

© Коллектив авторов, 2022
УДК 616.36:001.891
DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2022.17015>
ISSN – 2073-8137

ПРООКСИДАНТНОЕ ПРЕКОНДИЦИОНИРОВАНИЕ ИШЕМИЧЕСКИ-РЕПЕРФУЗИОННОГО ПОРАЖЕНИЯ ПЕЧЕНИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

К. А. Попов, И. М. Быков, И. Ю. Цымбалюк, Э. А. Азимов,
М. И. Быков, Я. Е. Денисова, А. Н. Столярова, Е. Е. Есауленко

Кубанский государственный медицинский университет, Краснодар,
Российская Федерация

PROOXIDANT PRECONDITIONING OF ISCHEMIC-REPERFUSION LIVER DAMAGE IN EXPERIMENT

Popov K. A., Bykov I. M., Tsybalyuk I. Yu., Azimov E. A.,
Bykov M. I., Denisova Ya. E., Stolyarova A. N., Esaulenko E. E.

Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

В развитии защитных эффектов ишемического preconditioning играют роль различные сигнальные пути, опосредованные в том числе активными формами кислорода. Целью исследования была оценка влияния предварительного введения трет-бутил гидропероксида на развитие повреждения печени крыс при моделировании ишемии-реперфузии. Исследование проведено на 55 белых нелинейных крысах-самцах, разделенных на 3 группы: контрольная группа (1-я группа), не подвергавшаяся каким-либо воздействиям; 2-я и 3-я группы, крысам которых проводили моделирование васкулярной эксклюзии печени в течение 20 минут с последующей 3-часовой реперфузией. Животным опытных групп за сутки до эксперимента интраперитонеально вводили 1 мл физиологического раствора (2-я группа) или 1 мл 0,5 % раствора трет-бутил гидропероксида (3-я группа). Было установлено, что на фоне предварительного введения трет-бутил гидропероксида активность АЛТ, АСТ, ЛДГ и глутатион-S-трансферазы была ниже в 1,5–4,5 раза относительно значений аналогичных показателей животных 2-й группы. Таким образом, была подтверждена гипотеза о возможности preconditioning ишемически-реперфузионного повреждения печени с помощью прооксидантных факторов.

Ключевые слова: ишемия, реперфузия, ишемически-реперфузионный синдром, прооксидантные факторы, окислительный стресс, preconditioning

In the development of the protective effects of ischemic preconditioning, various signaling pathways, including those mediated by reactive oxygen species, play an outstanding role. The purpose of the study was to evaluate the effect of preliminary administration of tert-butyl hydroperoxide on the development of liver damage in rats during ischemia-reperfusion modeling. The study was carried out on 55 white non-linear male rats, divided into 3 groups: the control group (1st group), not exposed to any influences; Groups 2 and 3, where rats underwent modeling of vascular exclusion of the liver for 20 minutes followed by 3 hours of reperfusion. The animals of the experimental groups were injected intraperitoneally with 1 ml of saline (Group 2) or 1 ml of 0.5 % solution of tert-butyl hydroperoxide (group 3) intraperitoneally. As a result of the studies, it was revealed that against the background of preliminary administration of tert-butyl hydroperoxide, the activity of ALT, AST, LDH and glutathione-S-transferase was 1.5–4.5 times lower than the values of similar indicators in animals of the 2nd group. Thus, the scientific hypothesis about the possibility of preconditioning of ischemia-reperfusion liver damage using prooxidant factors was confirmed.

