

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«КУБАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
(ФГБОУ ВО КУБГМУ МИНЗДРАВА РОССИИ)

*На правах рукописи*

**ЦЫМБАЛЮК ИГОРЬ ЮРЬЕВИЧ**

**КОРРЕКЦИЯ ПАТОБИОХИМИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ ПРИ  
ВАСКУЛЯРНОЙ ЭКСКЛЮЗИИ ПЕЧЕНИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ  
ДИХЛОРАЦЕТАТА НАТРИЯ  
(ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)**

14.01.17 – хирургия

03.01.04 – биохимия

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

**Научные руководители:**

Заслуженный врач РФ,

доктор медицинских наук, профессор

**Мануйлов Александр Михайлович**

доктор медицинских наук, доцент

**Басов Александр Александрович**

Краснодар – 2018

**ОГЛАВЛЕНИЕ**

<b>ВВЕДЕНИЕ .....</b>	<b>4</b>
<b>ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....</b>	<b>12</b>
1.1. Современное состояние проблемы гемостаза в хирургической гепатологии.....	12
1.2. Ишемически-реперфузионный синдром в хирургии печени и пути его коррекции .....	20
1.3. Биологическая активность дихлорацетата натрия: концепции и механизмы .....	25
1.4. Эффективность дихлорацетата натрия в экспериментально-клинических исследованиях, его метаболические и физиологические эффекты .....	31
<b>ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....</b>	<b>35</b>
2.1. Общие принципы постановки эксперимента. Моделирование васкулярной эксклюзии печени.....	35
2.2. Лабораторные методы исследования .....	44
2.2.1. Методы определения активности маркеров цитолитического синдрома .....	45
2.2.2. Методы определения показателей антиоксидантной защиты .....	46
2.2.3. Методы исследования интенсивности свободнорадикальных процессов .....	51
2.2.4. Методика определения концентрации веществ со средней и низкой молекулярными массами .....	53
2.2.5. Биохимические методы исследования содержания общего белка, мочевины и креатинина .....	54
2.3. Расчетные методы оценки.....	55
2.4. Статистические методы исследования.....	56
<b>ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ .....</b>	<b>58</b>

3.1. Разработка оптимальной схемы введения дихлорацетата натрия с целью коррекции ишемически-реперфузионного синдрома при васкулярной эксклюзии печени.....	58
3.2. Оценка токсичности дихлорацетата натрия при его однократном введении интраперитонеально в дозировке 300 мг/кг массы тела.....	61
3.3. Оценка гепатопротекторных свойств и механизмов действия дихлорацетата натрия на экспериментальной модели васкулярной эксклюзии печени .....	62
<b>ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ .....</b>	<b>76</b>
4.1. Развитие ишемически-реперфузионного синдрома при моделировании васкулярной эксклюзии печени.....	76
4.2. Влияние дихлорацетата натрия на развитие и течение ишемически-реперфузионного синдрома при моделировании васкулярной эксклюзии печени .....	82
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....</b>	<b>88</b>
<b>ВЫВОДЫ .....</b>	<b>95</b>
<b>ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....</b>	<b>97</b>
<b>ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....</b>	<b>98</b>
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....</b>	<b>99</b>
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....</b>	<b>100</b>
<b>ПРИЛОЖЕНИЯ .....</b>	<b>119</b>

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность исследования

Одной из важнейших проблем хирургической гепатологии остается проблема гемостаза. Ввиду особенностей топографических взаимоотношений сосудистых структур печени и развитой ее васкуляризации риск массивных интраоперационных кровотечений при хирургических вмешательствах на органах гепатопанкреатодуоденальной зоны достаточно высок [М.Ф. Заривчацкий и соавт., 2013]. Для снижения кровопотери используется современное хирургическое оборудование [С.А. Maurer et al., 2016], позволяющее осуществлять электролигирование сосудов технологией LigaSure, ультразвуковую кавитационную хирургическую аспирацию, водоструйную диссекцию, аргоновую коагуляцию, радиочастотную абляцию [В.В. Бойко и соавт., 2012].

Техники васкулярной эксклюзии в различных ее вариантах обеспечивают возможность агрессивного и безопасного подхода к большинству очаговых образований печени [L.T. Hoekstra et al., 2012] и используются при протезировании воротной или верхней брыжеечной вен, а также общей печеночной артерии при инвазии опухоли в сосудистую стенку, при операциях по поводу холангиоцеллюлярного рака (опухоли Клацкина), удалении объемных образований печени [В.А. Вишневский и соавт., 2010].

Однако вследствие ишемии и последующей реперфузии органа запускается каскад метаболических, иммунологических и морфологических изменений [M. Donadon et al., 2016], получивших название ишемически-реперфузионного синдрома (ИРС), который потенциально может привести к развитию печеночной недостаточности в раннем послеоперационном периоде, что особенно опасно для пациентов с хроническим гепатитом и циррозом печени [М.Э. Писецкая, 2014].

Помимо этого, имеются данные [J.D.W. van der Bilt et al., 2005] об ускорении роста колоректальных микрометастазов при длительном ишемическом повреждении печени в условиях сосудистой окклюзии. Кроме того, синдром ишемии-реперфузии трансплантата разной степени выраженности присутствует

при каждой трансплантации печени и вносит значительный вклад в раннюю послеоперационную его дисфункцию [R.F. Saidi, S.K.H. Kenari, 2014].

Большинство процессов, направленных на поддержание функций органа, являются энергозависимыми. Снижение содержания АТФ в ишемизированной ткани печени приводит к активации анаэробного окисления глюкозы, что ведет к увеличению образования лактата и ионов водорода и, как следствие, развитию метаболического ацидоза [М.В. Биленко, 1989]. Одной из ключевых мишеней на субклеточном уровне при ишемии является митохондрия, повреждаемая как при редуцировании кровотока в сосудах органа, так и при его восстановлении. Митохондриальное окислительное повреждение усиливается образованием активных форм кислорода (АФК), провоспалительных цитокинов, факторов активации апоптоза [L. Cao et al., 2016].

#### **Степень разработанности темы**

С целью метаболической коррекции последствий ишемически-реперфузионного повреждения при васкулярной эксклюзии печени ранее исследовались препараты самых различных фармакологических групп: антиоксиданты, ингибиторы АПФ, ингибиторы ГМГ-Ко-А-редуктазы, блокаторы кальциевых каналов, стероидные гормоны, витамины, факторы роста и даже цитостатики [С. Peralta, М.В. Jiménez-Castro, J. Gracia-Sancho, 2013]. Однако ни один из препаратов представленных групп не обладает подтвержденной возможностью активации ферментных систем аэробного пути дыхания в клетке, которые в условиях тканевой гипоперфузии представляются потенциальной точкой коррекции.

В продолжение поиска в этом направлении вполне обоснованным можно считать применение при сосудистой изоляции печени в качестве митохондриального цитопротектора дихлорацетата натрия (ДХА), известного в литературе почти пятьдесят лет [P.W. Stacpoole, 1969]. Имеется опыт его применения при врожденном лактоацидозе у детей [P.W. Stacpoole, L.R. Gilbert et al., 2008], сахарном диабете, гиперлиппротеинемии (ГЛП) [P.W. Stacpoole, G.W. Moore, D.M. Kornhauser, 1978], церебральной ишемии [W.G. Barsan, 1986],

хронической обструктивной болезни легких [L.D. Calvert et al., 2008], хронической сердечной недостаточности [J.F. Lewis et al., 1998] и в онкологии [H. Sun et al., 2017; L. Sun et al., 2017].

Точкой приложения натриевой соли дихлоруксусной кислоты является один из ключевых ферментов клеточного дыхания – киназа пируватдегидрогеназы, которая ингибирует фосфорилирование пируватдегидрогеназы (ПДГ). Дихлорацетат-ион, ингибируя этот фермент, приводит к активации мультиферментного пируватдегидрогеназного комплекса (МПДК), что делает возможным превращение пирувата в ацетил-Ко-А с дальнейшим его окислением в цитратном цикле в митохондриях [Y. Sun et al., 2016].

Исходя из вышеизложенного, следует рассматривать вопрос об актуальности изучения ДХА как тканевого протектора при превентивной сосудистой изоляции печени.

### **Цель исследования**

Улучшение результатов оперативных вмешательств на печени при проведении ее васкулярной эксклюзии путем разработки алгоритма метаболической коррекции ишемически-реперфузионных нарушений.

### **Задачи исследования**

1. Разработать способ метаболической коррекции ишемически-реперфузионных нарушений при васкулярной эксклюзии печени.
2. Определить состояние прооксидантно-антиоксидантной системы на местном (в печени) и системном (в крови) уровнях при моделировании васкулярной эксклюзии печени различной продолжительности.
3. Изучить влияние дихлорацетата натрия на состояние прооксидантно-антиоксидантной системы при васкулярной эксклюзии печени различной продолжительности на местном (в печени) и системном (в крови) уровнях в эксперименте.
4. Оценить состояние системы функциональной детоксикации, а также влияние дихлорацетата натрия на выраженность эндогенной интоксикации на моделях васкулярной эксклюзии печени различной продолжительности.

