

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ИМЕНИ И. М. СЕЧЕНОВА



Том 100, № 5

май

2014



Санкт-Петербург
„НАУКА”

СОДЕРЖАНИЕ

Обзорные и проблемные статьи

- Свердлов Е. Д.** Системная биология и персонализированная медицина: быть или не быть? 505

Оригинальные исследования

Нейронауки

- Горбачевская А. И.** Анализ проведения информации и ее интеграции в проекционных системах, связывающих базальные ганглии с ростромедиальным тегментальным ядром мозга собак 542
- Худавердян Д. Н., Аветисян К. А., Чавушян В. А., Саркисян Дж. С.** Электрофизиологический анализ функционального состояния мотонейронов спинного мозга у крыс с паратиреопривной тетанией 555

Физиология висцеральных систем

- Мамалыга М. Л.** Функциональное состояние сердечно-сосудистой системы при прогрессирующей абсансной эпилепсии и ее лечении 581
- Ходосовский М. Н., Зинчук В. В.** Влияние эритропоэтина на кислородтранспортную функцию крови и прооксидантно-антиоксидантное состояние при ишемии-реперфузии печени 592

Физиология эндокринной системы

- Яковлева Т. В., Макарова Е. Н., Бажан Н. М.** Влияние овариэктомии и эстрорадиала на уровень мРНК GLUT4 в жировой и мышечной тканях самок мышей C57BL/6J — Agouti yellow 602

CONTENTS

Review and Problem Articles

- Sverdlov E. D.** Systems biology and personalized medicine: to be or not to be? 505

Original Studies

Neurosciences

- Gorbachevskaya A. I.** The analysis of the possible pathways of carrying information and its integration in the projection systems, connecting the basal ganglia with the rostromedial tegmental nucleus 542
- Khudaverdyan D. N., Avetisyan K. A., Chavushyan V. A., Sarkissian J. S.** Electrophysiological analysis of functional state of spinal cord motoneurons in rats with parathyropivous tetany 555

Physiology of Visceral Systems

- Mamalyga M. L.** Functional state of cardiovascular system by progressive absences-epilepsy and its treatment 581
- Khodosovsky M. N., Zinchuk V. V.** Erythropoietin influence on the blood oxygen transport and prooxidant-antioxidant state during hepatic ischemia-reperfusion 592

Physiology of Endocrine System

- Iakovleva T. V., Makarova E. N., Bazhan N. M.** Effect of ovariectomy on GLUT4 mRNA levels in adipose and muscle tissues in females of mice C57BL/6J — Agouti yellow 602

**ВЛИЯНИЕ ЭРИТРОПОЭТИНА
НА КИСЛОРОДТРАНСПОРТНУЮ ФУНКЦИЮ КРОВИ
И ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОЕ СОСТОЯНИЕ
ПРИ ИШЕМИИ-РЕПЕРФУЗИИ ПЕЧЕНИ**

© М. Н. Ходосовский, В. В. Зинчук

Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Беларусь
E-mail: hod_73@yahoo.com

Изучали параметры кислородтранспортной функции крови, продукты перекисного окисления липидов, факторы антиоксидантной системы у крыс при ишемии-реперфузии печени в условиях предварительного однократного введения различных доз эритропоэтина. Ишемию печени (30 мин) вызывали маневром Прингла, реперфузионный период длился 120 мин. Установлено, что ишемия-реперфузия печени у крыс приводила к уменьшению сродства гемоглобина к кислороду, активации процессов перекисного окисления липидов, истощению антиоксидантной системы, повышению активности трансаминаз крови (АлАТ, АсАТ). Введение крысам эритропоэтина в дозе 100 МЕ/кг перед ишемией-реперфузией печени усиливало правосторонний сдвиг кривой диссоциации гемоглобина, способствовало коррекции отдельных показателей антиоксидантной системы, но не снижало активности процессов перекисного окисления липидов и активности трансаминаз крови при ишемии-реперфузии печени. Инфузия животным эритропоэтина в дозе 1000 МЕ/кг приводила к сдвигу кривой диссоциации оксигемоглобина влево, улучшению прооксидантно-антиоксидантного и функционального состояния печени в конце реперфузионного периода.

Ключевые слова: кислород, эритропоэтин, оксид азота, печень, ишемия, реперфузия, крысы.

Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. Т. 100. № 5. С. 592—601. 2014

M. N. Khodosovsky, V. V. Zinchuk. ERYTHROPOIETIN INFLUENCE ON THE BLOOD OXYGEN TRANSPORT AND PROOXIDANT-ANTIOXIDANT STATE DURING HEPATIC ISCHEMIA-REPERFUSION. Grodno State Medical University, Grodno, Belarus, e-mail: hod_73@yahoo.com.

The parameters of blood oxygen transport, the products of lipid peroxidation and antioxidative factors were determined in rats during the hepatic ischemia/reperfusion (HIR) under preliminary single injections of different doses of recombinant human erythropoietin (rhEPO). Hepatic ischemia was induced for 30 min by Pringle maneuver, reperfusion lasted 120 min. The experiments had shown that HIR led to the significant decreases in the hemoglobin oxygen affinity, activation of lipid peroxidation, depletion of the antioxidant system, increases blood transaminases (ALT and AST). rhEPO in dose 100 IU/kg aggravates decreasing hemoglobin oxygen affinity, improves some antioxidant parameters, but didn't correct lipid peroxidation or plasma transaminases during

HIR. rhEPO infusion id dose 1000 IU/kg leads to oxyhemoglobin dissociative curve shift leftwards, improves prooxidant-antioxidant balance and plasma ALT, AST activities at the end of reperfusion period.

Key words: oxygen, erythropoietin, nitric oxide, liver ischemia, reperfusion, rats.

RUSSIAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY. V. 100. N 5. P. 592—601. 2014

Среди механизмов повреждений, возникающих при ишемии-реперфузии печени, выделяют расстройства микроциркуляции и транспорта кислорода, ухудшение прооксидантно-антиоксидантного состояния и окислительный стресс, миграцию лейкоцитов и воспалительную реакцию, а также активацию апоптоза [1, 5, 15, 21]. Индуктором большинства этих явлений является ишемия. Однако показано, что короткие периоды ишемии перед основным ее периодом оказывают выраженный протективный эффект, который получил название ишемического preconditionирования (ischemic preconditioning) [9]. Предполагают, что механизм защитного эффекта данного способа связан с повышением продукции оксида азота (NO) эндотелием и улучшением условий микроциркуляции в органе, активацией белков теплового шока, снижением продукции провоспалительных цитокинов и ингибированием апоптоза, увеличением синтеза гипоксией индуцируемым фактором (ГИФ) [9, 22]. 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 [19].

Известно, что гипоксия/ишемия является основным фактором повышения синтеза эритропоэтина в организме. Долгое время данный гликопротеин считали ответственным за механизмы долговременной адаптации к условиям гипоксии. В последние годы показано, что эритропоэтин обладает защитным эффектом при краткосрочном использовании на различных моделях ишемии/гипоксии органов [10, 17, 19]. В последующем было выяснено, что рецепторы к эритропоэтину имеются у нервных клеток, кардиомиоцитов, эпителия легких, эндотелия сосудов и др. Более того, некоторые из тканей способны синтезировать данный гликопротеин [3]. Цитопротективный эффект краткосрочного использования эритропоэтина связывают со способностью этого гликопротеина ингибировать механизмы апоптоза, подавлять экспрессию провоспалительных цитокинов, процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ), улучшать функцию эндотелия и условия микроциркуляции [10, 21]. Вместе с тем известно, что долгосрочные защитные эффекты эритропоэтина реализуются через изменение кислородсвязывающих свойств крови, а состояние параметров кислородтранспортной функции (КТФ) крови может влиять на активность процессов ПОЛ при различной патологии [4–6]. Краткосрочное влияние эритропоэтина на параметры кислородтранспортной функции крови при ишемии-реперфузии органов остается не изученным.

Цель данного исследования — изучить влияние однократного использования различных доз эритропоэтина на параметры КТФ крови, прооксидантно-антиоксидантный баланс и NO-синтазную функцию при моделировании синдрома ишемии-реперфузии печени у крыс.