Keywords: ischemia, reperfusion, ischemia-reperfusion syndrome, prooxidant factors, oxidative stress, preconditioning

Для цитирования: Попов К. А., Быков И. М., Цымбалюк И. Ю., Азимов Э. А., Быков М. И., Денисова Я. Е., Столярова А. Н., Есауленко Е. Е. ПРООКСИДАНТНОЕ ПРЕКОНДИЦИОНИРОВАНИЕ ИШЕМИЧЕСКИ-РЕПЕРФУЗИОННОГО ПОРАЖЕНИЯ ПЕЧЕНИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ. *Медицинский вестник Северного Кавказа*. 2022;17(1):56-59. DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2022.17015>

For citation: Popov K. A., Bykov I. M., Tsybalyuk I. Yu., Azimov E. A., Bykov M. I., Denisova Ya. E., Stolyarova A. N., Esaulenko E. E. PROOXIDANT PRECONDITIONING OF ISCHEMIC-REPERFUSION LIVER DAMAGE IN EXPERIMENT. *Medical News of North Caucasus*. 2022;17(1):56-59. DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2022.17015> (In Russ.)

АЛТ – аланинаминотрансфераза
АСТ – аспартатаминотрансфераза
АФК – активные формы кислорода

ЛДГ – лактатдегидрогеназа
ИП – ишемическое preconditioning
GST – глутатион-S-трансфераза

Ишемические и реперфузионные поражения печени наблюдаются при трансплантации и резекциях органа, при временном выключении печени из системного кровотока во время хирургических операций, при шоке различного этиопатогенеза [1, 2]. Среди механизмов повреждений, имеющих место при ишемии-реперфузии печени, выделяют микроциркуляторные нарушения, оксидативный стресс, эндогенную интоксикацию, нарушения баланса цитокинов с развитием воспаления. Для профилактики таких повреждений нередко применяется ишемическое preconditionирование (ИП) – феномен адаптации ткани к длительной васкулярной эксклюзии после превентивного выполнения одного или нескольких более коротких эпизодов ишемии-реперфузии [3]. Введение веществ, способных через различные механизмы имитировать эффекты ИП, послужило появлению новой противоишемической стратегии – фармакологического preconditionирования [4]. Анализ работ позволил выделить ряд сигнальных путей ишемической адаптации печени, включающий участие оксида азота, активных форм кислорода (АФК), белков теплового шока, аденозина, тирозинкиназы, протеинкиназы C и др. Имеются данные, свидетельствующие о том, что АФК являются триггерами ИП, поскольку на фоне preconditionирования усиливается продукция свободных радикалов и реактивных молекул [5]. На роль подобных внутриклеточных мессенджеров претендуют супероксид, пероксид водорода и гидроксильный радикал. Источником АФК может быть митохондриальная дыхательная цепь и НАДФН-оксидаза [6, 7]. Защитный эффект ИП может являться следствием уменьшения продукции АФК или увеличения синтеза эндогенных антиоксидантов при воздействии более сильного повреждающего фактора. Традиционно с целью фармакологического preconditionирования используют средства антиоксидантной направленности действия [8].

Целью исследования была оценка влияния превентивного введения экзогенных прооксидантных факторов на развитие повреждения печени крыс при моделировании ишемически-реперфузионного синдрома путем васкулярной эксклюзии органа.

Материал и методы. Работа выполнена с использованием 55 половозрелых белых нелинейных крыс-самцов (особи по 200–250 г). Животные были разделены на 3 группы: 15 intactных особей составили контрольную группу (1-я группа), не подвергавшуюся каким-либо воздействиям; по 20 особей составили 2-ю и 3-ю группы, в которых проводили моделирование тотальной васкулярной эксклюзии печени путем пережатия сосудистым зажимом аналога гепатодуоденальной связки на 20 минут. Животным опытных групп за сутки до моделирования васкулярной эксклюзии вводили 1 мл физиологического раствора (2-я группа, группа сравнения) или 1 мл 0,5 % раствора трет-бутил гидропероксида (3-я группа). Трет-бутил гидропероксид ((CH₃)₃C-OOH) – широко известный окислитель из группы органических перекисей, используемый в органическом синтезе и исследованиях биологических объектов в условиях *in vitro* в качестве модулятора окислительного стресса [9–11]. В настоящем исследовании используется впервые в условиях *in vivo* в качестве потенциально протективного агента, хотя для использования в реальной практике необходим поиск