5. Оценить гепатопротекторную эффективность дихлорацетата натрия при васкулярной эксклюзии печени различной продолжительности на фоне интраперитонеального его введения.

### **Научная новизна исследования**

1. Обобщены данные экспериментальных исследований ишемически-реперфузионного повреждения печени: развития биохимических синдромов ее поражения, а также процессов свободнорадикального окисления и эндотоксикоза при васкулярной эксклюзии печени в результате применения маневра Прингла.

2. Изучены биохимические изменения на местном (в печени) и системном (в крови) уровнях при использовании маневра Прингла на фоне интраперитонеального введения дихлорацетата натрия.

3. Экспериментально доказана возможность эффективного применения дихлорацетата натрия с целью коррекции патобиохимических изменений, возникающих при васкулярной эксклюзии печени, и предложен способ снижения гепатоцитолита в условиях частичной сосудистой изоляции печени в эксперименте (патент РФ на изобретение № 2644305).

4. Впервые показано, что применение ингибитора киназы пируватдегидрогеназы дихлорацетата натрия в дозировке 300 мг/кг вызывает выраженный гепатопротекторный эффект при васкулярной эксклюзии печени продолжительностью 10-15 минут.

### **Теоретическая и практическая значимость исследования**

В результате проведенного исследования были расширены представления о патогенезе ишемически-реперфузионного повреждения печени, роли в нем антиоксидантно-прооксидантной системы и системы функциональной детоксикации.

Факты, полученные в результате данного исследования, расширили представления о биологических эффектах дихлорацетата натрия, связанных с воздействием на энергетический метаболизм гепатоцитов в условиях тканевой гипоперфузии при васкулярной эксклюзии печени.

Доказана и обоснована возможность применения активатора процессов

клеточного дыхания дихлорацетата натрия с целью коррекции ишемически-реперфузионных нарушений, возникающих в результате вынужденного выключения печени из системного кровообращения. Разработан способ снижения гепатоцитолита в условиях частичной сосудистой изоляции печени в эксперименте (патент РФ на изобретение № 2644305).

Анализ полученного материала может быть использован для научно обоснованного поиска и рационального отбора новых тканевых протекторов, в том числе с целью совершенствования методов гемостаза в хирургии гепатопанкреатодуоденальной зоны.

### **Методология и методы исследования**

Сбор данных и обработка полученных результатов проводились в соответствии с разработанным диссертантом дизайном исследования, в котором были использованы адекватные поставленным задачам современные экспериментальные, лабораторные биохимические и биофизические, а также статистические методы.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Экспериментальная васкулярная эксклюзия печени приводит к патобиохимическим изменениям на местном (в печени) и системном (в крови) уровнях, проявляющимся в виде развития цитолитического синдрома, интенсификации свободнорадикального окисления и эндогенной интоксикации, степень выраженности которых зависит от продолжительности эпизода ишемии.

2. Активатор клеточного дыхания дихлорацетат натрия в условиях экспериментальной васкулярной эксклюзии печени уменьшает выраженность патобиохимических проявлений ишемически-реперфузионного синдрома, в частности, цитолиза гепатоцитов, процессов свободнорадикального окисления и эндотоксикоза на местном (в печени) и системном (в крови) уровнях.

3. Интраперитонеальное введение дихлорацетата натрия при моделировании васкулярной эксклюзии печени позволяет продлить безопасные сроки пережатия аналога печеночно-двенадцатиперстной связки путем метаболической коррекции ишемически-реперфузионных нарушений.

## **Степень достоверности и апробация результатов исследования**

О достоверности результатов и выводов проведенного исследования свидетельствует достаточное количество наблюдений (n=292) и объем экспериментально-лабораторных данных, наличие контрольной группы и групп сравнения, проведение экспериментов с использованием современных методов диагностики и обработка полученных результатов с помощью общепринятых методов статистического анализа.

Материалы диссертационного исследования представлены на XIV научно-практической конференции молодых ученых и студентов Юга России «Медицинская наука и здравоохранение» (Краснодар, 2016), V Съезде биохимиков России (Сочи-Дагомыс, 2016) и на Всероссийской научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Технологический форсайт 2.0» (Краснодар, 2016).

Диссертация выполнена в рамках комплексных тем НИР кафедр хирургии № 2 факультета повышения квалификации и профессиональной переподготовки специалистов («Оптимизация хирургического лечения заболеваний билиопанкреатодуоденальной зоны (экспериментально-клиническое исследование)», номер государственной регистрации АААА-А17-117052510085-7) и фундаментальной и клинической биохимии («Изучение молекулярных механизмов и разработка инновационных биохимических подходов диагностики, мониторинга и коррекции адаптационного потенциала у лиц, работающих в экстремальных условиях, при высоких физических нагрузках и различных патологических состояниях», номер государственной регистрации АААА-А17-117060610055-4) в соответствии с планом научно-исследовательских работ ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России.

Основные научные положения диссертации соответствуют п. 4 «Экспериментальная и клиническая разработка методов лечения хирургических болезней и их внедрение в клиническую практику» паспорта специальности 14.01.17 – хирургия; п. 5 «Анализ и синтез биологически активных веществ, выяснение их физиологического действия и возможностей применения

полученных веществ в медицине и других отраслях народного хозяйства» и п. 10 «Теоретические и прикладные проблемы природы и закономерностей химических превращений в живых организмах, молекулярных механизмов интеграции клеточного метаболизма, связей биохимических процессов с деятельностью органов и тканей, с жизнедеятельностью организма для решения задач сохранения здоровья человека, животных и растений, выяснения причин различных болезней и изыскания путей их эффективного лечения. Развитие методов генодиагностики, энзимодиагностики и научных принципов генотерапии и энзимотерапии» паспорта специальности 03.01.04 – биохимия.

### **Реализация результатов исследования**

Основные результаты работы внедрены в практику Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России и клиническо-ветеринарного отделения ФГБНУ «НИИ МП». Научные положения диссертационного исследования используются в лекциях и практических занятиях, проводимых на кафедрах хирургии № 2 факультета повышения квалификации и профессиональной переподготовки специалистов, а также фундаментальной и клинической биохимии ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России.

На основании данных диссертационного исследования запланировано проведение дальнейших целенаправленных доклинических исследований ингибитора киназы пируватдегидрогеназы дихлорацетата натрия, а также его комбинаций с препаратами, используемыми в стандартной коррекции ишемически-реперфузионного синдрома в гепатопанкреатобилиарной хирургии.

### **Личный вклад автора**

Автору принадлежит ведущая роль в выборе направления исследования, постановке цели и поиске путей ее достижения. Проанализированы отечественные и зарубежные источники по теме диссертации, на основании чего выдвинуты научные гипотезы о возможных фармакотерапевтических стратегиях и экспериментальных моделях для исследования метаболической протекторной эффективности выбранного вещества. Вклад автора является определяющим и

заключается в непосредственном участии на всех этапах исследования. Доля личного участия 92%.

В опубликованных работах, выполненных в соавторстве, соискателем лично проведена разработка дизайна и протокола исследования, определены ключевые критерии оценки патобиохимических изменений при моделировании исследуемой патологии и эффективности их коррекции при введении тестируемого вещества. При непосредственном участии автора проводилось выведение животных из эксперимента с регистрацией физиологических показателей, забор крови и органов для лабораторных биохимических и биофизических исследований, статистическая обработка данных, научное обоснование, обобщение и представление полученных результатов.

### **Объем и структура диссертационной работы**

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, обсуждения результатов собственных исследований, заключения, выводов и списка литературы, включающего 163 источника, из которых 49 отечественных и 114 зарубежных авторов. Диссертация изложена на 124 страницах машинописного текста, содержит таблиц – 11, рисунков и графических диаграмм – 13.

## ГЛАВА 1

### ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

#### 1.1. Современное состояние проблемы гемостаза в хирургической гепатологии

По данным ВОЗ, треть взрослого населения планеты страдает теми или иными заболеваниями печени. В Российской Федерации, по данным Росстата, в период с 2005 по 2016 год отмечается неуклонный рост заболеваемости злокачественными новообразованиями печени и внутripеченочных желчных протоков с 4,6 до 5,7 случаев на 100000 человек населения, при этом более выраженная тенденция роста наблюдается у лиц мужского пола – с 5,5 до 7,0 случаев на 100000 человек населения [Здравоохранение в России. 2017: Стат. сб.]. Ввиду этого хирургическое лечение опухолевых поражений печени является одной из важнейших проблем современной абдоминальной хирургии и онкологии.