МЕТОДИКА

Работа выполнена на 34 взрослых белых крысах-самцах массой 280—360 г, предварительно содержавшихся в стандартных условиях вивария. Под комбинированным наркозом (тиопентал натрия — 30 мг/кг, внутривенно, калипсол — 100 мг/кг, внутримышечно) ишемию печени вызывали наложением сосудистого зажима на *a. hepatica propria* и *v. portae* (маневр Прингла) в течение 30 мин, реперфузионный период длился 120 мин. В конце эксперимента осуществляли забор смешанной венозной крови и тканей печени для оценки параметров КТФ, L-аргинин-NO системы, 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 ($n = 9$) — контрольная; во 2-й ($n = 8$) — моделировали ишемию-реперфузию печени; в 3-й ($n = 8$) и в 4-й ($n = 9$) группах за 30 мин перед ишемией-реперфузией печени вводили рекомбинантный человеческий эритропоэтин альфа (ЭПО, INTAS) в дозе 100 и 1000 МЕ/кг соответственно. Функциональное состояние печени оценивали по активности аланин- и аспартатаминотрансфераз (АлАТ и АсАТ) кинетическим методом с помощью стандартного набора реактивов фирмы «Cormay» (Польша). Определение суммарного количества нитратов и нитритов (NO_x) в плазме крови проводили спектрофотометрическим методом с помощью реактива Грисса. 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, бикарбонат плазмы (HCO_3^-), общий CO_2 плазмы (TCO_2), действительный избыток оснований (ABE) и др. Сродство гемоглобина к кислороду (СГК) определяли по показателю $p50$ (pO_2 крови, соответствующее 50%-ному 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 $p50_{\text{реал}}$ рассчитывали для реальных значений этих факторов. На основании полученных значений $p50$ по уравнению Хилла определяли положение кривой диссоциации оксигемоглобина (КДО).

Оценивали следующие параметры прооксидантно-антиоксидантного баланса: диеновые конъюгаты, основания Шиффа, α -токоферол, ретинол и активность каталазы. Содержание диеновых конъюгатов в биологическом материале определяли методом ультрафиолетовой спектрофотометрии при длине волны 233 нм, типичной для конъюгированных диеновых структур гидроперекисей липидов [2]. Уровень оснований Шиффа определяли по интенсивности флюоресценции хлороформного экстракта при длинах волн возбуждения и эмиссии 344 и 440 нм соответственно [12]. Концентрацию α -токоферола и ретинола оценивали по интенсивности флюоресценции гексанового экстракта [8]. В качестве стандартов использовали α -токоферол и ретинол фирмы «Sigma». Каталазная активность в биологическом материале оценивалась спектрофотометрическим методом, основанном на способности перекиси водорода (H_2O_2) образовывать с солями молибдена стойко окрашенный комплекс [7].

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием t -критерия Стьюдента или U-теста в зависимости от нормальности распределения выборок. Достоверными считали различия при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изменения параметров КТФ крови и функционального состояния печени (АлАТ, АсАТ) у экспериментальных животных представлены в табл. 1. 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. 1). 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. Также установлено, что у крыс 2-й группы ишемия-реперфузия печени приводила к росту диеновых конъюгатов и оснований Шиффа 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. 2). 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. 2). 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. 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. 2).

Использование эритропоэтина в дозе 100 МЕ/кг у животных 3-й группы не приводило к существенному улучшению прооксидантно-антиоксидантно-

Таблица 1

Влияние различных 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
<i>n</i>	9	8	8	9
$p50_{\text{реал}}$, мм рт. ст.	32.37 ± 0.53	$41.62 \pm 0.58^*$	$45.58 \pm 0.85^{*\#}$	$35.07 \pm 1.9^{\#S}$
$p50_{\text{станд}}$, мм рт. ст.	30.91 ± 0.91	$34.04 \pm 0.89^*$	$38.86 \pm 0.46^{*\#}$	33.53 ± 1.59^S
Hb, г/л	107.22 ± 5.63	119.75 ± 8.94	118.25 ± 14.47	$140.89 \pm 6.0^*$
MetHb, %	0.63 ± 0.18	0.41 ± 0.13	0.28 ± 0.09	0.72 ± 0.21
pO_2 , мм рт. ст.	27.78 ± 2.71	$35.25 \pm 1.98^*$	$37.38 \pm 2.12^*$	30.78 ± 3.61
pH, ед.	7.353 ± 0.024	$7.227 \pm 0.029^*$	$7.246 \pm 0.018^*$	$7.348 \pm 0.019^{\#S}$
pCO_2 , мм рт. ст.	48.31 ± 4.59	56.68 ± 3.24	$73.63 \pm 2.54^*$	57.94 ± 4.7^S
HCO_3^- , ммоль/л	26.64 ± 1.53	24.01 ± 1.71	$32.31 \pm 0.75^{*\#}$	$31.66 \pm 1.68^{*\#}$
TCO_2 , ммоль/л	28.14 ± 1.65	25.75 ± 1.77	$34.58 \pm 0.76^{*\#}$	$33.46 \pm 1.82^{*\#}$
ABE, ммоль/л	1.21 ± 1.13	$-3.63 \pm 1.77^*$	$3.83 \pm 0.92^{\#}$	$5.01 \pm 1.1^{*\#}$
SBE, ммоль/л	0.89 ± 1.41	$-3.81 \pm 2.03^*$	$4.81 \pm 0.93^{*\#}$	$5.83 \pm 1.47^{*\#}$
SBC, ммоль/л	24.61 ± 0.81	$20.73 \pm 1.39^*$	$26.53 \pm 0.82^{\#}$	$28.4 \pm 1.38^{*\#}$

