyte apoptosis during the early phase of reperfusion after murine liver ischemia / H. Sasaki [et al.] // *Transplant. Proc.* – 1998. – Vol. 30, N 7. – P. 2958-2959.
219. Sasaki, M. Oxidative stress and ischemia-reperfusion injury in gastrointestinal tract and antioxidant, protective agents / M. Sasaki, T. Joh // *J. Clin. Biochem. Nutr.* – 2007. – Vol. 40, N 1. – P. 1-12.

220. Schmidt, R. Hepatic organ protection: From basic science to clinical practice / R. Schmidt // *World J. Gastroenterol.* – 2010. – Vol. 16, N 48. – P. 6044–6045.
221. Schulz, K. Reevaluation of the Griess method for determining NO/NO₂- in aqueous and protein-containing samples / K. Schulz, S. Kerber, M. Kelm // *Nitric Oxide.* – 1999. – Vol. 3, N 3. – P. 225-234.
222. Schneider, M. Loss or silencing of the PHD1 prolyl hydroxylase protects livers of mice against ischemia/reperfusion injury / M. Schneider [et al.] // *Gastroenterology.* – 2010. – Vol. 138, N 3. – P. 1143-1154.
223. Searcy, D. G. Interaction of Cu,Zn superoxide dismutase with hydrogen sulfide / D. G. Searcy, J. P. Whitehead, M. J. Maroney // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1995. – Vol. 318, N 2. – P. 251-263.
224. Sedlak, J. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent / J. Sedlak, R. H. Lindsay // *Anal. Biochem.* – 1968. – Vol. 25, N 1. – P. 192-205.
225. Seifert, R. Nicotinamide methylation. Tissue distribution, developmental / R. Seifert, J. Hoshino, H. Kröger // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1984. – Vol. 801, № 2. – P. 259-264.
226. Sener, A. Carbon monoxide releasing molecules inhibit cell death resulting from renal transplantation related stress / A. Sener [et al.] // *J. Urol.* – 2013. – Vol. 190, N 2. – P. 772-778.
227. Shaker, M. E. Comparison of vitamin E, L-carnitine and melatonin in ameliorating carbon tetrachloride and diabetes induced hepatic oxidative stress / M. E. Shaker [et al.] // *J. Physiol. Biochem.* – 2009. – Vol. 65. – P. 225–233.
228. Shawky, H. M. Effect of recombinant erythropoietin on ischemia-reperfusion-induced apoptosis in rat liver/ H. M. Shawky [et al.] // *J. Physiol. Biochem.* – 2012. – Vol. 68, N 1. – P. 19-28.
229. Shen, Y. The Cardioprotective Effects of Hydrogen Sulfide in Heart Diseases: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Potential / Y. Shen [et al.] // *Oxid. Med. Cell. Longev.* – 2015. – Vol. 2015. – P. 925167.
230. Shi, S. Current Antioxidant Treatments in Organ Transplantation / S. Shi, F. Xue // *Oxid. Med. Cell. Longev.* – 2016. – Vol. 2016, ID 8678510. – P. 1-9.

231. Shimada, S. Hydrogen sulfide augments survival signals in warm ischemia and reperfusion of the mouse liver / S. Shimada [et al.] // *Surg. Today*. – 2015. – Vol. 45, N 7. – P. 892-903.
232. Sigala, F. Therapeutic value of melatonin in an experimental model of liver injury and regeneration / F. Sigala [et al.] // *J. Pineal. Res.* – 2006. – Vol. 40. – P. 270–279.
233. Simonson, T. S. Increased blood-oxygen binding affinity in Tibetan and Han Chinese residents at 4200 m / T. S. Simonson [et al.] // *Exp. Physiol.* – 2014. – Vol. 99, N 12:1624-35.
234. Slomka, M. Nicotinamide and 1-methylnicotinamide reduce homocysteine neurotoxicity in primary cultures of rat cerebellar granule cells / M. Slomka, E. Zieminska, J. Lazarewicz // *Acta Neurobiol. Exp. (Wars)*. – 2008. – Vol. 68, № 1. – P. 1-9.
235. Sluiter, E. The production of hydrogen sulphide by animal tissues / E. Sluiter // *Biochem. J.* – 1930. – Vol. 24, N 2. – P. 549-563.
236. Song, X. Combined preconditioning and postconditioning provides synergistic protection against liver ischemic reperfusion injury / X. Song [et al.] // *Int. J. Biol. Sci.* – 2012. – Vol. 8, N 5. – P. 707-718.
237. Speckmann, B. Peroxynitrite: From interception to signaling / B. Speckmann [et al.] // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2016. – Vol. 595. – P. 153-160.
238. Stein, A. Metabolic and cardiac signaling effects of inhaled hydrogen sulfide and low oxygen in male rats / A. Stein [et al.] // *J. Appl. Physiol.* (1985). – 2012. – Vol. 112, N 10. – P. 1659-1669.
239. Stein, A. Redox Biology of Hydrogen Sulfide: Implications for Physiology, Pathophysiology, and Pharmacology / A. Stein, S. M. Bailey // *Redox Biol.* – 2013. – Vol. 1, N 1. – P. 32-39.
240. Stepuro, T. L. Nitric oxide effect on the hemoglobin-oxygen affinity / T. L. Stepuro, V. V. Zinchuk // *J. Physiol. Pharmacol.* – 2006. – Vol. 57, N 1. – P. 29-38.
241. Suematsu, M. Carbon monoxide: an endogenous modulator of sinusoidal tone in the perfused rat liver / M. Suematsu [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 1995. – Vol. 96, N 5. – P. 2431-2437.
242. Suhr, F. Moderate exercise promotes human RBC-NOS activity, NO production and deformability through Akt kinase pathway / F. Suhr [et al.] // *PLoS One*. – 2012. – Vol. 7, N 9. – P. e45982.
243. Sun, Y. Hydrogen sulfide and vascular relaxation / Y. Sun [et al.] // *Chin. Med. J. (Engl)*. – 2011. – Vol. 124, N 22. – P. 3816-3819.