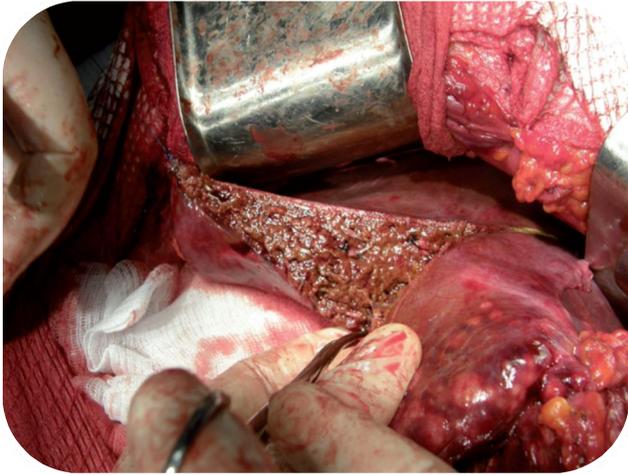
Основным методом лечения первичного опухолевого и некоторых метастатических форм поражения печени являются обширные анатомические резекции – гемигепатэктомии и расширенные гемигепатэктомии [А.Е. Борисов, 2003]. Серьезной альтернативы такому виду хирургического лечения не существует сегодня и при доброкачественных новообразованиях печени больших размеров, в частности, гигантских гемангиомах, а также обширном паразитарном кистозном поражении (при эхинококкозе, альвеококкозе) и гнойно-абсцедирующих процессах в одной из долей. Кроме того, при терминальных стадиях цирроза печени различной этиологии, некоторых врожденных нарушениях метаболизма, а также опухолевом поражении трансплантация является методом выбора [М.Ш. Хубутя, А.А. Салиенко, А.В. Чжао, 2011; М.Ш. Хубутя и соавт., 2010].

Печень по своей структуре является паренхиматозным органом, связанным с тремя крупными сосудами. Поэтому наиболее грозным осложнением в резекционной хирургии печени является кровотечение, которое может состояться

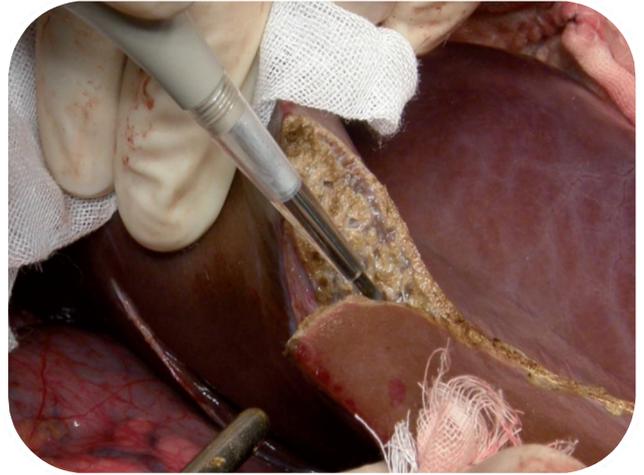
как интраоперационно, так и в раннем послеоперационном периоде, при этом средний объем кровопотери достигает 345-600 мл [W.R. Jarnagin et al., 2002], нередко превышая 2,0 л при обширных резекциях [М.Ф. Заривчацкий и соавт., 2013]. Интраоперационное кровотечение и ДВС-синдром составляют до 38% осложнений в гепатохирургии [К. Shirabe et al., 2010; П.В. Васильев и соавт., 2008; В.А. Вишневский, М.Г. Ефанов и соавт., 2008; Ю.И. Патютко и соавт., 2008; В.Д. Федоров и соавт., 2007].

При сопутствующих тяжелых диффузных дистрофических заболеваниях печени снижение резервов системы гемостаза, проявляющееся гипокоагуляцией и усилением фибринолиза, а также подавление тромбоцитарного ростка и нарушение функции тромбоцитов, обусловленное гиперспленизмом при циррозе, в сочетании с высокой плотностью паренхимы, затрудняющей прецизионность выделения трубчатых структур, и повышенным давлением в системе воротной вены при портальной гипертензии заметно увеличивают риск развития массивного кровотечения. Кроме того, некоторые авторы рассматривают кровопотерю как фактор, определяющий отдаленный прогноз заболевания [А.С. Wei et al., 2003; W.R. Jarnagin et al., 2002], поэтому в современной хирургической гепатологии огромное значение придается профилактике кровопотери. При существующем сегодня многообразии факторов, определяющих величину кровопотери в резекционной хирургии печени, крайне затруднен поиск эффективных способов ее снижения.

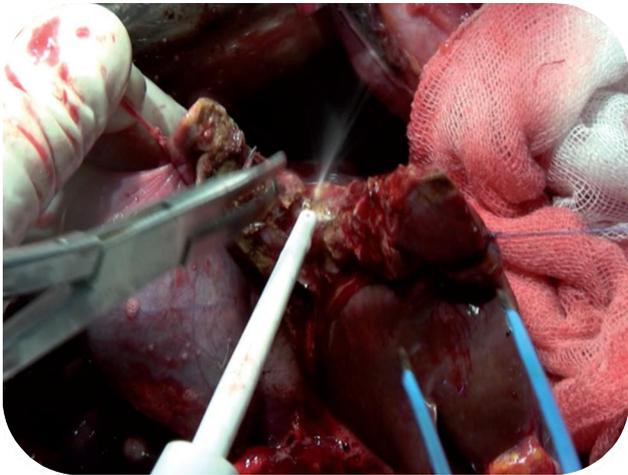
Существующие сегодня хирургические методы предупреждения и снижения объема интраоперационной кровопотери можно условно разделить на две категории. Первая объединяет методы, направленные на предупреждение повреждения магистральных сосудов печени путем использования различных способов диссекции паренхимы печени (рисунок 1.1). Методы второй направлены на уменьшение кровенаполнения печени и объединяют арсенал разнообразных методик сосудистого контроля – васкуляриной эксклюзии печени.



а



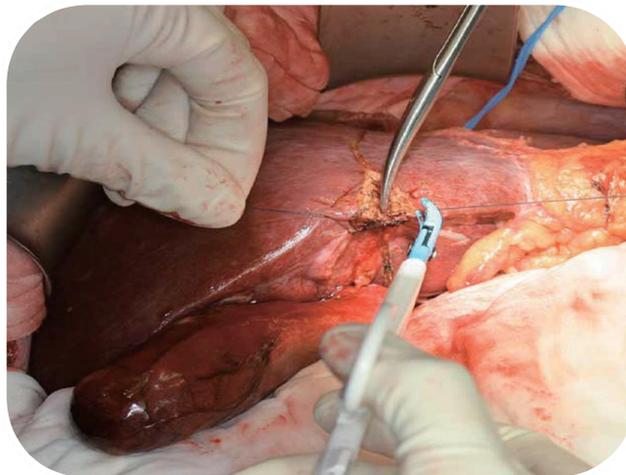
б



в



г



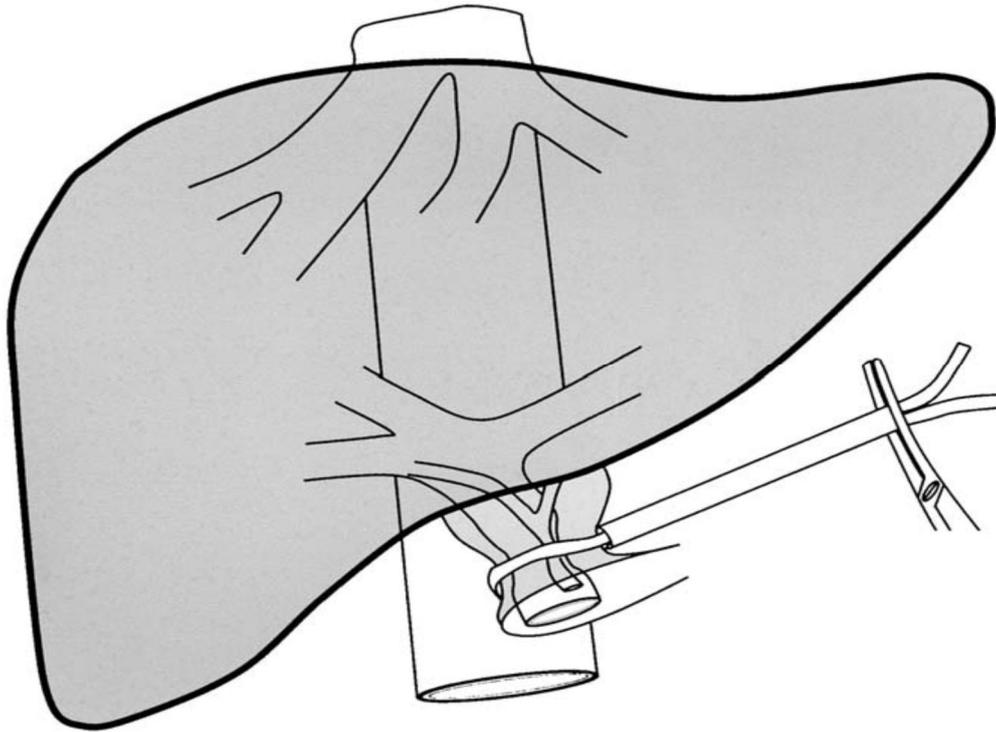
д

**Рисунок 1.1** – Использование различных методов разделения паренхимы печени: а – келликлазия, б – ультразвуковая диссекция, в – водоструйная диссекция, г – радиочастотная абляция трехигльчатым электродом [В.В. Бойко и соавт., 2012], д – аппарат LigaSure [R.J. Aragon, N.L. Solomon, 2012]