Примечание (здесь и в табл. 2). * Достоверное отличие по отношению к 1-й группе ($p < 0.05$), # достоверное отличие по отношению ко 2-й группе ($p < 0.05$), S достоверное отличие по отношению к 3-й группе ($p < 0.05$).

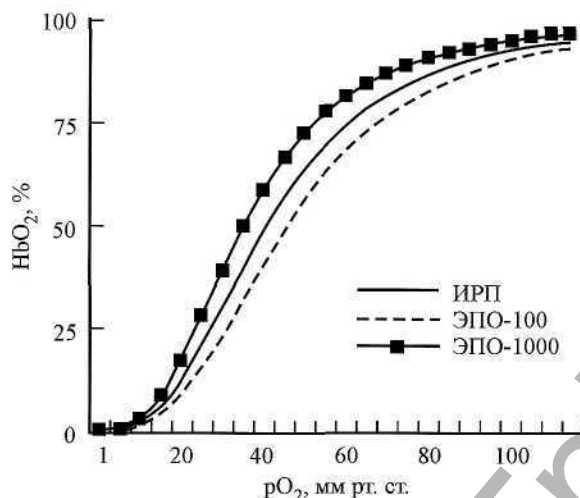


Рис. 1. Влияние эритропоэтина на положение кривой диссоциации оксигемоглобина ($p50_{\text{реал}}$) смешанной венозной крови на 120-й минуте реперфузии у крыс:

Ишемия-реперфузия печени (ИРП) — 2-я группа животных, эритропоэтин-100 (ЭПО-100) — 3-я группа животных, ЭПО-1000 — 4-я группа животных.

го и функционального состояния печени (табл. 1 и 2). Так, рост диеновых конъюгатов и оснований Шиффа в плазме крови в 3-й группе составил 3.5 ($p < 0.001$) и 6.9 ($p < 0.001$) раза 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. 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. 1). 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 ишемии-реперфузии печени 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. 2).

Инфузия эритропоэтина (1000 МЕ/кг) крысам 4-й группы сопровождалась улучшением параметров КТФ крови в конце реперфузии (табл. 1). 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 диеновых конъюгатов и оснований Шиффа в плазме крови в кон-