менее токсичных средств. Тем не менее для экспериментальных целей использование данного вещества представляется целесообразным. По окончании трехчасового реперфузионного периода животных выводили из эксперимента с забором гепаринизированной крови из каудальной полой вены. В плазме крови лабораторных животных определяли активность маркеров цитолиза гепатоцитов – АСТ, АЛТ, ЛДГ и глутатион-S-трансферазы (GST). Активность первых трех ферментов определяли на автоматическом биохимическом анализаторе с использованием наборов реагентов Randox (Великобритания). Активность GST определяли ручным методом с использованием субстрата 1-хлор-2,4-динитробензола; за изменением оптической плотности раствора следили при 340 нм на спектрофотометре UNICO 2800 (США) [12].

Все болезненные манипуляции выполняли после общего обезболивания с использованием препарата Золетил 100 (Вирбак, Франция). Экспериментальное исследование проведено с соблюдением международных принципов Европейской конвенции о «Защите позвоночных животных, используемых для экспериментов и других научных целей». Проведение работ было предварительно одобрено независимым этическим комитетом.

Статистическую обработку результатов исследования выполняли с Stat plus (Analyst Soft Inc.) – программы для ОС Windows. Сравнение результатов трёх разных групп лабораторных животных осуществляли с помощью критерия Краскела – Уоллиса, при наличии статистически значимых отличий ($p < 0,05$) выполняли попарное сравнение двух групп с использованием критерия Манна – Уитни.

Результаты и обсуждение. Изучение влияния прооксидантного preconditionирования на маркеры цитолитического синдрома в условиях моделирования ишемически-реперфузионного повреждения печени показало возможность снижения лабораторных проявлений гепатоцитолиза в условиях предварительного введения 0,5 % раствора трет-бутил гидропероксида. Эффективность такой коррекции подтверждена статистически значимо сниженными значениями всех четырех изученных ферментов в плазме крови относительно группы сравнения. Развитие ишемически-реперфузионного повреждения печени после васкулярной эксклюзии в группе сравнения сопровождалось увеличением активности АЛТ в 14,3 раза, АСТ в 10,2 раза, ЛДГ в 8,9 раза (табл.). Как было показано ранее, активность аминотрансфераз достигает максимальных значений через 3 часа после восстановления кровотока, следующий после ишемического периода. Несколько быстрее после начала реперфузионного периода увеличивается активность ЛДГ – максимальные значения достигаются уже через 1 час, но на протяжении первых 3 часов остаются практически неизменными. Поэтому данный период для лабораторного исследования является оптимальным.

Активность GST скорее является маркером ишемических повреждений, поскольку максимальные значения в плазме крови определяются в первые 5–30 минут после восстановления кровотока, однако повышенный уровень фермента регистрируется на протяжении еще 3–8 часов [12, 13]. В настоящем исследовании после 20-минутной васкулярной эксклюзии печени и 3-часового периода реперфузии активность GST была увеличена в 2,5 раза относительно соответствующего параметра контрольной группы. Проведение прооксидантного preconditionи-

онирования сопровождалось превышением активности рассматриваемых лабораторных показателей относительно контроля в значительно меньшей степени по сравнению со значениями активности аналогичных ферментов животных 2-й группы. Так, активность АЛТ в крови крыс 3-й группы была увеличена относительно группы интактных животных в 3,7 раза, активность АСТ в 4,9 раза, ЛДГ в 2,0 раза, а активность GST – всего на 70 %. При этом значения всех четырёх маркеров цитолиза гепатоцитов в плазме крови крыс 3-й группы были статистически значимо ниже значений соответствующих параметров группы сравнения. Наиболее заметно это было на примере АЛТ и ЛДГ, значения активности которых были в 3,9–4,5 раза ниже аналогичных показателей 2-й группы (табл.).