244. Suyavaran, A. Preconditioning methods in the management of hepatic ischemia reperfusion-induced injury: Update on molecular and future perspectives / A. Suyavaran, C. Thirunavukkarasu // *Hepatol. Res.* – 2017. – Vol. 47, N 1. – P. 31-48.
245. Szabó, C. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics / C. Szabó, H. Ischiropoulos, R. Radi // *Nat. Rev. Drug Discov.* – 2007. – Vol. 6, N 8. – P. 662-680.
246. Tamizhselvi, R. Preprotachykinin-A gene deletion regulates hydrogen sulfide-induced toll-like receptor 4 signaling pathway in cerulein-treated pancreatic acinar cells / R. Tamizhselvi [et al.] // *Pancreas.* – 2011. – Vol. 40, N 3. – P. 444-452.
247. Tan, D. X. One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? / D. X. Tan [et al.] // *J. Pineal Res.* – 2007. – Vol. 42, N 1. – P. 28-42.
248. Tan, G. Hydrogen sulfide attenuates carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity, liver cirrhosis and portal hypertension in rats / G. Tan [et al.] // *PLoS One.* – 2011. – Vol. 6, N 10. – ID.e25943. – P. 1-10.
249. Taura, P. Moderate primary pulmonary hypertension in patients undergoing liver transplantation / P. Taura [et al.] // *Anesth. Analg.* – 1996. – Vol. 83, N 4. – P. 675-680.
250. Tomás-Zapico, C. A proposed mechanism to explain the stimulatory effect of melatonin on antioxidative enzymes. / C. Tomás-Zapico, A. Coto-Montes // *J. Pineal. Res.* – 2005. – Vol. 39, N 2. – P. 99-104.
251. Ueda, K. Hydrogen Sulfide, a Potential Cardioprotective Gas Activating a Life Span Regulator / K. Ueda, N. Fukuma, E. Takimoto // *Int. Heart J.* – 2016. – Vol. 57, N 4. – P. 393-394.
252. Ulker, P. Shear stress activation of nitric oxide synthase and increased nitric oxide levels in human red blood cells / P. Ulker [et al.] // *Nitric Oxide.* – 2011. – Vol. 24, № 4. – P. 184-191.
253. van Riel, W. G. How much ischemia can the liver tolerate during resection? / W. G. van Riel [et al.] // *Hepatobiliary Surg. Nutr.* – 2016. – Vol. 5, N 1. – P. 58-71.
254. Vardanian, A.J. Molecular Mediators of Liver Ischemia and Reperfusion Injury: A Brief Review / A. J. Vardanian, R. W. Busuttil, J. W. Kupiec-Weglinski // *Mol. Med.* – 2008. – Vol. 14, N 5-6. – P. 337-345.

255. Vollmar, B. The hepatic microcirculation: mechanistic contributions and therapeutic targets in liver injury and repair / B. Vollmar, M. D. Menger // *Physiol. Rev.* – 2009. – Vol. 89, N 4. – P. 1269-1339.
256. Wang, J. F. Role of hydrogen sulfide in secondary neuronal injury / J. F. Wang [et al.] // *Neurochem. Int.* – 2014. – Vol. 64. – P. 37-47.
257. Wang, J. Isoproterenol-mediated heme oxygenase-1 induction inhibits high mobility group box 1 protein release and protects against rat myocardial ischemia/reperfusion injury in vivo / J. Wang [et al.] // *Mol. Med. Rep.* – 2014. – Vol. 9, N 5. – P. 1863-1868.
258. Wang, R. The gasotransmitter role of hydrogen sulfide / R. Wang // *Antioxid. Redox Signal.* – 2003. – Vol. 5, N 4. – P. 493-501.
259. Wang, Y. Hydrogen sulfide protects blood-brain barrier integrity following cerebral ischemia / Y. Wang [et al.] // *J. Neurochem.* – 2014. – Vol. 129, N 5. – P. 827-838.
260. Watała, C. Anti-diabetic effects of 1-methylnicotinamide (MNA) in streptozocin-induced diabetes in rats / C. Watała [et al.] // *Pharmacol. Rep.* – 2009. – Vol. 61, № 1. – P. 86-98.
261. Wei, Y. Carbon monoxide-releasing molecule-2 (CORM-2) attenuates acute hepatic ischemia reperfusion injury in rats / Y. Wei [et al.] // *BMC Gastroenterol.* – 2010. – Vol. 10, N 42. – P. 1-9.
262. Weigand, K. Ischemia/Reperfusion injury in liver surgery and transplantation: pathophysiology / K. Weigand [et al.] // *HPB Surg.* – 2012. – Vol. 2012, ID 176723. – P. 1-8.
263. Weinberg, J. A. Red blood cell transfusion and its effect on microvascular dysfunction in shock states / J. A. Weinberg, R. P. Patel // *Best Pract. Res. Clin. Anaesthesiol.* – 2016. – Vol. 30, N 4. – P. 491-498.
264. Whiteman, M. The effect of hydrogen sulfide donors on lipopolysaccharide-induced formation of inflammatory mediators in macrophages / M. Whiteman [et al.] // *Antioxid. Redox Signal.* – 2010. – Vol. 12, N 10. – P. 1147-1154.
265. Woolbright, B. L. Sterile inflammation in acute liver injury: myth or mystery? / B. L. Woolbright, H. Jaeschke // *Expert. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* – 2015. – Vol. 9, N 8. – P. 1027-1029.

266. Wu, D. Role of hydrogen sulfide in ischemia-reperfusion injury / D. Wu [et al.] // *Oxid. Med. Cell. Longev.* – 2015. – Vol. 2015. – P. 186908.
267. Xie, Z. Z. Hydrogen Sulfide and Cellular Redox Homeostasis / Z. Z. Xie, Y. Liu, J. S. Bian // *Oxid. Med. Cell. Longev.* – 2016. – Vol. 2016. – P. 6043038.
268. Xue, R. Hydrogen sulfide treatment promotes glucose uptake by increasing insulin receptor sensitivity and ameliorates kidney lesions in type 2 diabetes / R. Xue [et al.] // *Antioxid. Redox Signal.* – 2013. – Vol. 19, N 1. – P. 5-23.
269. Yang, G. H₂S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine gamma-lyase / G. Yang [et al.] // *Science.* – 2008. – Vol. 322, N 5901. – P. 587-590.
270. Yang, G. Hydrogen sulfide protects against cellular senescence via S-sulphydration of Keap1 and activation of Nrf2 / G. Yang [et al.] // *Antioxid. Redox Signal.* – 2013. – Vol. 18, N 15. – P. 1906-1919.
271. Yuan, G. Protein kinase G-regulated production of H₂S governs oxygen sensing. G. Yuan [et al.] // *Sci. Signal.* – 2015. – Vol. 8, N 373. – P. ra37.
272. Zagli, G. Hydrogen sulfide inhibits human platelet aggregation / G. Zagli [et al.] // *Eur. J. Pharmacol.* – 2007. – Vol. 559, N 1. – P. 65-68.
273. Zakhary, R. Heme oxygenase 2: endothelial and neuronal localization and role in endothelium-dependent relaxation / R. Zakhary [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 1996. – Vol. 93, N 2. – P. 795-798.
274. Zhao, R. Hypoxia increases Nrf2-induced HO-1 expression via the PI3K/Akt pathway / R. Zhao, J. Feng, G. He // *Front. Biosci. (Landmark Ed.)*. – 2016. – Vol. 21. – P. 385-396.
275. Zhang, C. Sorbitol dehydrogenase inhibitor protects the liver from ischemia/reperfusion-induced injury via elevated glycolytic flux and enhanced sirtuin 1 activity / C. Zhang, X. Li, Q. Liu // *Mol. Med. Rep.* – 2015. – Vol. 11, N 1. – P. 283-288.
276. Zhang, Q. L. Hydrogen and oxidative stress injury – from an inert gas to a medical gas / Q. L. Zhang, J. B. Du, C. S. Tang // *Beijing Da. Xue. Xue. Bao.* – 2011. – Vol. 43, N 2. – P. 315-319.
277. Zhang, W. X. Preconditioning and postconditioning reduce hepatic ischemia-reperfusion injury in rats / W. X. Zhang [et al.]

- // Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int. – 2009. – Vol. 8, N 6. – P. 586-590.
278. Zhang, Y. Q. New progress in roles of nitric oxide during hepatic ischemia reperfusion injury / Y. Q. Zhang [et al.] // World J. Gastroenterol. – 2017. – Vol. 23, N 14. – P. 2505-2510.
279. Zheng, N. Schisantherin A protects against liver ischemia-reperfusion injury via inhibition of mitogen-activated protein kinase pathway / N. Zheng [et al.] // Int. Immunopharmacol. – 2017. – Vol. 47. – P. 28-37.
280. Zhong, Z. Activation of the oxygen-sensing signal cascade prevents mitochondrial injury after mouse liver ischemia-reperfusion / Z. Zhong, [et al.] // Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. – 2008. – Vol. 295, N 4. – P. G823-832.
281. Zhou, H. Hydrogen sulfide reduces RAGE toxicity through inhibition of its dimer formation / H. Zhou [et al.] // Free Radic. Biol. Med. – 2017. – Vol. 104. – P. 262-271.
282. Zhou, S. S. Nicotinamide overload may play a role in the development of type 2 diabetes / S. S. Zhou [et al.] // World. J. Gastroenterol. – 2009. – Vol. 15, № 45. – P. 5674-5684.
283. Zinchuk, V. V. Influence of Different Oxygen Modes on the Blood Oxygen Transport and Prooxidant-Antioxidant Status during Hepatic Ischemia-Reperfusion / V. V. Zinchuk, M. N. Khodovsky, D. A. Maslakov // Physiol. Res. – 2003. – Vol. 52, № 5. – P. 533-544.
284. Zuckerbraun, B. S. Carbon monoxide signals via inhibition of cytochrome c oxidase and generation of mitochondrial reactive oxygen species / B. S. Zuckerbraun [et al.] // FASEB J. – 2007. – Vol. 21, N 4. – P. 1099-1106.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Таблица 1. – Влияние N₁-метилникотинамида на показатели прооксидантно-антиоксидантного баланса и активность трансаминаз крови при ишемии-реперфузии печени у крыс (M±m)

Показатель	Ишемия-реперфузия (1-я группа, n=8)			Ишемия-реперфузия + N ₁ -метилникотинамид (2-я группа, n=8)		
	Исходный уровень	30 мин. ишемии	120 мин. Реперфузии	Исходный уровень	30 мин. ишемии	120 мин. реперфузии
ДК _{пл} , ΔE ₂₃₃ /мл	1,03±0,06	1,8±0,2*	3,8±0,55*	1,0±0,07	1,67±0,14*	1,5±0,09*#
ОШ _{пл} , ЕД/мл	22,58±3,2	58,4±6,9*	165,6±20,28*	20,0±2,8	42,3±5,24*	46,2±7,9*#
Токоферол _{пл} , мкмоль/л	21,1±0,33	19,9±0,3*	17,1±0,35*	21,1±0,3	20,36±0,27	18,7±0,2*#
Ретинол _{пл} , мкмоль/л	2,77±0,12	2,64±0,1	1,8±0,04*	2,6±0,14	2,35±0,1	2,1±0,07*#
Каталаза _{эр} , ммоль/л*г _{нб} *с	0,9±0,09	2,2±0,2*	0,5±0,01*	0,98±0,08	2,35±0,16*	1,6±0,15*#
АлАТ, Ед/л	51,6±8,0	233,0±37,3*	437,2±38,2*	48,4±8,0	130,9±22,8*#	220,3±40,9*#
АсАТ, Ед/л	58,5±7,4	307,4±27,5*	484,8±20,6*	61,0±3,7	148,4±27,9*#	266,0±28,7*#

Примечание – * – достоверное различие по отношению к исходному уровню в данной группе, # – достоверное отличие по отношению к 1-й группе в соответствующий период, пл – в плазме, эр – в эритроцитах

Таблица 2. – Влияние N₁-метилникотинамида на прооксидантно-антиоксидантный баланс и функциональное состояние печени в постишемическом периоде в условиях ингибирования NO-синтазной функции организма (M±m).

Показатель	Ишемия-реперфузия + (1-я группа, n=8)			Ишемия-реперфузия + L-NAME + N ₁ -метилникотинамид (3-я группа, n=8)		
	Исходный уровень	30 мин. ише- мии	120 мин. реперфузии	Исходный уровень	30 мин. ишемии	120 мин. реперфузии
ДК _{пл} , ΔE ₂₃₃ /мл	1,03±0,06	1,8±0,2*	3,8±0,55*	1,02±0,07	1,81±0,17*	2,14±0,17*#
ОШ _{пл} , ЕД/мл	22,58±3,2	58,4±6,9*	165,6±20,28*	22,7±2,4	41,6±4,7*#	46,5±4,3*#
α-Токоферол _{пл} , мкмоль/л	21,1±0,33	19,9±0,3*	17,1±0,35*	21,2±0,3	20,5±0,3	18,5±0,27*#
Ретинол _{пл} , мкмоль/л	2,77±0,12	2,64±0,1	1,8±0,04*	2,48±0,09	2,26±0,04*#	2,06±0,03*#
Каталаза _{эр} , ммоль/л*Г _{Нб} *с	0,9±0,09	2,2±0,2*	0,5±0,01*	0,91±0,08	2,14±0,2*	1,56±0,12*#
АлАТ, Ед/л	51,6±8,0	233,0±37,3*	437,2±38,2*	46,9±3,2	175,1±16,7*	298,1±19,3*#
АсАТ, Ед/л	58,5±7,4	307,4±27,5*	484,8±20,6*	56,1±4,2	267,8±29,4*	300,3±8,7*#

Примечание – * – достоверное различие по отношению к исходному уровню в данной группе, # – достоверное различие по отношению к 5-й группе в соответствующий период, пл – в плазме, эр – в эритроцитах

Таблица 3. – Влияние совместной инфузии N₁-метилникотинамида и RO3244794 на показатели прооксидантно-антиоксидантного баланса и активность трансаминаз крови при ишемии-реперфузии печени у крыс (M±m)

Показатель	Ишемия-реперфузия + N ₁ -метилникотинамид (2-я группа, n=8)			Ишемия-реперфузия + RO3244794 + N ₁ -метилникотинамид (4-я группа, n=8)		
	Исходный уровень	30 мин. ишемии	120 мин. реперфузии	Исходный уровень	30 мин. ишемии	120 мин. реперфузии
ДК _{пл} , ΔE ₂₃₃ /мл	1,0±0,07	1,67±0,14*	1,5±0,09*	1,0±0,08	1,63±0,11*	4,67±0,3*#
ОШ _{пл} , ЕД/мл	20,0±2,8	42,3±5,24*	46,2±7,9*	21,1±2,6	32,4±3,2*	196,4±22,7*
α-Токоферол _{пл} , мкмоль/л	21,1±0,3	20,36±0,27	18,7±0,2*	20,8±0,3	19,9±0,3*	17,3±0,34*#
Ретинол _{пл} , мкмоль/л	2,6±0,14	2,35±0,1	2,1±0,07*	2,3±0,06	2,2±0,06	1,82±0,04*#
Каталаза _{эр} , ммоль/л*ГНб*с	0,98±0,08	2,35±0,16*	1,6±0,15*	0,84±0,11	1,89±0,17*	0,52±0,1*#
АлАТ, Ед/л	48,4±8,0	130,9±22,8*	220,3±40,9*	50,3±3,4	316,0±81,0*#	705,9±127,9*#
АсАТ, Ед/л	61,0±3,7	148,4±27,9*	266,0±28,7*	64,2±6,0	321,6±36,1*#	708,0±73,8*#