Совершенствование методов разделения паренхимы печени позволяет обеспечить оптимальную визуализацию интрапаренхиматозных трубчатых структур, вследствие чего добиться снижения объемов кровопотери и частоты послеоперационных осложнений. Для достижения этой цели используются многочисленные методы, основанные на различных физических принципах, начиная с дигитоклазии и заканчивая аргоновой коагуляцией, радиочастотной термоабляцией [М.А. Абдулаев, Е.В. Напольская, М.Ю. Цикоридзе, 2016], ультразвуковой и водоструйной диссекциями [В.В. Бойко и соавт., 2012].

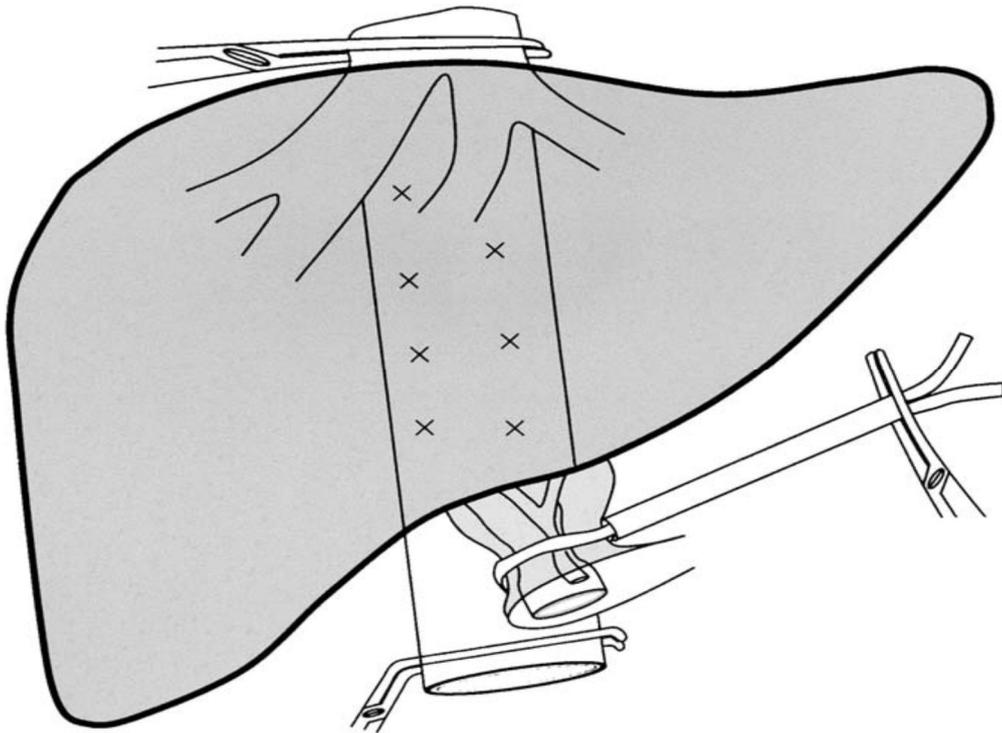
Однако в настоящее время не существует консенсуса по выбору способа разделения паренхимы печени, так как не установлено преимущество какого-либо из них [K.S. Gurusamy, V. Pamecha et al., 2009], равно как и выбора конкретной техники сосудистой изоляции, что определяется привычками отдельного хирурга и принятой в клинике методики резекции печени [В.А. Вишневский и соавт., 2012].

Техники сосудистой изоляции в различных ее вариантах обеспечивают возможность агрессивного и безопасного подхода к большинству очаговых образований печени [L.T. Hoekstra et al., 2012; Д.И. Юрлевич и соавт., 2008]. Наиболее распространенным, простым и доступным методом профилактики массивного кровотечения при диссекции паренхимы является временное выключение печени из кровообращения путем пережатия печеночно-двенадцатиперстной связки (ПДС), предложенное в 1908 году ирландским хирургом Принглом (рисунок 1.2) [J. Hogarth Pringle, 1908]. По данным исследования [J.D.W. van der Bilt et al., 2007], проведенного путем опроса 621 хирурга-члена Европейской гепатопанкреатобилиарной ассоциации, рутинно этот метод используют в среднем около 19% хирургов, по показаниям – 71%, не используют – в 10% случаев соответственно. Рутинное применение этого приема отмечалось чаще опытными хирургами в сложных ситуациях в клиниках с количеством резекций печени более 100 в год.



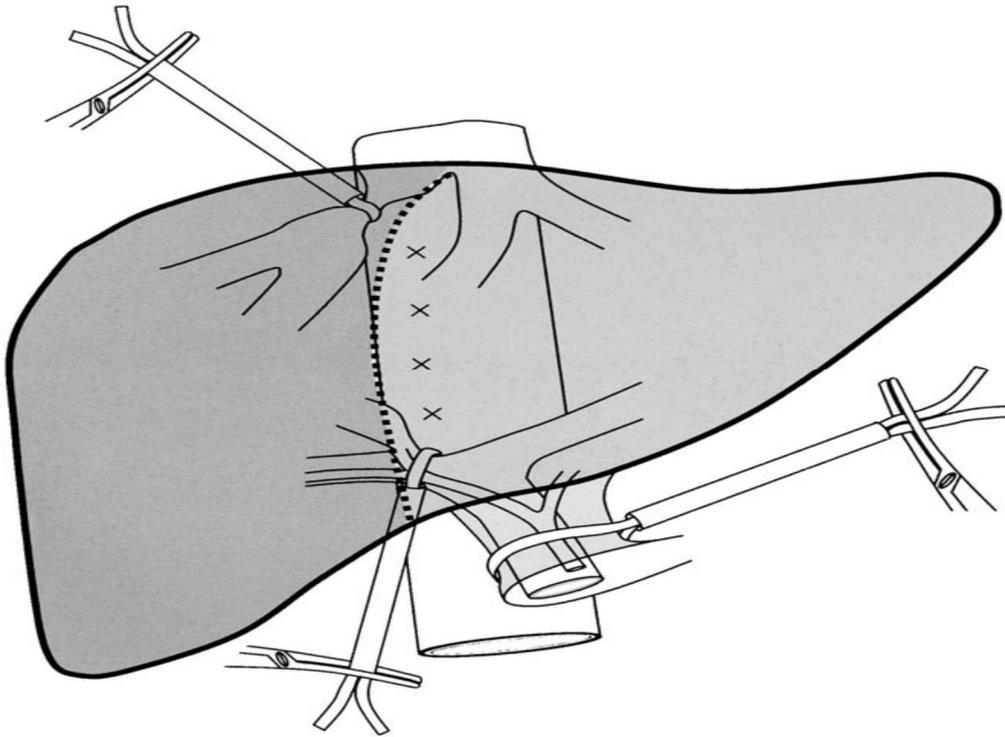
**Рисунок 1.2** – Пережатие печеночно-двенадцатиперстной связки – маневр Прингла [Е.К. Abdalla, R. Noun, J. Belghiti, 2004]

При пережатии ПДС полностью прекращается артериальный и портальный приток крови к печени, однако не исключается кровотечение из печеночных вен. Оптимальным считается интермиттирующий вариант маневра с исключением кровотока на 15-20 минут и последующим восстановлением на 3-5 минут [В.В. Цвиркун и соавт., 2006], при этом суммарное время пережатия ПДС не должно превышать 60 минут [В.А. Вишне夫斯基 и соавт., 2003]. Так, по данным Ю.И. Патютко и соавт., пережатие турникетом ПДС на 25 минут не вызывает увеличения частоты возникновения печеночной недостаточности, но позволяет уменьшить интенсивность кровотечения во время резекции и кровопотерю [Ю.И. Патютко и соавт., 2010]. Эффект данного подхода в кровосбережении несомненный, особенно при неконтролируемых, непредвиденных кровотечениях [М.А. Сейсембаев и соавт., 2013]. Кроме того, при использовании данного метода не наблюдается значимых гемодинамических нарушений.