Таблица

Маркеры цитолиза гепатоцитов у крыс на фоне преко кондиционирования ишемически-реперфузионного поражения печени с использованием трет-бутил гидропероксида (Me(Q1/Q3))

Показатель	Исследуемые группы		
	1 (контрольная)	2 (сравнения)	3 (опытная)
АЛТ, ед/л	27,4 (24,9/29,0)	391,6* (365,4/409,2)	100,4*^ (94,5/113,5)
АСТ, ед/л	32,6 (29,7/34,1)	332,6* (318,5/342,0)	159,5*^ (152,7/172,0)
ЛДГ, ед/л	160,0 (154,5/164,6)	1430,0* (1276,5/1522,4)	319,8*^ (300,3/346,8)
GST, мкмоль/ л*мин	0,023 (0,021/0,027)	0,059* (0,054/0,062)	0,040*^ (0,035/0,042)

Примечание: * – статистически значимые отличия от показателя контрольной группы ($p < 0,05$); ^ – статистически значимые отличия ($p < 0,05$) между показателями группы сравнения и основной опытной группы.

Используемый в работе трет-бутил гидропероксид – хорошо известный и широко применяемый окислитель в работах с биологическими объектами, в частности при моделировании окислительного стресса в клеточных суспензиях или других модельных тест-системах *in vitro* [9–11]. Введение крысам 1 мл 0,5 % раствора – дозировки в 4–5 раз меньшей по сравнению с LD₅₀ (87 мг/кг при внутривенном введении) – очевидно, способно вызвать достаточно серьезные, но не летальные окислительные повреждения. В таких условиях можно ожидать временного

адаптационного усиления системы антиоксидантной защиты, которая обеспечивает сравнительно лучшую переносимость последующего ишемически-реперфузионного поражения печени. Такое объяснение полученных результатов представляется наиболее рациональным.

Ранее были получены данные, свидетельствующие о протективном эффекте дихлорацетата натрия в дозировке 300 мг/кг животного в аналогичных экспериментальных условиях [14]. Одним из вероятных объяснений данного эффекта является активация пируватдегидрогеназного комплекса, снижение уровня лактацидоза и его повреждающего действия в условиях гипоксии. Между тем это предположение не лишено недостатков – при отсутствии кислорода подавляется активность цепи переноса электронов, что делает окислительное декарбоксилирование пируватдегидрогеназного комплекса бессмысленным. Однако в данных условиях должна наблюдаться гипертрофия компонентов дыхательной цепи с увеличением утечки электронов и образования активных форм кислорода. Это явление описано при использовании дихлорацетата натрия в качестве терапевтического агента при злокачественных новообразованиях для инверсии преимущественно анаэробного энергообмена на аэробные метаболические пути, что сопровождается интенсификацией свободнорадикальных процессов и гибелью опухолевых клеток. Таким образом, мы полагаем, что и описанные ранее эффекты дихлорацетата натрия связаны с его относительно мягким прооксидантным действием в условиях развития ишемически-реперфузионного синдрома.

Заключение. Подтверждена гипотеза о возможности преко кондиционирования ишемически-реперфузионного повреждения печени с помощью предварительного введения окислителя (трет-бутил гидропероксид) в низкой концентрации. Полученные данные подтверждают сигнальную роль свободных радикалов и реактивных окислителей в развитии протективных эффектов ишемического преко кондиционирования и позволяют прогнозировать разработку новых подходов к терапии широкого спектра патологических состояний с использованием прооксидантных факторов.