Примечание – * – достоверное различие по отношению к исходному уровню в данной группе, # – достоверное различие по отношению ко 2-й группе в соответствующий период, пл – в плазме, эр – в эритроцитах

Таблица 4. – Влияние совместной инфузии 1-МНА и ПАГ на показатели прооксидантно-антиоксидантного баланса и активность трансаминаз крови при ишемии-реперфузии печени у крыс ($M \pm m$)

Показатель	Ишемия-реперфузия + N ₁ -метилникотинамид (2-я группа, n=8)			Ишемия-реперфузия + ПАГ + N ₁ -метилникотинамид (5-я группа, n=8)		
	Исходный уровень	30 мин. ишемии	120 мин. реперфузии	Исходный уровень	30 мин. ишемии	120 мин. реперфузии
ДК _{пл} , ΔE ₂₃₃ /мл	1,0±0,07	1,67±0,14*	1,5±0,09*	0,98±0,09	1,72±0,11*	4,67±0,34*#
ОШ _{пл} , ЕД/мл	20,0±2,8	42,3±5,24*	46,2±7,9*	20,9±1,9	56,9±6,1*	168,7±26,3*#
α-Токоферол _{пл} , мкмоль/л	21,1±0,3	20,36±0,27	18,7±0,2*	20,8±0,3	19,9±0,3*	17,2±0,3*#
Ретинол _{пл} , мкмоль/л	2,6±0,14	2,35±0,1	2,1±0,07*	2,6±0,14	2,4±0,09	1,75±0,05*#
Каталаза _{эр} , ммоль/л*Г _{Нб} *с	0,98±0,08	2,35±0,16*	1,6±0,15*	0,89±0,1	1,9±0,26*	0,47±0,09*#
АлАТ, ЕД/л	48,4±8,0	130,9±22,8*	220,3±40,9*	41,1±4,0	166,3±14,5*	420,0±29,8*#
АсАТ, ЕД/л	61,0±3,7	148,4±27,9*	266,0±28,7*	52,9±5,2	173,1±12,6*	452,9±28,5*#

Примечание – * – достоверное различие по отношению к исходному уровню в данной группе, # – достоверное различие по отношению ко 2-й группе в соответствующий период, пл – в плазме, эр – в эритроцитах

Таблица 5. – Влияние разных доз мелатонина на показатели прооксидантно-антиоксидантного баланса и активность трансаминаз крови при ИРП у крыс ($M \pm m$)

Показатель	Контроль	ИРП (2-я группа)	ИРП + мелатонин (1 мг/кг)	ИРП + мелатонин (2 мг/кг)	ИРП + мелатонин (10 мг/кг)
n	9	8	7	9	9
ДК _{пл} , $\Delta E_{233}/\text{мл}$	$0,94 \pm 0,12$	$3,96 \pm 0,4^*$	$3,43 \pm 0,21^*$	$3,18 \pm 0,22^*$	$1,86 \pm 0,13^{* \#}$
ДК _{печ} , $\Delta E_{233}/\text{г}$	$9,33 \pm 0,67$	$47,3 \pm 3,71^*$	$51,1 \pm 3,1^*$	$43,3 \pm 2,77^*$	$20,58 \pm 2,1^{* \#}$
ОШ _{пл} , ЕД/мл	$21,74 \pm 1,93$	$188,2 \pm 11,5^*$	$158,3 \pm 11,7^*$	$127,4 \pm 7,1^{* \#}$	$87,2 \pm 6,64^{* \#}$
ОШ _{печ} , ЕД/г	$129,4 \pm 11,2$	$500,8 \pm 58,7^*$	$474,5 \pm 33,6^*$	$373,2 \pm 22,1^{* \#}$	$256,5 \pm 24,4^{* \#}$
α -токоферол _{пл} , мкмоль/л	$20,5 \pm 0,39$	$17,55 \pm 0,54^*$	$17,3 \pm 0,42^*$	$17,94 \pm 0,3^*$	$19,67 \pm 0,33^{\#}$
α -токоферол _{печ} , мкмоль/г	$189,76 \pm 6,3$	$145,3 \pm 5,65^*$	$150,7 \pm 4,5^*$	$154 \pm 2,77^*$	$177,4 \pm 3,84^{\#}$
ретинол _{пл} , мкмоль/л	$2,51 \pm 0,1$	$1,75 \pm 0,03^*$	$1,73 \pm 0,02^*$	$1,8 \pm 0,04^*$	$2,27 \pm 0,09^{\#}$
ретинол _{печ} , мкмоль/г	$21,85 \pm 0,65$	$16,41 \pm 0,48^*$	$16,9 \pm 0,47^*$	$17,05 \pm 0,4^*$	$20,4 \pm 0,48^{\#}$
Каталаза _{эр} , ммоль/л*Г _{Нб} *с	$0,94 \pm 0,07$	$0,4 \pm 0,11^*$	$0,32 \pm 0,1^*$	$0,51 \pm 0,07^*$	$1,42 \pm 0,016^{* \#}$
Каталаза _{печ} , мм/л*Г _{белка} *с	$3,14 \pm 0,31$	$1,1 \pm 0,3^*$	$1,06 \pm 0,14^*$	$1,45 \pm 0,35^*$	$7,61 \pm 0,5^{* \#}$
АлАТ _{пл} , ЕД/л	$30,38 \pm 4,48$	$314,9 \pm 35,6^*$	$286,3 \pm 27,6^*$	$260,2 \pm 23,9^*$	$76,28 \pm 12,2^{* \#}$
АсАТ _{пл} , ЕД/л	$38,84 \pm 5,16$	$328,7 \pm 25,85^*$	$290,3 \pm 26,4^*$	$281,1 \pm 20,1^*$	$80,76 \pm 12,3^{* \#}$

Примечание – * – достоверное различие по отношению к контролю, # – достоверное различие по отношению ко 2-й группе, пл – в плазме, эр – в эритроцитах, печ – в печени

Таблица 6. – Изменение параметров кислородтранспортной функции крови на 120-й минуте реперфузии печени у опытных крыс под влиянием разных доз мелатонина ($M \pm m$)