**Рисунок 1.3** – Тотальная сосудистая изоляция печени [Е.К. Abdalla, R. Noun, J. Belghiti, 2004]

При резекциях по поводу очаговых образований, расположенных в задних (II, VII, VIII) и центральных сегментах (IV, V, VIII), когда резекционная плоскость проходит через магистральные печеночные вены или их крупные притоки, возможно использование полного выключения печени из системного кровообращения путем сочетания приема Прингла с пережатием над- и подпеченочного сегментов нижней полой вены (рисунок 1.3) [Ф.Ш. Ахметзянов, М.Н. Идрисов, 2015]. При этом тотальная сосудистая изоляция сопровождается тяжелыми гемодинамическими расстройствами: гипотонией, брадикардией и, как следствие, снижением сердечного выброса на 40-60% в результате уменьшения венозного притока к сердцу, что может приводить к увеличению продолжительности оперативного вмешательства и повышает риск послеоперационных осложнений [R.J. Aragon, N.L. Solomon, 2012]. По данным метаанализа Cochrane, эффективность тотальной сосудистой изоляции печени не доказана [K.S. Gurusamy, Y. Kumar et al., 2009; K.S. Gurusamy, H. Sheth et al., 2009].



**Рисунок 1.4** – Селективная сосудистая изоляция доли печени [Е.К. Abdalla, R. Noun, J. Belghiti, 2004]

Селективная изоляция доли, применяемая при очаговых образованиях небольших размеров, а также свободных глиссоновых и кавальных воротах печени, достигается пережатием соответствующих сосудисто-секреторных ножек и печеночных вен (рисунок 1.4). Ценность данной методики заключается в возможности выполнения резекции без выраженного ишемически-реперфузионного повреждения остающейся доли печени [В.А. Вишневский, Н.А. Назаренко и соавт., 2008], что важно при наличии тяжелых дистрофических изменений паренхимы. Однако при развитии массивного кровотечения из ветвей воротной вены этот вариант сосудистой изоляции также дополняется маневром Прингла.

Таким образом, применение различных методов сосудистой изоляции печени в сочетании с прецизионностью техники и использованием современного арсенала технических средств позволяет добиться значительного снижения объема кровопотери при выполнении обширных резекций в ряде случаев без

переливания донорской эритроцитарной массы [В.А. Вишневский, Н.А. Назаренко и соавт., 2008].

Однако васкулярная эксклюзия печени в различных ее вариантах неизбежно приводит к ишемическому и последующему реперфузионному повреждению сохраняющейся паренхимы с потенциальным развитием печеночной недостаточности в раннем послеоперационном периоде (рисунок 1.5) [А.Е. Щерба и соавт., 2012; E. Benzoni et al., 2007]. Помимо этого, имеются данные об ускорении роста колоректальных микрометастазов при длительном ишемическом повреждении печени в условиях сосудистой окклюзии [J.D.W. van der Bilt et al., 2005]. Также в клинической практике ишемически-реперфузионное повреждение печени повышает риск развития первичной дисфункции трансплантата при ее пересадке [R.F. Saidi, S.K.H. Kenari, 2014].



**Рисунок 1.5** – Синдром ишемии-реперфузии печени в клинической практике

## **1.2. Ишемически-реперфузионный синдром в хирургии печени и пути его коррекции**

Синдром ишемии-реперфузии печени – это сложный комплекс патологических и адаптивных реакций организма [L.-Y. Guan et al., 2014], включающих каскад метаболических, иммунологических и морфологических изменений [M. Donadon et al., 2016], развивающихся в результате редуцирования кровотока в органе с последующим его восстановлением. Прекращение поступления кислорода приводит к инверсии метаболизма с аэробного окисления на гликолиз, являющийся менее энергоэффективным, что сопровождается значительным снижением синтеза АТФ в тканях и накоплением недоокисленных продуктов. Дальнейшая реперфузия печени нередко становится причиной значительного повреждения гепатоцитов, эндотелия капилляров и эпителия желчных протоков.

Ведущим патофизиологическим механизмом развития синдрома ишемии-реперфузии печени является окислительный стресс. Дисбаланс между тканевой потребностью в кислороде и доставкой, а также резкое возрастание его парциального давления в ткани печени после восстановления кровотока создают благоприятные условия для образования свободных радикалов (супероксид-аниона, перекиси водорода, гидроксильного радикала). Это в свою очередь приводит к активации процессов перекисного окисления липидов, которое ведет к альтерации клеточных и субклеточных мембранных структур гепатоцитов [J. Li et al., 2015].

Источником образования АФК при синдроме ишемии-реперфузии печени могут быть как гепатоциты, так и звездчатые макрофаги, эндотелиоциты, а также мигрировавшие нейтрофилы [H. Jaeschke, B.L. Woolbright, 2012; K. Weigand et al., 2012]. Усиление продукции свободных радикалов гепатоцитами в системе гипоксантин-ксантинооксидаза, а также вследствие утечки электронов из дыхательной цепи митохондрий происходит уже в раннем периоде реперфузии. Это приводит к снижению содержания структурных антиоксидантов и истощению ферментного звена системы антиоксидантной защиты – каталазы,

супероксиддисмутазы, глутатионпероксидазы [B. Liu, J.M. Qian, 2015; М.Н. Ходосовский, 2008], а также глутатиона [И.Ф. Ярошенко, Т.Ю. Каланчина, 2006]. При этом перекисное окисление липидов биомембран приводит к повышению их проницаемости для кальция и натрия, вызывая клеточный отек и активируя кальций-зависимые лизосомальные ферменты, приводя к гибели клеток путем некроза [М.Н. Ходосовский, 2016]. Так, активация рианодиновых рецепторов мембранных каналов эндоплазматического ретикулаума в сочетании с повышенной проницаемостью клеточных мембран приводят к накоплению ионов кальция в цитозоле и увеличению их концентрации в митохондриях [A.T.W. Song et al., 2014], парализуя таким образом работу дыхательной цепи и приводя к дефициту АТФ [G. Manzini et al., 2013].

С целью стабилизации внутриклеточного рН в условиях гипоксии активируется натриево-водородная помпа, но учитывая имеющуюся вследствие дефицита макроэргов блокаду АТФ-зависимых натрий-калиевых каналов, это приводит к накоплению ионов натрия, повышению осмотического давления, снижению трансмембранного потенциала и гибели гепатоцитов [B. Li et al., 2010]. Повреждение мембран митохондрий и высвобождение цитохрома С в цитозоль клеток вызывает усиление запрограммированной клеточной гибели [L. Cao et al., 2016; J. Li et al., 2015]. Активация апоптоза и снижение количества эндотелиоцитов сосудов приводит к развитию тромбозов, усугубляя таким образом нарушения микроциркуляции [B. Liu, J.M. Qian, 2015].

Генерация АФК приводит к ингибированию NO-синтазы в эндотелии синусоидов, что сопровождается угнетением синтеза оксида азота [K. Weigand et al., 2012], эффекты которого заключаются в вазодилатации, улучшении транспортной функции крови и повышении кислородсвязывающих свойств гемоглобина, повышении содержания АТФ, снижении митохондриальной альтерации, ацидоза и инфильтрации ткани печени лейкоцитами [М.Н. Ходосовский, В.В. Зинчук, 2012; M. Abu-Amara et al., 2012]. Таким образом, результатом этого является ухудшение микроциркуляторных процессов и усугубление реперфузионного повреждения печени.

Активированные при ИРС звездчатые макрофаги продуцируют провоспалительные цитокины, АФК и протеазы, которые могут влиять на активность редокс-чувствительных факторов транскрипции, таких как HIF, NF- $\kappa$ B и AP-1, осуществляя таким образом регуляцию провоспалительных генов в гепатоцитах и эндотелиоцитах [Р.Б. Алиханов, В.А. Кубышкин, 2013; K. Weigand et al., 2012]. Следует также отметить, что при частичной ишемии печени, наблюдаемой, например, при селективной сосудистой изоляции ее доли, активация клеток Купфера вначале происходит в ишемизированной части, а позже охватывает и весь орган, что может стать в дальнейшем причиной его тотальной дисфункции [H. Jaeschke, B.L. Woolbright, 2012; M. Abu-Amara et al., 2010].