Исследование выполнено в рамках государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации № 121022600268-0.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература/References

1. Bogdanov S. B., Gilevich I. V., Porhanov V. A., Melkonyan K. I., Sotnichenko A. S., Alekseenko S. N. Total full-thickness skin grafting for treating patients with extensive facial burn injury: a 10-year experience. *Burns*. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2020.12.003>
2. Ye L., He S., Mao X., Zhang Y., Cai Y., Li S. Effect of hepatic macrophage polarization and apoptosis on liver ischemia and reperfusion injury during liver transplantation. *Front. Immunol.* 2020;11:1193. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01193>
3. Ходосовский М. Н., Зинчук В. В. Влияние эритропоэтина на кислородтранспортную функцию крови и прооксидантно-антиоксидантное состояние при ишемии-реперфузии печени. *Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова*. 2014;100(5):592-601. [Khosodosovsky M. N., Zinchuk V. V. Erythropoietin influence on the blood oxygen transport and prooxidant-antioxidant state during hepatic ischemia-reperfusion. *Rossiyskiy fiziologicheskii zhurnal im. I. M. Sechenova*. 2014;100(5):592-601. (In Russ.)].
4. Shiraishi S., Cho S., Akiyama D., Ichinomiya T., Shibata I. [et al.]. Sevoflurane has preconditioning as well as preconditioning properties against hepatic warm ischemia-reperfusion injury in rats. *J. Anesth.* 2019;33(3):390-398. <https://doi.org/10.1007/s00540-019-02642-4>
5. Маслов Л. Н., Нарыжная Н. В., Подоксенов Ю. К., Прокудина Е. С., Горбунов А. С. [и др.]. Активные формы кислорода – триггеры и медиаторы повышения устойчивости сердца к действию ишемии-реперфузии. *Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова*. 2015;101(1):3-24. [Maslov L. N., Naryzhnaja N. V., Podoksenov Ju. K., Prokudina E. S., Gorbunov A. S. [et al.]. Reactive oxygen species – triggers and mediators of increasing the resistance of the heart to ischemia-reperfusion. *Rossiyskiy fiziologicheskii zhurnal im. I. M. Sechenova*. 2015;101(1): 3-24. (In Russ.)].