Показатель	1-я группа (контроль)	2-я группа (ИРП)	3-я группа (ИРП + Мелатонин, 1 мг/кг)	4-я группа (ИРП + Мелатонин, 2 мг/кг)	5-я группа (ИРП + Мелатонин, 10 мг/кг)
n	9	8	7	9	9
p50 _{реал} , мм рт. ст.	32,37±0,53	41,62±0,58*	39,66±0,7*#	33,97±0,95*#	33,29±1,61#
p50 _{станд} , мм рт. ст.	30,91±0,91	34,04±0,89*	35,98±0,95#	31,42±1,0	29,27±1,78#
Hb, г/л	107,22±5,63	119,75±8,94	119,0±5,87	130,6±3,26*	118,11±5,47
MetHb, г/л	0,63±0,18	0,41±0,13	0,36±0,13	0,47±0,1	0,41±0,17
pO ₂ , мм рт. ст.	27,78±2,71	35,25±1,98*	32,57±3,42	27,67±2,04#	28,78±4,23
pH, ед.	7,353±0,024	7,227±0,029*	7,296±0,017	7,317±0,019#	7,280±0,038
pCO ₂ , мм рт. ст.	48,31±4,59	56,68±3,24	68,1±5,1*	61,01±3,12*	56,4±4,84
HCO ₃ ⁻ , ммоль/л	26,64±1,53	24,01±1,71	33,29±1,35*#	31,46±1,12*#	26,34±1,21
TCO ₂ , ммоль/л	28,14±1,65	25,75±1,77	35,39±1,51*#	33,32±1,18*#	28,07±1,25
ABE, ммоль/л	1,21±1,13	-3,63±1,77*	5,63±0,93*#	4,32±1,08#	-0,57±1,35
SBE, ммоль/л	0,89±1,41	-3,81±2,03*	7,03±1,3*#	5,1±1,23*#	-0,6±1,46
SBC, ммоль/л	24,61±0,81	20,73±1,39*	27,91±0,72*#	26,71±0,82#	23,06±1,08

Примечание – * – достоверное различие по отношению к контролю, # – достоверное различие по отношению ко 2-й группе

Таблица 7. – Влияние мелатонина (10 мг/кг) на показатели кислородтранспортной функции крови при ишемии-реперфузии печени у крыс в условиях введения L-NAME ($M \pm m$)

Показатель/единица измерения		Контроль 1-я группа (n=9)	Ишемия-реперфузия печени		
			- 2-я группа (n=8)	+ мелатонин	
				- 3-я группа (n=9)	+ L-NAME 4-я группа (n=9)
p50 _{реал}	мм рт. ст.	32,37±0,53	41,62±0,58*	33,29±1,61#	40,4±0,73*\$
p50 _{станд}	мм рт. ст.	30,91±0,91	34,04±0,89*	29,27±1,78#	34,32±1,08*\$
Hb	г/л	107,22±5,63	119,75±8,94	118,11±5,47	114,25±3,2
MetHb	%	0,63±0,18	0,41±0,13	0,41±0,17	0,25±0,07*
pO ₂	мм рт. ст.	27,78±2,71	35,25±1,98*	28,78±4,23	34,0±2,9
pH	ед.	7,353±0,024	7,227±0,029*	7,280±0,038	7,237±0,017*
pCO ₂	мм рт. ст.	48,31±4,59	56,68±3,24	56,4±4,84	81,46±2,32*#
HCO ₃ ⁻	ммоль/л	26,64±1,53	24,01±1,71	26,34±1,21	35,08±0,6*#
TCO ₂	ммоль/л	28,14±1,65	25,75±1,77	28,07±1,25	37,56±0,57*#
ABE	ммоль/л	1,21±1,13	-3,63±1,77*	-0,57±1,35	6,05±0,71*#
SBE	ммоль/л	0,89±1,41	-3,81±2,03*	-0,6±1,46	7,45±0,84*#
SBC	ммоль/л	24,61±0,81	20,73±1,39*	23,06±1,08	28,26±0,58*#

Примечание – L-NAME – метиловый эфир N_ω-нитро-L-аргинина (неселективный ингибитор NO-синтазы);

* – достоверное различие по отношению к 1-й группе ($p < 0,05$), # – достоверное различие по отношению ко 2-й группе ($p < 0,05$), \$ – достоверное различие по отношению к 3-й группе ($p < 0,05$)

Таблица 8. – Влияние мелатонина на показатели прооксидантно-антиоксидантного баланса и активность трансаминаз в крови и в печени при ишемии-реперфузии у крыс в условиях введения L-NAME ($M \pm m$)

Показатель	Контроль 1-я группа (n=9)	Ишемия-реперфузия печени		
		-	+ мелатонин	
			- 3-я группа (n=9)	+ L-NAME 4-я группа (n=9)
ДК _{пл} , $\Delta E_{233}/\text{мл}$	0,94 $\pm$ 0,12	3,96 $\pm$ 0,4*	1,86 $\pm$ 0,13*#	2,63 $\pm$ 0,24*#
ДК _{печ} , $\Delta E_{233}/\text{г}$	9,33 $\pm$ 0,67	47,3 $\pm$ 3,71*	20,58 $\pm$ 2,1*#	32,73 $\pm$ 2,14*#
ОШ _{пл} , ЕД/мл	21,74 $\pm$ 1,93	188,2 $\pm$ 11,5*	87,2 $\pm$ 6,64*#	141,08 $\pm$ 7,84*#
ОШ _{печ} , ЕД/г	129,4 $\pm$ 11,2	500,8 $\pm$ 58,7*	256,5 $\pm$ 24,4*#	344,6 $\pm$ 23,6*#
α -токоферол _{пл} , мкмоль/л	20,5 $\pm$ 0,39	17,55 $\pm$ 0,54*	19,67 $\pm$ 0,33#	18,35 $\pm$ 0,34*#
α -токоферол _{печ} , мкмоль/г	189,76 $\pm$ 6,3	145,3 $\pm$ 5,65*	177,4 $\pm$ 3,84#	164,14 $\pm$ 2,48*#
ретинол _{пл} , мкмоль/л	2,51 $\pm$ 0,1	1,75 $\pm$ 0,03*	2,27 $\pm$ 0,09#	1,87 $\pm$ 0,02*#
ретинол _{печ} , мкмоль/г	21,85 $\pm$ 0,65	16,41 $\pm$ 0,48*	20,4 $\pm$ 0,48#	18,22 $\pm$ 0,4*#
Каталаза _{эр} , ммоль/л*Г _{Нб} *с	0,94 $\pm$ 0,07	0,4 $\pm$ 0,11*	1,42 $\pm$ 0,016*#	0,88 $\pm$ 0,13#
Каталаза _{печ} , ммоль/л*Г _{белка} *с	3,14 $\pm$ 0,31	1,1 $\pm$ 0,3*	7,61 $\pm$ 0,5*#	4,83 $\pm$ 0,53*#
АлАТ _{пл} , ЕД/л	30,38 $\pm$ 4,48	314,9 $\pm$ 35,6*	76,28 $\pm$ 12,2*#	189,6 $\pm$ 18,64*#
АсАТ _{пл} , ЕД/л	38,84 $\pm$ 5,16	328,7 $\pm$ 25,85*	80,76 $\pm$ 12,3*#	196,1 $\pm$ 17,77*#

Примечание – пл – плазма, эр – эритроциты, печ – гомогенат печени; * – достоверное различие по отношению к 1-й группе ($p < 0,05$), # – достоверное различие по отношению ко 2-й группе ($p < 0,05$), \$ – достоверное различие по отношению к 3-й группе ($p < 0,05$)