Таблица 2

Влияние различных 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
<i>n</i>	9	8	8	9
Диеновые конъюгаты (пл), $\Delta E_{233}/\text{мл}$	0.94 ± 0.12	$3.96 \pm 0.4^*$	$3.34 \pm 0.19^*$	$1.87 \pm 0.14^{* \# \$}$
Диеновые конъюгаты (эр), $\Delta E_{233}/\text{мл}$	5.48 ± 0.39	$10.47 \pm 0.78^*$	$8.75 \pm 0.61^*$	$6.09 \pm 0.31^{\# \$}$
Диеновые конъюгаты (печ), $\Delta E_{233}/\text{г}$	9.33 ± 0.67	$47.3 \pm 3.71^*$	$45.05 \pm 1.1^*$	$18.27 \pm 2.31^{* \# \$}$
Основания Шиффа (пл), ЕД/мл	21.74 ± 1.93	$188.24 \pm 11.53^*$	$150.59 \pm 17.85^*$	$81.38 \pm 6.36^{* \# \$}$
Основания Шиффа (эр), ЕД/мл	39.44 ± 1.64	$81.8 \pm 4.97^*$	$80.09 \pm 6.25^*$	$43.14 \pm 4.34^{\# \$}$
Основания Шиффа (печ), ЕД/г	129.4 ± 11.2	$500.8 \pm 58.7^*$	$432.6 \pm 26.7^*$	$158.8 \pm 18.8^{\# \$}$
α -Токоферол (пл), мкмоль/л	20.5 ± 0.39	$17.55 \pm 0.54^*$	$18.4 \pm 0.28^*$	$19.72 \pm 0.31^{\# \$}$
α -Токоферол (эр), мкмоль/л	116.89 ± 1.14	$101.06 \pm 4.67^*$	$106.52 \pm 2.5^*$	$114.69 \pm 1.2^{\# \$}$
α -Токоферол (печ), мкмоль/г	189.76 ± 6.33	$145.34 \pm 5.65^*$	$158.91 \pm 6.52^*$	$186.44 \pm 4.04^{\# \$}$
Ретинол (пл), мкмоль/л	2.51 ± 0.1	$1.75 \pm 0.03^*$	$1.9 \pm 0.02^{* \#}$	$2.32 \pm 0.06^{\# \$}$
Ретинол (эр), мкмоль/л	8.92 ± 0.29	$7.36 \pm 0.27^*$	$7.73 \pm 0.23^*$	$8.54 \pm 0.28^{\# \$}$
Ретинол (печ), мкмоль/г	21.85 ± 0.65	$16.41 \pm 0.48^*$	$18.47 \pm 0.41^{* \#}$	$20.72 \pm 0.39^{\# \$}$
Каталаза (эр), ммоль/л · гHb · с	0.94 ± 0.07	$0.4 \pm 0.11^*$	$0.92 \pm 0.12^{\#}$	$1.35 \pm 0.11^{* \# \$}$
Каталаза (печ), ммоль/л · гбелка · с	3.14 ± 0.33	$1.1 \pm 0.3^*$	$2.49 \pm 0.34^{\#}$	$5.74 \pm 0.43^{* \# \$}$

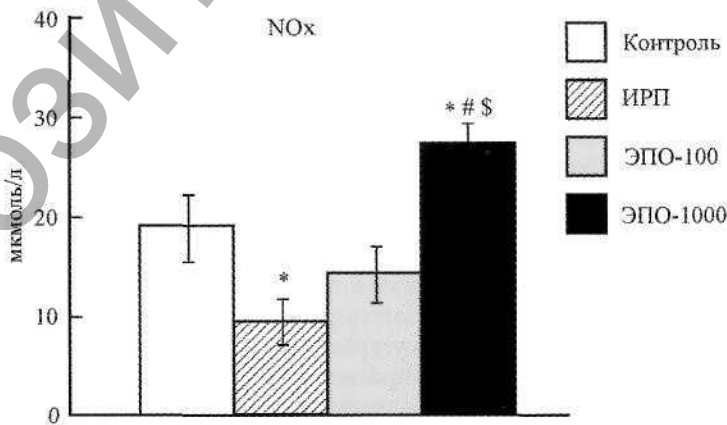


Рис. 2. Влияние эритропоэтина на содержание нитратов/нитритов (NOx) в крови экспериментальных животных.

Контроль — 1-я группа животных, ИРП — 2-я группа животных, ЭПО-100 — 3-я группа животных, ЭПО-1000 — 4-я группа животных; *, #, \$ см. табл. 1.

це 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. 2). В печени в конце постишемического периода содержание диеновых конъюгатов было выше по отношению к контролю в 2.0 ($p < 0.01$) раза, однако ниже, чем у крыс 2-й и 3-й групп. Важно отметить, что у животных 4-й группы в конце ишемии-реперфузии печени не изменялось содержание основания Шиффа 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. 2). В 4-й опытной группе активность АЛАТ и АсАТ крови была меньше, чем во 2-й и 3-й группах (табл. 2). Следует отметить, что у животных 4-й экспериментальной группы наблюдалось повышение суммарного содержания NOx в крови по отношению к крысам 1, 2 и 3-й опытных групп (рис. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Установлено, что моделирование ишемии-реперфузии печени 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 [16]. Одновременно реперфузия печени сопровождалась значительным снижением СГК крови (судя по росту показателей $p50_{\text{реал}}$ и $p50_{\text{станд.}}$), а также повышением ее 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 (НАДН, НАДФН) и частичным блокированием ими дыхательной цепи митохондрий [1]. 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 диеновых конъюгатов и оснований Шиффа), 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 (так называемой «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-арги-

нин—NO системы. Известно, что при отсутствии достаточного количества субстратов и кофакторов эндотелиальная NO-синтаза может переключаться на синтез активных форм кислорода (АФК) вместо NO, потенцируя окислительный стресс [20].