Гипоксия-индуцибельный фактор HIF представляет из себя гетеродимер, включающий одну  $\alpha$ -субъединицу (кислород-чувствительную, выполняющую специфическую функцию в генной регуляции, стимулированной гипоксией) и одну  $\beta$ -субъединицу (кислород-нечувствительный конститутивный ядерный протеин). В условиях нормоксии высокая скорость деградации HIF1- $\alpha$  поддерживает систему в неактивном состоянии, однако при снижении парциального давления кислорода в ткани и закислении среды она стабилизируется и транспортируется в ядро гепатоцита, где, объединяясь с  $\beta$ -субъединицей, образует функционально активный комплекс, который, взаимодействуя с HRE-участками таргетных генов, определяет индукцию их экспрессии [G.L. Semenza, 2017; И.А. Аллилуев, 2014; В.Е. Новиков, О.С. Левченкова, 2013]. В результате стимулируется ангиогенез (фактор роста эндотелия сосудов –VEGF), эритропоэз (эритропоэтин), образование разнообразных ферментов, в том числе гликолитических, индуцибельной NO-синтазы, циклооксигеназы-2, фосфолипазы A2, гемоксигеназы, металлопротеаз и др. [K.B. Walsh et al., 2009], а также цитокинов (TNF- $\alpha$ , IL-1 и др.), молекул межклеточной адгезии (E-селектин,  $\beta$ -интегрин, ICAM-1), трансферина, эндотелинов и др. [В.Е. Новиков, О.С. Левченкова, 2013; G. Datta, B.J. Fuller, B.R. Davidson, 2013; C. Peralta, M.B. Jiménez-Castro, J. Gracia-Sancho, 2013]. Таким

образом, реализуются механизмы, направленные на поддержание нормального функционирования гепатоцита в условиях сниженного обеспечения кислородом.

Важную роль в развитии воспалительного процесса при синдроме ишемии-реперфузии печени играют активация гена транскрипционного ядерного фактора NF-κB и запуск цитокинового каскада [Z. Shao et al., 2017; L. D'Ignazio, D. Bandarra, S. Rocha, 2016]. Критическое значение в развитии альтеративной фазы имеет один из ключевых медиаторов воспаления – фактор некроза опухолей TNF-α, который способствует активации нейтрофилов и увеличению микротромбообразования в сосудах печени. Активированные мигрировавшие нейтрофилы, продуцирующие АФК в большом количестве, потенцируют окислительный стресс и усугубляют повреждение гепатоцитов, что может выступать триггерным механизмом для системной воспалительной реакции, приводящей к полиорганной недостаточности [B. Liu, J.M. Qian, 2015; H.M.P. Gomes et al., 2014; G. Datta, B.J. Fuller, B.R. Davidson, 2013].

Кроме того, вследствие выброса TNF-α повышается продукция воспалительных медиаторов второго (интерлейкинов, простагландинов и других эйкозаноидов) и третьего порядка, в том числе эффекторов и компонентов калликреин-кининовой, свертывающей и фибринолитической систем, веществ патологического метаболизма (кетоны, альдегиды, высшие спирты и др.), промежуточных продуктов обмена в концентрациях выше физиологических (лактат, мочевины, креатинин и др.) [Z. Shao et al., 2017; Y. Zhai et al., 2013]. Эти изменения уже характеризуют переход процесса на системный уровень с развитием эндогенной интоксикации.

Окислительный стресс и цитокиновый каскад при ИРС приводят к апоптозу гепатоцитов в результате развития митохондриальной дисфункции вследствие изменения redox-статуса и передачи регуляторных сигналов путем активации или ингибирования экспрессии различных транскрипционных факторов [L. Cao et al., 2016; G. Datta, B.J. Fuller, B.R. Davidson, 2013; K.K. Kuo et al., 2013; H. Jaeschke, 2002].

Таким образом, взаимосвязь различных механизмов ответа на ишемию-реперфузию печени, в частности цитокинового и апоптотического каскадов, приводит к развитию «гипоксического воспаления», центральным звеном которого является взаимодействие двух основных факторов транскрипции – NF- $\kappa$ B [Z. Shao et al., 2017; L. D'Ignazio, D. Bandarra, S. Rocha, 2016].

Представление о механизмах процессов, сопровождающих синдром ишемии-реперфузии печени, может стать основой для разработки новых научно обоснованных методик, позволяющих улучшить качество трансплантационных и других обширных операций на органах гепатобилиарной системы, а также снизить риск развития послеоперационных осложнений.

В настоящее время разработан большой спектр методов профилактики и коррекции нарушений, возникающих при ИРС. Одним из подходов является ишемическое пре- или посткондиционирование, суть которого заключается в кратковременном ишемически-реперфузионном воздействии путем наложения/снятия зажима на афферентные сосуды печени до или после основного эпизода ишемии [S.-Y. Yoon et al., 2015], в результате наблюдается улучшение микроциркуляторных и метаболических процессов, снижается активность ПОЛ, уменьшается продукция провоспалительных цитокинов [C. Brenner et al., 2013; X. Song et al., 2012; L.-M. Jin et al., 2010]. Несмотря на многообещающие результаты экспериментальных исследований, ишемическое преко́ндиционирование не показало эффекта в клинических испытаниях при обширных резекциях в условиях тепловой ишемии печени (использование маневра Прингла) [B. Koneru et al., 2005]. Кроме того, применение этих методов приводит к увеличению продолжительности оперативного вмешательства.

С клинической точки зрения преко́ндиционирование фармакологическими агентами выглядит более предпочтительным. С этой целью изучались препараты самых различных групп: антиоксиданты (глутатион,  $\alpha$ -токоферол, ацетилцистеин, аскорбиновая кислота,  $\alpha$ -липоевая кислота), а также антиоксидантная генная терапия, антагонисты рецепторов цитокинов и ингибиторы системы комплемента, ингибиторы апоптоза (Z-DEVD-FMK – ингибитор 3 и 7 каспаз), гормоны и

гормоноподобные вещества (эритропоэтин, мелатонин, метилпреднизолон), вазодилататоры (прекурсоры и донаторы NO, аналоги простациклина), иммунодепрессанты (циклоспорин), а также ингибиторы ферментов – циклооксигеназы-2, ксантинооксидазы, NADH-оксидазы [M. Cannistrà et al., 2016; M. Donadon et al., 2016; B.A. Messiha, A.M. Abo-Youssef, 2015; М.Н. Ходосовский, В.В. Зинчук, 2014; S.M. Robinson et al., 2013; Д.В. Лопатин и соавт., 2012; S. Jegatheeswaran, A.K. Siriwardena, 2011; K.S. Gurusamy, H.D. Gonzalez, B.R. Davidson, 2010; R. Schmidt, 2010; D. Uhlmann et al., 2004]. При этом ни один из предложенных методов и их сочетаний не обеспечивает гарантированной защиты от ишемически-реперфузионного повреждения печени с потенциальным развитием в послеоперационном периоде ее дисфункции [K.S. Gurusamy, H.D. Gonzalez, B.R. Davidson, 2010], в связи с чем продолжается поиск и отбор перспективных субстанций этой направленности действия.

Как известно, одной из ключевых мишеней на субклеточном уровне при ишемии является митохондрия, повреждаемая как при редуцировании кровотока в сосудах органа, так и при его восстановлении. В условиях митохондриальной дисфункции ферментные системы клеточного дыхания представляются потенциальной точкой коррекции [S. Salamon et al., 2017]. В связи с этим особый интерес приобретает исследование ДХА, стимулирующего активность МПДК, в качестве митохондриального цитопротектора с целью возможной профилактики и коррекции последствий ишемически-реперфузионного повреждения печени при резекциях в условиях ее сосудистой изоляции.

### **1.3. Биологическая активность дихлорацетата натрия: концепции и механизмы**

Экспериментально-клинические исследования ДХА и других солей дихлоруксусной кислоты проводятся в медицине на протяжении последних сорока пяти лет [P.W. Stacpoole, 1969]. ДХА – один из множества органических галогенидов, с которыми человеческая популяция контактирует постоянно. Он содержится в хлорированной питьевой воде, где его концентрация может

достигать 160 мкг/л [J.W. Miller, P.C. Uden, 1983], в грунтовых водах, загрязненных при производстве промышленных растворителей и других хлорсодержащих веществ [P.W. Stacpoole, 2011], кроме того, выступает в роли промежуточного метаболита при биотрансформации некоторых лекарственных препаратов [G.N. Henderson et al., 1997].

ДХА является структурным аналогом пировиноградной кислоты, и его биологическая активность связана с активацией МПДК. Одним из наиболее значимых результатов этого является снижение концентрации лактата на локальном уровне и, соответственно, в крови, что позволяет относить ДХА к метаболическим цитопротекторам.

Пируват, как известно, играет центральную роль в углеводном и энергетическом метаболизме. Его обратимое декарбоксилирование с образованием ацетил-КоА МПДК и карбоксилирование с превращением в оксалоацетат пируваткарбоксилазой обеспечивает вхождение 3-углеродных (С3) и 2-углеродных (С2) фрагментов в цикл трикарбоновых кислот. Восстановленные эквиваленты (NADH и FADH<sub>2</sub>), образующиеся в результате окислительного декарбоксилирования и других реакций цикла Кребса, обеспечивают электронами митохондриальную электрон-транспортную цепь и окончательный синтез АТФ из АДФ и неорганического фосфата под воздействием комплекса 5 дыхательной цепи (АТФ-синтазы) [P.W. Stacpoole, T.L. Kurtz et al., 2008].