Таблица 9. – Показатели кислородтранспортной функции, прооксидантно-антиоксидантного перекисного окисления липидов и трансаминаз печеночной венозной крови у кроликов (Ме (25%; 75%))

Показатель	ИРП (1-я группа, n=11)			ИРП+ГП (2-я группа, n=9)		
	Исходная	30 мин. ишемии	120 мин. реперфузии	Исходная	30 мин. ишемии	120 мин. реперфузии
p50 _{реал} , мм рт.ст.	32,6 (32,5; 34,5)	39,3* (37,97; 43,3)	42,3* (39,2; 43,6)	29,2# (28,2; 30,9)	33,6# (31,5; 36,2)	33,8*# (30,9; 35,1)
p50 _{станд} , мм рт.ст.	31,4 (30,7; 33,4)	27,9* (25,64; 29,5)	29,06* (27,46; 31,1)	32,29 (29,4; 32,9)	27,44* (25,8; 32,5)	31,65 (28,55; 33,3)
Hb, г/л	119,0 (103; 139)	121,0 (104; 140)	126,0 (98; 133)	118,0 (107; 145)	118,0 (111; 123)	118,0 (111; 131)
pO ₂ , мм рт. ст.	39,0 (37,0; 49,0)	21,0* (19,0; 33,0)	38,0 (32,0; 40,0)	40,0 (34,0; 43,0)	26,0* (20,0; 33,0)	29,0* (28,0; 33,0)
pH, ед.	7,365 (7,349;7,4)	7,115* (7,059;7,229)	7,112* (7,07; 7,177)	7,473# (7,44; 7,49)	7,196* (7,07;7,387)	7,306*# (7,264;7,429)
pCO ₂ , мм рт. ст.	48,0 (41,8; 53,5)	68,0* (52,3; 71,1)	55,7* (48,1; 74,3)	39,7 (34,3; 44,6)	44,6* (43,4; 68,7)	48,9* (43,2; 52,2)
HCO ₃ ⁻ , ммоль/л	26,7 (25,4; 29,4)	20,5* (17,3; 23,4)	18,7* (14,6; 22,4)	29,4 (27,3; 31,2)	26,4* (20,2; 29,0)	28,2# (20,0; 29,7)
TCO ₂ , ммоль/л	28,2 (26,8;30,6)	22,6* (19,4; 25,3)	20,8* (16,7; 24,2)	31,0 (29,1; 31,1)	27,7 (22,3; 30,7)	29,5# (21,3; 31,5)
ABE, ммоль/л	1,3 (0,3; 5,4)	- 7,5* (-14,1; -3,6)	- 9,4* (-14,6; -5,0)	6,6 (0,5; 7,2)	- 0,9*# (-8,5; 1,7)	3,0*# (-6,2; 4,1)

Показатель	ИРП (1-я группа, n=11)			ИРП+ГП (2-я группа, n=9)		
	Исходная	30 мин. ишемии	120 мин. реперфузии	Исходная	30 мин. ишемии	120 мин. реперфузии
SBE, ммоль/л	0,9 (-0,2; 5,5)	- 7,9* (-14,0; -3,7)	- 10,0* (-15,8; -5,9)	6,2 (0,4; 7,1)	- 1,6*# (-9,3; 1,7)	3,2# (-7,2; 3,7)
SBC, ммоль/л	25,0 (24,3; 28,7)	16,6* (12,7; 20,3)	16,6 * (12,0; 20,0)	28,7 (24,8; 29,9)	22,0*# (16,6; 24,8)	26,0*# (18,6; 27,2)
ДК, ΔE ₂₃₃ /мл	0,56 (0,52; 0,62)	1,28* (0,9; 1,48)	2,24* (2,08; 2,82)	0,46 (0,4; 0,52)	1,12* (0,9; 1,4)	0,58# (0,54; 0,62)
ОШ, ЕД/мл	7,64 (7,27; 8,34)	9,88* (8,96; 11,34)	11,84* (10,2; 14,65)	7,46 (7,04; 8,22)	9,25*# (8,96; 9,64)	8,12# (7,95; 8,77)
α-Токоферол, мкмоль/л	20,12 (19,7; 21,3)	18,34* (17,7; 19,4)	16,44* (15,1; 17,4)	21,36 (20,2; 21,6)	20,45*# (19,54; 20,9)	19,45*# (18,9; 19,68)
Каталаза, ммоль/л*Г _{НБ} *с	1,73 (1,42; 1,89)	2,75* (2,34; 2,94)	0,44* (0,23; 0,77)	1,55 (1,3; 1,69)	2,03*# (1,79; 2,17)	1,69# (1,19; 1,84)
АлАТ, Ед/л	31,43 (26,2; 38,4)	164,12* (118,7; 230,5)	352,69* (307,3; 431,3)	33,17 (27,9; 40,2)	97,78*# (80,3; 106,5)	113,49*# (89,0; 111,7)
АсАТ, Ед/л	33,17 (29,7; 41,9)	153,65* (108,3; 251,4)	345,71* (312,5; 370)	34,92 (31,4; 40,2)	94,28*# (85,6; 120,5)	111,74*# (85,6; 120,5)

Примечание – ИРП – ишемия-реперфузия печени, ГП – гипоксическое preconditioning; достоверное различие (p<0,05) по отношению к: * – исходному уровню в своей группе; # – к соответствующему периоду в 1-й группе

Таблица 10. – Показатели кислородтранспортной функции, перекисного окисления липидов и трансаминаз смешанной венозной крови у кроликов (медиана, нижний квартиль, верхний квартиль (Ме (25%; 75%))

Показатель	ИРП (1-я группа, n=11)			ИРП+ГП (2-я группа, n=9)		
	Исходная	30 мин. ишемии	120 мин. реперфузии	Исходная	30 мин. ишемии	120 мин. реперфузии
p50 _{реал} , мм рт.ст.	32,6 (29,3; 36,2)	41,9* (34,3; 44,5)	40,78* (37,05; 43,2)	29,8 (28,7; 31,2)	35,8*# (33,56; 36,1)	33,4# (31,0; 36,3)
p50 _{станд} , мм рт.ст.	30,6 (28,2; 33,4)	28,4 (26,7; 30,0)	28,9 (27,29; 32,5)	31,8 (29,7; 32,5)	30,95 (29,2; 33,8)	31,2 (28,93; 33,5)
Нб, г/л	120,0 (106; 137)	111,0 (97; 138)	121,0 (92; 144)	113,0 (107; 133)	115,0 (106; 127)	123,0 (109; 134)
pO ₂ , мм рт. ст.	39,0 (36,0; 47,0)	34,0 (28,0; 39,0)	35,0 (29,0; 47,0)	38,0 (37,0; 39,0)	28,0 (25,0; 34,0)	35,0 (30,0; 38,0)
pH, ед.	7,346 (7,33;7,42)	7,127* (7,06; 7,223)	7,132* (7,076; 7,18)	7,429 (7,35;7,46)	7,304*# (7,177;7,34)	7,346# (7,271;7,398)
pCO ₂ , мм рт. ст.	47,1 (40,4; 49,1)	57,2* (48,3; 76,7)	51,0 (46,9; 73,8)	41,0 (40,0; 45,6)	50,9* (48,4; 53,6)	47,9* (43,1; 54,1)
HCO ₃ ⁻ , ммоль/л	27,2 (22,1; 30,9)	19,2* (15,5; 23,9)	19,2* (14,5; 23,8)	27,3 (25,4; 29,6)	25,4* (20,2; 28,3)	25,7# (19,6; 28,9)
TCO ₂ , ммоль/л	28,7 (23,3; 32,4)	20,7* (18,1; 26,3)	20,8* (16,8; 26,3)	28,8 (27,0; 31,0)	27,0* (21,8; 29,8)	27,3# (21,1; 30,4)
ABE, ммоль/л	2,4 (-2,9; 7,1)	- 7,2* (-15,2; - 5,7)	- 8,8* (-15,1; -5,2)	2,9 (1,7; 5,4)	-0,6*# (-7,9; 4,1)	-0,2# (-7,1; 4,6)