Введение эритропоэтина опытным животным способствовало дозозависимому улучшению отдельных параметров прооксидантно-антиоксидантного состояния и L-аргинин-NO системы, однако разнонаправленным сдвигам КДО в реперфузионном периоде. Так, использование эритропоэтина 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 [13]. 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 ПОД 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 [1, 5].

Использование эритропоэтина в дозе 1000 МЕ/кг перед ишемией-реперфузией печени 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 [14]. Лимитирование отдачи кислорода в ткани после ишемии, возможно, явилось важным стабилизирующим фактором для работы митохондрий. Показано, что создание умеренной гипоксии при ишемии-реперфузии печени у кроликов уменьшало активность свободно-радикальных процессов [5]. Важно отметить, что в 4-й группе в конце реперфузии повышалось содержание NOx. Механизм левостороннего сдвига КДО в 4-й группе животных мог быть опосредован NO. Под влиянием оксида азота могут образовываться различные формы гемоглобина, разнонаправленно изменяющие СГК. Так, высокие концентрации метгемоглобина и S-нитрозо-гемоглобина (SNO-Hb) смещают КДО влево, тогда как повышенные концентрации нитрозилгемоглобина (HbFe²⁺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 эритропоэтина кроликам за 30 мин до

инъекции липополисахарида способствовало улучшению параметров КТФ крови, повышению СГК через NO-зависимый механизм, снижению окислительного стресса [6]. Согласно исследованию структуры SNO-Hb, NO, соединяясь с β 93-цистеином, ингибирует образование солевых мостиков между β 146-гистидином и β 94-аспарагином, что неминуемо приводит к повышению СГК [11]. Нельзя исключить прямых модулирующих эффектов эритропоэтина на кислородсвязывающие свойства крови.

Известно, что активация продукции эритропоэтина в организме опосредуется ГИФ, ответственным за активацию транскрипции эритропоэтиновой информационной РНК, синтез фактора роста эндотелия сосудов, индуктора ангиогенеза, увеличивающего потребление кислорода тканями [3]. Возможно, окислительный стресс при ишемии-реперфузии печени препятствует реализации физиологических защитных эффектов ГИФ, тогда как введение эритропоэтина перед ишемией-реперфузией печени РП напрямую активирует рецепторы чувствительных к нему клеток, что приводит к коррекции реперфузионных повреждений органа. Важно отметить, что повышение продукции оксида азота при ишемии-реперфузии печени 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 [18]. В этой связи выявленная высокая активность каталазы у крыс 4-й группы способствовала защитному влиянию эритропоэтина на печень при ишемии-реперфузии печени, 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 O₂ 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 рО₂ [5, 6].

Таким образом, ишемия-реперфузия печени 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 эритропоэтина опытным животным способствовало дозозависимому улучшению параметров прооксидантно-антиоксидантного состояния и L-аргинин—NO системы. Выявленные эффекты введения эритропоэтина перед ишемией-реперфузией печени 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 ишемии-реперфузии печени у крыс может быть важным механизмом защитного влияния эритропоэтина, который снижает эффекты окислительного стресса при данной патологии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] Биленко М. В. Ишемические и реперфузионные повреждения органов (молекулярные механизмы, пути предупреждения и лечения). М. Медицина. 1989.
- [2] Гаврилов В. Б., Гаврилова А. Р., Хмара А. Ф. Измерение диеновых конъюгатов в плазме крови по УФ-поглощению гептановых и изопропанольных экстрактов. Лаб. дело. (2) : 60—64. 1988.