В аэробных условиях активность МПДК является лимитирующей для митохондриального окисления глюкозы и пирувата и для лактата с аланином, находящихся в равновесном состоянии с пируватом, что играет определяющую роль в максимально эффективном использовании углеводов как источников энергии. Быстрая регуляция МПДК осуществляется прежде всего за счет обратимого фосфорилирования гидроксильных групп остатков серина, локализованных в  $\alpha$ -субъединице гетеротетрамерного ( $\alpha_2\beta_2$ ) первого (E<sub>1</sub>) компонента комплекса. Когда E<sub>1</sub> $\alpha$ -субъединица не фосфорилирована, ПДК функционирует в качестве декарбоксилазы  $\alpha$ -кетокислот с облигатным

кофактором тиаминпирофосфатом и окисляет пируват. На следующей стадии катализирует восстановительное ацетилирование липоил-фрагмента дигидролипоамид-трансацилазы ( $E_2$ ). У человека имеется 4 изоформы киназы ПДГ, которые фосфорилируют  $E_1\alpha$ -субъединицу, переводя тем самым МПДК в неактивное состояние. Ее активность ингибируется пируватом при возрастании коэффициента АДФ/АТФ и стимулируется при возрастании коэффициента  $NADH/NAD^+$  или ацетил-КоА/КоА. Дефосфорилирование и активация  $E_1\alpha$ -субъединицы обеспечивается фосфатазой ПДГ, представленной у человека в виде двух изоформ, активность которых регулируется концентрацией ионов  $Ca^{2+}$  и  $Mg^{2+}$  [P.W. Stacpoole, T.L. Kurtz et al., 2008].

При пероральном введении ДХА быстро всасывается в системный кровоток, его биодоступность приближается к 100% [S.H. Curry, A. Lorenz, P.I. Chu et al., 1991]. Легко всасывается в желудочно-кишечном тракте, менее 1% от введенной дозы выводится с мочой [P.W. Stacpoole et al., 1998; S.H. Curry, A. Lorenz, G.N. Henderson et al., 1991]. Препарат транспортируется через клеточные мембраны, включая и гематоэнцефалический барьер, с помощью монокарбоксилатной транспортной системы, для которой лактат, пируват и кетоновые тела являются естественными субстратами [C.V. Ammini, P.W. Stacpoole, 2003; V.N. Jackson, A.P. Halestrap, 1996]. ДХА также конкурирует за транспорт внутрь митохондрии с пируватным митохондриальным переносчиком. Стимуляция активности ПДГ обычно происходит в течение считанных минут после перорального или парентерального его введения, что проявляется в дозозависимом уменьшении концентрации лактата [P.W. Stacpoole, N.V. Nagaraja, A.D. Hutson, 2003]. Тщательное исследование структуры второй изоформы киназы ПДГ, которая является наиболее широко экспрессируемой в тканях, и ее взаимодействия с натуральными и синтетическими лигандами показало, что ДХА и пируват взаимодействуют с одним и тем же связывающим участком в центре N-концевого регуляторного домена [T.R. Knoechel et al., 2006]. ДХА в присутствии АДФ вызывает изменения в активном центре второй изоформы киназы ПДГ, что приводит к ее неконкурентному ингибированию и

последующей активации МПДК. По относительной чувствительности к ДХА все изоформы киназы ПДГ можно расположить в следующей последовательности: И2≈И4>И1>>И3 [Т.Е. Roche, Y. Hiromasa, 2007].

Прямое увеличение активности МПДК и частичное торможение окисления длинноцепочечных жирных кислот в митохондриях в результате увеличения концентрации малонил-КоА, которое сопровождается усилением окисления пирувата, оказывает цитопротективный эффект при ишемии различных органов и тканей.

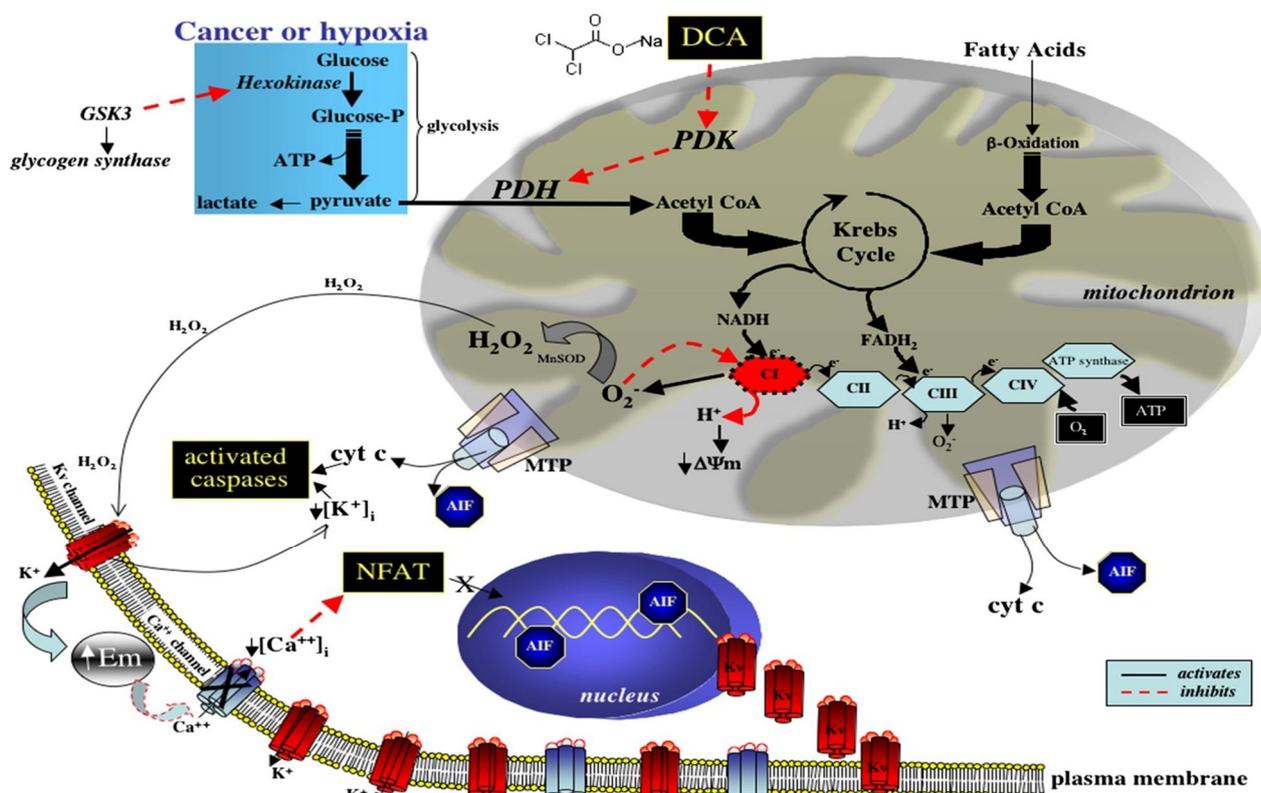


Рисунок 1.6 – Механизм действия дихлорацетата натрия [S. Bonnet et al., 2007]

*Примечание:* DCA – дихлорацетат натрия, PDK – киназа пируватдегидрогеназы, PDH – пируватдегидрогеназа, AIF – апоптоз индуцирующий фактор, NFAT – нуклеарный фактор активированных Т-лимфоцитов, МТР – митохондриальная пора,  $\Delta\Psi_m$  – градиент мембранного потенциала митохондрии.

ДХА восстанавливает функциональную связь между гликолизом и окислительным декарбоксилированием пирувата в митохондриях (рисунок 1.6), нейтрализует закисление цитоплазмы, оптимизирует расход кислорода в условиях

ишемии, что имеет важное значение, поскольку окисление глюкозы в митохондриях требует на 10-12% меньше кислорода, чем окисление жирных кислот при синтезе такого же количества АТФ. При этом полностью образование лактата не подавляется, что необходимо для регенерации окисленных коферментов и протекания анаэробного гликолиза. Однако содержание восстановленных коферментов существенно возрастает, что поддерживает функционирование антиоксидантной системы (АОС) в условиях интенсификации образования свободных радикалов в момент реперфузии и обеспечивает быстрое восстановление энергетического метаболизма [А.М. Мануйлов и соавт., 2016].