Показатель	ИРП (1-я группа, n=11)			ИРП+ГП (2-я группа, n=9)		
	Исходная	30 мин. ишемии	120 мин. реперфузии	Исходная	30 мин. ишемии	120 мин. реперфузии
SBE, ммоль/л	1,7 (-3,9; 6,8)	- 7,4* (- 16,6; - 6,0)	- 9,3* (-16,3; -6,4)	2,3 (1,3; 5,0)	-1,1*# (- 8,4; 3,7)	- 0,9# (- 8,4; 4,3)
SBC, ммоль/л	25,4 (21,8; 29,7)	18,1* (12,6; 19,1)	17,2 * (11,7; 20,0)	26,3 (25,4; 28,5)	23,0*# (16,9; 26,6)	24,1# (17,9; 27,6)
ДК, ΔE_{233} /мл	0,54 (0,48; 0,6)	1,18* (0,82; 1,44)	2,18* (1,92; 2,78)	0,52 (0,44; 0,56)	1,22* (0,88; 1,42)	0,68*# (0,6; 0,78)
ОШ, ЕД/мл	7,65 (7,33; 8,21)	9,48* (8,89; 10,41)	11,33* (9,84; 12,31)	7,82 (7,26; 8,32)	8,87*# (7,91; 9,05)	8,96*# (8,24; 9,26)
α -Токоферол, мкмоль/л	20,22 (19,6; 21,25)	18,77* (17,82; 20,1)	16,52* (15,22; 17,4)	21,44# (20,4; 21,96)	20,78*# (20,1; 21,05)	19,76*# (19,4; 20,44)
Каталаза, ммоль/л*Г _{Нб} *с	1,66 (1,35; 1,87)	2,69* (2,2; 3,12)	0,44* (0,41; 0,96)	1,51 (1,37; 1,54)	1,84*# (1,62; 2,1)	1,63# (1,26; 1,81)
АлАТ, Ед/л	27,94 (24,4; 36,7)	144,92* (120,5; 202,5)	350,95* (307; 427,7)	33,17 (26,19; 36,7)	97,78*# (76,8; 110,0)	99,52*# (76,8; 111,7)
АсАТ, Ед/л	31,43 (27,9; 41,9)	125,7* (118,7; 181,6)	345,7* (309; 434,8)	34,92 (27,94; 38,4)	94,28*# (85,6; 111,7)	90,79*# (85,55; 110)

Примечание – ИРП – ишемия-реперфузия печени, ГП – гипоксическое preconditioning; достоверное различие ($p < 0,05$) по отношению к: * – исходному уровню в своей группе; # – к соответствующему периоду в 1-й группе

Таблица 11. – Показатели кислородтранспортной функции, перекисного окисления липидов и трансаминаз печеночной венозной крови у кроликов (Ме (25%; 75%))

Показатель	ZnPP (1-я группа, n=8)			ZnPP + CORM-3 (2-я группа, n=7)		
	Исходная	30 мин. ишемии	120 мин. реперфузии	Исходная	30 мин. ишемии	120 мин. реперфузии
p50 _{реаль} , мм рт.ст.	32,6 (29,8; 34,05)	29,8 (24,05; 35,1)	40,8* (36,8; 42,2)	30,2 (29,0; 33,9)	30,35 (28,8; 42,3)	33,8# (28,2; 37,9)
p50 _{станд} , мм рт.ст.	32,85 (31,85; 34,6)	14,4* (12,3; 23,75)	30,4* (30,2; 32,2)	31,9 (31,1; 33,8)	21,55* (19,5; 29,5)	29,3 (21,6; 33,8)
Hb, г/л	131,5 (116; 134)	133,5 (127; 137,5)	122,0 (117; 124)	130,0 (126; 137)	127,0 (115; 131)	124,0 (116; 127)
pO ₂ , мм рт. ст.	37,5 (32,0; 40,0)	12,5* (10,0; 14,0)	32,0* (28,0; 36,0)	33,0 (27,0; 35,0)	13,0* (7,0; 19,0)	29,0 (17,0; 41,0)
pH, ед.	7,371 (7,346; 7,468)	6,909* (6,757; 7,069)	7,149* (7,106; 7,294)	7,422 (7,393; 7,457)	7,110* (6,758; 7,133)	7,245* (7,032; 7,443)
pCO ₂ , мм рт. ст.	46,2 (38,8; 52,05)	93,65* (75,8; 133,0)	54,1 (47,1; 60,7)	42,8 (38,3; 48,0)	64,1* (62,6; 101,5)	41,6 (37,5; 65,5)
HCO ₃ ⁻ , ммоль/л	31,1 (29,65; 31,45)	21,25* (18,05; 23,05)	19,3* (18,6; 22,6)	29,4 (26,4; 33,8)	20,7* (18,4; 23,4)	19,4* (18,3; 24,5)
TCO ₂ , ммоль/л	32,5 (31,0; 32,9)	25,3* (21,9; 25,8)	21,2* (20,2; 24,6)	30,8 (27,7; 35,0)	22,7* (22,1; 26,3)	21,7* (19,6; 25,7)