6. Козин С. В., Кравцов А. А., Злищева Э. И., Шурыгина Л. В., Малышко В. В. [и др.]. Влияние обедненного дейтерием питьевого рациона на функциональное состояние центральной нервной системы животных в условиях гипоксии. *Биофизика*. 2020;65(6):1196-1202. [Kozin S. V., Kravtsov A. A., Zlischeva E. I., Shurygina L. V., Malysheko V. V. [et al.]. Influence of deuterium-depleted drinking diet on the functional state of the central nervous system of animals in hypoxia. *Biofizika*. 2020;65(6):1196-1202. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.31857/S0006302920060198>
7. Basov A. A., Elkina A. A., Samkov A. A., Volchenko N. N., Baryshev M. G. [et al.]. Influence of deuterium-depleted water on the isotope d/h composition of liver tissue and morphological development of rats at different periods of ontogenesis. *Iranian Biomedical Journal*. 2019;23(2):129-141. <https://doi.org/10.29252/23.2.129>
8. Максимович Н. Е., Дремза И. К., Троян Э. И., Максимович Е. Н., Бородинский А. Н. Корректирующие эффекты дигидрохверцетина при ишемии-реперфузии головного мозга. *Биомедицинская химия*. 2014;60(6):643-650. [Maksimovich N. Ye., Dremza I. K., Troyan E. I., Maksimovich Ya. N., Borodinskii A. N. The correcting effects of dihydroquercetin in cerebral ischemia-reperfusion injury. *Biomeditsinskaya khimiya*. – *Biomedical chemistry*. 2014;60(6):643-650. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.18097/pbmcc20146006643>
9. Космачевская О. В., Насыбуллина Э. И., Шумаев К. Б., Новикова Н. Н., Топунов А. Ф. Влияние комплексов железа с оксидом азота на реакционную способность цистеинов гемоглобина. *Прикладная биохимия и микробиология*. 2020;56(5):436-445. [Kosmachevskaya O. V., Nasybullina E. I., Shumaev K. B., Topunov A. F., Novikova N. N. Effect of iron-nitric oxide complexes on the reactivity of hemoglobin cysteines. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya*. – *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2020;56(5):436-445. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.31857/S0555109920050098>
10. Saitoh Y., Yamaguchi Y., Okada Y. Protective effects of dissolved molecular hydrogen against hydrogen peroxide-, hydroperoxide-, and glyoxal-induced injuries to human skin keratinocytes. *Mol. Cell Biochem*. 2021. <https://doi.org/10.1007/s11010-021-04189-z>
11. Zheng T., Yang J., Zhang J., Yang C., Fan Z. [et al.]. Down-regulated MicroRNA-327 Attenuates Oxidative Stress-Mediated Myocardial Ischemia Reperfusion Injury Through Regulating the FGF10/Akt/Nrf2 Signaling Pathway. *Front Pharmacol*. 2021;12:669146. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.669146>
12. Попов К. А., Цымбалюк И. Ю., Сепиашвили Р. И., Быков И. М., Устинова Е. С., Быков М. И. Выбор оптимального маркера острого повреждения печени крыс в эксперименте. *Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина*. 2020;24(4):293-303. [Popov K. A., Tsybalyuk I. Y., Sepiashvili R. I., Bykov I. M., Ustinova E. S., Bykov M. I. Optimum marker selection of acute liver damage in rats in the experiment. *Vestnik Rossiyskogo universiteta druzhby narodov. Seriya: Meditsina*. – *RUDN Journal of Medicine*. 2020;24(4):293-303. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.22363/2313-0245-2020-24-4-293-303>
13. Popov K. A., Bykov I. M., Tsybalyuk I. Yu., Bykov M. I., Sidorenko A. N. [et al.]. Changes in state of the thiol linkages of an antioxidant system during ischemia and reperfusion, against a background of vascular exclusion in the rat liver. *Medical News of North Caucasus*. 2018;13(3):525-529. <https://doi.org/10.14300/mnnc.2018.13096>
14. Цымбалюк И. Ю., Мануйлов А. М., Попов К. А., Басов А. А. Метаболическая коррекция дихлорацетатом натрия ишемически-реперфузионного повреждения при сосудистой изоляции печени в эксперименте. *Новости хирургии*. 2017;25(5):447-453. [Tsybalyuk I. Y., Manuilov A. M., Popov K. A., Basov A. A. Metabolic correction of the ischemia-reperfusion injury with sodium dichloroacetate in vascular isolation of the liver in experiment. *Novosti khirurgii*. – *News of surgery*. 2017;25(5):447-453. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.18484/2305-0047.2017.5.447>

Поступила 18.06.2021

Сведения об авторах:

Попов Константин Андреевич, кандидат медицинских наук, доцент кафедры фундаментальной и клинической биохимии; тел.: 89288824941; e-mail: naftalin444@mail.ru

Быков Илья Михайлович, доктор медицинских наук, заведующий кафедрой; тел.: 89182125530; e-mail: ilya.bh@mail.ru

Цымбалюк Игорь Юрьевич, кандидат медицинских наук, ассистент; тел.: 89284300769; e-mail: igor_ts@inbox.ru

Азимов Эрустам Адамович, аспирант; тел.: 89183414969; e-mail: ilya.bh@mail.ru

Быков Михаил Ильич, доктор медицинских наук, доцент кафедры хирургии № 1; тел.: 89183596296; e-mail: bikov_mi@mail.ru

Денисова Яна Евгеньевна, аспирант кафедры фундаментальной и клинической биохимии; тел.: 89182765890; e-mail: iana.denisova.1994@mail.ru

Столярова Анжела Николаевна, аспирант; тел.: 89184809877; e-mail: anzhelika.stolyarova.94@mail.ru

Есауленко Елена Евгеньевна, доктор биологических наук, доцент, профессор кафедры; тел.: 89184353523; e-mail: esaulenko@bk.ru