- [3] Захаров Ю. М. Неэритропоэтические функции эритропоэтина. Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 93 (6) : 592—608. 2007.
- [4] Зинчук В. В., Глуткин С. В., Шульга Е. В. Эритропоэтин и кислородтранспортная функция крови. Эксперим. и клинич. фармакология. 75 (1) : 39—42. 2012.
- [5] Зинчук В. В., Ходосовский М. Н. Участие кислород-зависимых процессов в патогенезе реперфузионных повреждений печени. Успехи физиол. наук. 37 (4) : 45—56. 2006.
- [6] Зинчук В. В., Шульга Е. В., Гуляй И. Э. Влияние эритропоэтина на кислородтранспортную функцию крови и прооксидантно-антиоксидантное состояние у кроликов при введении липополисахарида. Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 96 (1) : 43—49. 2010.
- [7] Королюк М. А., Иванова Л. И., Майорова И. Г., Токарев В. Е. Измерение активности каталазы в биологических средах. Лаб. дело. (1) : 16—19. 1988.
- [8] Черняускене Р. Ч., Варишквичене З. З., Грибаускас П. С. Одновременное флуориметрическое определение концентрации витаминов А и Е в сыворотке крови. Лаб. дело. (6) : 362—365. 1984.
- [9] Alchera E., Dal Ponte C., Imarisio C., Albano E., Carini R. Molecular mechanisms of liver preconditioning. World J. Gastroenterol. 16 (48) : 6058—6067. 2010.
- [10] Bahcekapili N., Uzüm G., Gökkusu C., Kuru A., Ziyilan Y. Z. The relationship between erythropoietin pretreatment with blood-brain barrier and lipid peroxidation after ischemia/reperfusion in rats. Life Sci. 80 (14) : 1245—1251. 2007.
- [11] Clementi M. E., Orsini F., Schininà M. E., Noia G., Giardina B. Effect of nitric oxide on the transport and release of oxygen in fetal blood. Biochem. Biophys. Res. Commun. 302 (3) : 515—519. 2003.
- [12] Fletcher B. L., Dillard C. J., Tappel A. L. Measurement of fluorescent lipid peroxidation products in biological systems and tissues. Anal. Biochem. 52 (1) : 1—9. 1973.
- [13] Grocott H. P., Bart R. D., Sheng H., Miura Y., Steffen R., Pearlstein R. D., Warner D. S. Effects of a synthetic allosteric modifier of hemoglobin oxygen affinity on outcome from global cerebral ischemia in the rat. Stroke. 29 (8) : 1650—1655. 1998.
- [14] Hsia C. C. Respiratory function of hemoglobin. N. Engl. J. Med. 338 (4) : 239—247. 1998.
- [15] Jaeschke H., Woolbright B. L. Current strategies to minimize hepatic ischemia-reperfusion injury by targeting reactive oxygen species. Transplant. Rev. (Orlando). 26 (2) : 103—114. 2012.
- [16] Kanoria S., Glantzounis G., Jalan R., Davies N. A., Seifalian A. M., Williams R., Davidson B. R. A model to study total hepatic ischemia-reperfusion injury. Transplant. Proc. 36 (9) : 2586—2589. 2004.
- [17] Moeini M., Nematbakhsh M., Fazilati M., Talebi A., Pilehvarian A. A., Azarkish F., Eshraghi-Jazi F., Pezeshki Z. Protective role of recombinant human erythropoietin in kidney and lung injury following renal bilateral ischemia-reperfusion in rat model. Int. J. Prev. Med. 4 (6) : 648—655. 2013.
- [18] Muriel P. Role of free radicals in liver diseases. Hepatol. Int. 3 (4) : 526—536. 2009.
- [19] Nandra K. K., Collino M., Rogazzo M., Fantozzi R., Patel N. S., Thiemermann C. Pharmacological preconditioning with erythropoietin attenuates the organ injury and dysfunction induced in a rat model of hemorrhagic shock. Dis. Model. Mech. 6 (3) : 701—709. 2013.
- [20] Pacher P., Beckman J. S., Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. Physiol. Rev. 87 : 315—424. 2007.
- [21] Shawky H. M., Younan S. M., Rashed L. A., Shoukry H. Effect of recombinant erythropoietin on ischemia-reperfusion-induced apoptosis in rat liver. J. Physiol. Biochem. 68 (1) : 19—28. 2012.
- [22] Song X., Zhang N., Xu H., Cao L., Zhang H. Combined preconditioning and postconditioning provides synergistic protection against liver ischemic reperfusion injury. Int. J. Biol. Sci. 8 (5) : 707—718. 2012.

Поступила 27 III 2014