Показатель	ZnPP (1-я группа, n=8)			ZnPP + CORM-3 (2-я группа, n=7)		
	Исходная	30 мин. ишемии	120 мин. реперфузии	Исходная	30 мин. ишемии	120 мин. реперфузии
ABE, ммоль/л	6,65 (3,9; 8,45)	- 14,7* (-19,85; -7,1)	- 9,2* (-10,0; -3,1)	4,3 (1,8; 9,6)	- 9,3* (-18,6; -7,6)	- 8,0* (-12,5; 0,1)
SBE, ммоль/л	6,8 (4,05; 8,25)	- 12,55* (-18,35; -6,55)	- 10,1* (-10,5; -3,9)	4,5 (1,3; 10,2)	- 8,9* (-17,7; -7,6)	- 9,2* (-13,2; -0,8)
SBC, ммоль/л	29,1 (26,7; 30,65)	11,0* (7,25; 17,05)	16,1* (15,8; 21,0)	26,7 (25,2; 31,2)	15,5* (8,2; 16,7)	17,3* (13,3; 24,3)
ДК, ΔE_{233} /мл	0,47 (0,38; 0,6)	1,49* (1,25; 1,68)	2,11* (1,93; 2,29)	0,56 (0,36; 0,62)	1,48* (1,36; 1,62)	0,68# (0,44; 0,76)
ОШ, ЕД/мл	7,51 (7,04; 8,13)	10,33* (9,49; 10,89)	11,5* (10,4; 11,99)	7,33 (7,24; 8,56)	9,36* (9,26; 10,37)	8,24# (7,66; 8,82)
АлАТ, Ед/л	30,56 (27,94; 34,0)	141,43* (122,2; 178,96)	317,77* (295,9; 412,9)	29,68 (24,44; 34,9)	164,12* (143,2; 181,6)	108,25*# (73,33; 129,2)
АсАТ, Ед/л	34,05 (30,6; 35,79)	174,6* (167,6; 195,6)	337,85* (316,9; 412,9)	36,67 (33,17; 38,4)	150,16*# (124,0; 167,6)	125,7*# (85,55; 143,2)

Примечание – ZnPP – цинк протопорфирин IX (ингибитор гемоксигеназы-1), CORM-3 – молекула, высвобождающая монооксид углерода; достоверное различие ($p < 0,05$) по отношению к: * – исходному уровню в своей группе; # – к соответствующему периоду в 1-й группе

Таблица 12. – Показатели кислородтранспортной функции, перекисного окисления липидов и трансаминаз смешанной венозной крови у кроликов (Ме (25%; 75%))

Показатель	ZnPP (1-я группа, n=8)			ZnPP + CORM-3 (2-я группа, n=7)		
	Исходная	30 мин. ишемии	120 мин. реперфузии	Исходная	30 мин. ишемии	120 мин. реперфузии
p50 _{реал} , мм рт.ст.	32,55 (30,3; 36,0)	43,05* (40,05; 44,35)	39,95* (37,0; 41,25)	29,9 (29,4; 33,3)	38,35* (36,5; 44,3)	35,5*# (32,4; 36,3)
p50 _{станд} , мм рт.ст.	33,6 (32,2; 34,3)	30,3 (27,95; 31,95)	31,45* (29,7; 32,4)	32,2 (30,5; 34,8)	29,1* (27,9; 31,9)	29,3 (28,1; 33,7)
Hb, г/л	123,0 (117,5; 131,5)	124,0 (113,5; 129,5)	119,5 (115; 125)	126,0 (110; 129)	124,0 (101; 129)	128,0 (116; 129)
pO ₂ , мм рт. ст.	32,5 (29,5; 35,0)	29,0* (25,0; 31,5)	27,0 (25,0; 32,5)	32,0 (26,0; 34,0)	26,0* (22,0; 28,0)	25,0 (22,0; 39,0)
pH, ед.	7,419 (7,302; 7,451)	7,114* (6,998; 7,210)	7,218* (7,140; 7,281)	7,432 (7,401; 7,45)	7,174* (6,99; 7,29)	7,268* (7,138; 7,36)
pCO ₂ , мм рт. ст.	45,9 (41,95; 54,35)	62,3* (56,1; 74,9)	49,45 (45,3; 60,4)	39,0 (38,2; 48,3)	55,2* (44,9; 71,7)	43,6 (42,1; 59,6)
HCO ₃ ⁻ , ммоль/л	30,35 (27,75; 32,35)	21,35* (19,9; 22,7)	20,65* (18,1; 22,9)	26,4 (26,2; 32,1)	20,0* (17,2; 24,3)	20,4* (18,2; 24,5)
TCO ₂ , ммоль/л	31,85 (29,35; 33,65)	23,65* (21,95; 24,55)	22,4* (19,5; 24,25)	27,5 (27,5; 33,7)	21,2* (18,8; 26,3)	22,3* (19,5; 25,8)
ABE, ммоль/л	5,75 (1,45; 8,6)	-7,8* (-11,4; -5,8)	-6,55* (-9,8; -3,45)	3,1 (2,5; 6,7)	-7,4* (-13,2; -4,6)	-6,6* (-8,5; -0,4)

Показатель	ZnPP (1-я группа, n=8)			ZnPP + CORM-3 (2-я группа, n=7)		
	Исходная	30 мин. ишемии	120 мин. реперфузии	Исходная	30 мин. ишемии	120 мин. реперфузии
SBE, ммоль/л	5,6 (1,7; 8,65)	-8,0* (-11,35; -5,95)	-7,55* (-10,5; -3,85)	2,2 (1,5; 7,1)	-8,0* (-14,0; -4,4)	- 7,7* (-9,6; -1,3)
SBC, ммоль/л	28,35 (24,6; 30,55)	17,05* (14,45; 18,65)	18,4* (15,6; 20,7)	25,9 (25,6; 28,6)	17,4* (13,1; 19,4)	18,0* (16,3; 23,7)
ДК, ΔE_{233} /мл	0,42 (0,38; 0,55)	1,2* (1,01; 1,41)	2,27* (1,86; 2,6)	0,52 (0,42; 0,6)	1,42* (1,14; 1,58)	0,64# (0,5; 0,84)
ОШ, ЕД/мл	7,9 (7,46; 8,33)	10,22* (9,27; 10,9)	11,4* (10,8; 12,19)	7,28 (7,21; 8,48)	9,74* (9,17; 10,22)	8,22# (7,38; 8,71)
АлАТ, Ед/л	29,68 (27,06; 34,05)	144,92* (123,1; 178)	324,76* (293,3; 410)	29,68 (24,4; 34,9)	150,2* (120,5; 160)	106,51*# (90,8; 129,2)
АсАТ, Ед/л	31,43 (31,4; 35,79)	166,74* (154,5; 186)	329,99* (307; 401,6)	34,92 (31,4; 36,7)	143,17* (117; 160,6)	94,28*# (80,3; 132,7)

Примечание – ZnPP – цинк протопорфирин IX (ингибитор гемоксигеназы-1), CORM-3 – молекула, высвобождающая монооксид углерода; достоверное различие ($p < 0,05$) по отношению к: * – исходному уровню в своей группе; # – к соответствующему периоду в 1-й группе

Репозиторий ГрГМУ

Научное издание

Ходосовский Михаил Николаевич

**УЧАСТИЕ ГАЗОТРАНСМИТТЕРОВ В КОРРЕКЦИИ
РЕПЕРФУЗИОННЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ ПЕЧЕНИ**

Монография

Ответственный за выпуск С. Б. Вольф

Компьютерная верстка Д. Р. Рапейко
Корректурa М. Н. Ходосовский

Подписано в печать 21.08.2017.
Формат 60х84/16. Бумага офсетная.
Гарнитура Times New Roman. Ризография.
Усл. печ. л. **12,32**. Уч.-изд. л. **9,12**. Тираж **100** экз. Заказ **145**.

Издатель и полиграфическое исполнение
учреждение образования
«Гродненский государственный медицинский университет».
ЛП № 02330/445 от 18.12.2013. Ул. Горького, 80, 230009, Гродно.