Для некоторых тканей и органов грызунов ДХА оказался токсичным [P.W. Stacpoole et al., 1998], для человека же особое значение имеет его воздействие на печень и нервную систему. Данные открытых [A.L. Shroads et al., 2008; P.W. Stacpoole, L.R. Gilbert et al., 2008; P.W. Stacpoole et al., 1997] и рандомизированных, плацебо-контролируемых исследований [P.W. Stacpoole, L.R. Gilbert et al., 2008; P. Kaufmann et al., 2006; P.W. Stacpoole et al., 2006; G.E. Duncan et al., 2004; T. Agbenyega et al., 2003; P.W. Stacpoole et al., 1992] указывают, что при длительном внутривенном введении или пероральном приеме ДХА (до 6 месяцев) у детей и взрослых наблюдалось умеренное, не превышающее в 2 раза верхнюю границу нормы, и легко обратимое повышение уровня печеночных трансаминаз у небольшого количества пациентов, что и явилось единственным проявлением его гепатотоксичности.

Воздействие ДХА на центральную нервную систему сводилось к преходящей сонливости, седативному эффекту у небольшого количества пациентов. По-видимому, он оказывает менее выраженное седативное действие, чем обыкновенные депрессанты ЦНС (на основании результатов тестов, используемых для оценки препаратов из ряда малых транквилизаторов, бензодиазепинов и барбитуратов) [S.H. Curry, A. Lorenz, P.I. Chu et al., 1991], но может обладать некоторыми свойствами анксиолитиков. Самым неблагоприятным эффектом ДХА на нервную систему является развитие

транзиторной периферической нейропатии, наблюдавшейся в исследованиях у собак, крыс и человека [P.W. Stacpoole et al., 1998].

ДХА используется для лечения различных заболеваний и состояний у взрослых и у детей на протяжении многих лет. За это время было установлено, что он безопасен даже в дозировках, значительно превышающих применяемые в онкологической практике [P.W. Stacpoole et al., 2006; P.W. Stacpoole, 1989]. Исследования в период беременности и лактации не проводились, поэтому использование ДХА в эти периоды противопоказано.

В целом терапия ДХА хорошо переносится, побочные эффекты незначительны, но могут включать спутанность сознания, тремор, галлюцинации, седацию, потерю памяти, депрессию, психомоторное возбуждение, усталость, тошноту и изжогу при пероральном его введении. Из известных нежелательных эффектов при терапевтическом применении ДХА отмечались: незначительное повышение уровня печеночных трансаминаз, гипокальциемия, транзиторная центральная и периферическая нейропатии, которые носили обратимый характер и исчезали после окончания его приема [T. Li et al., 2008; P. Kaufmann et al., 2006]. ДХА-индуцированный делирий отмечался у некоторых пациентов, однако это проявление также носило обратимый характер и исчезало после отмены терапии [D. Brandsma et al., 2010]. Аллергических реакций при применении ДХА не отмечалось. В исследовании на взрослых с синдромом MELAS пациенты принимали перорально ДХА на протяжении 6 месяцев в дозе 25 мг/кг/день, что привело к развитию обратимой периферической нейропатии [P. Kaufmann et al., 2006]. В то же время при продолжительном применении ДХА для лечения врожденного лактатацидоза у детей в тех же дозировках ее развития не отмечали [P.W. Stacpoole et al., 2006].

Как при пероральном приеме, рекомендуемом по циклической схеме, так и при внутривенном введении для снижения проявлений периферической нейропатии используют сопроводительную терапию  $\alpha$ -липоевой кислотой [P. Kaufmann et al., 2006; P.W. Stacpoole et al., 2006]. Рекомендуется избегать терапии ДХА у

пациентов, принимающих бензодиазепины и любые другие препараты с потенциальными побочными эффектами со стороны нервной системы.

Как известно, ДХА метаболизируется в печени [P.W. Stacpoole et al., 1998], поэтому при применении у лиц с нарушенной ее функцией следует проявить осторожность. Прием ДХА приводит к транзиторному повышению печеночных трансаминаз, поэтому требуется тщательный мониторинг этих показателей до начала терапии и через определенные интервалы времени [P.W. Stacpoole et al., 1998].

#### **1.4. Эффективность дихлорацетата натрия в экспериментально-клинических исследованиях, его метаболические и физиологические эффекты**

Механизм действия ДХА, как уже было сказано выше, связан с активацией МПДК, результатом чего в нормальных клетках, находящихся в условиях тканевой гипоксии, является оптимизация расходования кислорода и снижение уровня ацидификации среды, что позволяет относить его к метаболическим цитопротекторам.

В клинических и экспериментальных исследованиях было показано, что ДХА обладает антиишемическими свойствами, а также способствует ускоренному восстановлению контрактильной функции миокарда в постишемическом периоде ишемической болезни сердца [С.Н. Васляева и соавт., 2004]. Пациенты, страдающие ИБС, получали внутривенно ДХА в дозировке 35 мг/кг, что привело к увеличению утилизации лактата миокардом и снижению его концентрации в артериях, периферической вазодилатации, а также увеличению ударного объема и повышению эффективности миокарда у больных [Т.Т. Wargovich et al., 1988].

Кроме того, применение ДХА в дозировке 25 мг/кг веса при церебральной ишемии в эксперименте приводило к достоверному снижению уровня лактата в 1,7-3,0 раза, увеличивая при этом вероятность благополучного неврологического исхода [W.G. Barsan, 1986].

Большинство исследований ДХА посвящено изучению его противоопухолевой активности. В атипичных клетках фармакологический эффект ДХА сводится к инверсии метаболизма с интенсификацией СРП, активацией каспазного ферментного каскада, снижением активности пропролиферативных и проангиогенетических транскрипционных факторов (рисунок 1.6), что объясняет позитивный эффект в лечении целого ряда опухолей: гемобластозов [S.B. Strum et al., 2013], глиобластомы [E.D. Michelakis, L. Webster, J.R. Mackey, 2008; S. Bonnet et al., 2007], рака щитовидной железы [D.F. Flavin, 2010], печени [Y.-C. Shen et al., 2013; T. Ishiguro et al., 2012], молочной железы [R.C. Sun et al., 2010], почек [A. Khan, 2012]. Результаты параллельно проводимых многочисленных исследований на клеточных линиях самых разнообразных бластом человека тому подтверждение [M. Fereidoonzhad et al., 2016; J.-L. Roh et al., 2016; J. Zajac et al., 2016; Y.-C. Shen et al., 2013; T. Ishiguro et al., 2012; J.T. Washington, N.J. Quintyne, 2012; H. Xiao et al., 2012].

Клинические исследования на лицах, страдающих ГЛП, показали, что применение ДХА приводит к существенному снижению повышенного в крови уровня холестерина и триглицеридов, вероятнее всего, за счет стимуляции их окисления в печени [P.W. Stacpoole, 1978]. Наибольшего успеха в этом плане удалось достигнуть у пациентов с IIb и IV типами ГЛП. Так, в первой группе исследуемые с сахарным диабетом и IIb или IV типом ГЛП принимали ежедневно от 2 до 8 капсул, содержащих по 500 мг ДХА. Среди 10 пациентов, получавших такие капсулы в течение недели, отмечалось снижение уровня холестерина в плазме крови в среднем на 19%, а триглицеридов – в среднем на 53%. Аналогичные результаты были получены в группе пациентов с ГЛП IIb или IV типа, не страдающих сахарным диабетом. Таким образом, ДХА оказался высокоэффективным при различных типах ГЛП. Особенно ценно, что он снижает одновременно содержание в плазме крови и холестерина, и триглицеридов.

В экспериментальном исследовании [И.М. Быков и соавт., 2017] было изучено влияние ДХА на развитие и течение аллоксанового диабета у крыс. ДХА вводили в дозировке 15 мг/100 г массы тела животного ежедневно вместе с

питьевой водой в течение месяца до и месяц после моделирования патологического процесса. Полученные данные указали на гипогликемический и гиполипидемический эффекты рассматриваемого метаболического корректора. Так, концентрация глюкозы плазмы крови в группе животных, получавших ДХА, была ниже группы сравнения (без коррекции) на 36%. Гиполипидемическое действие выражалось в снижении концентрации общего холестерина на 23% и содержания холестерина липопротеинов низкой плотности на 31% в плазме крови. Индекс атерогенности, представляющий отношение содержания холестерина липопротеинов низкой плотности к концентрации холестерина липопротеинов высокой плотности, также снижался на 30%.

В экспериментальном исследовании [G. Ribes, G. Valette, M.-M. Loubatières-Mariani, 1979] однократное пероральное введение ДХА в дозировке 150 мг/кг здоровым собакам приводило к стремительному снижению уровней лактата, пирувата, триглицеридов и глюкозы в крови с сохранением этого эффекта на протяжении более чем суток. У собак с аллоксан-индуцированным диабетом, не получавших инсулин за 72 часа до начала эксперимента, введение ДХА приводило к снижению концентрации глюкозы, лактата и пирувата, а также уменьшению глюкозурии, но не повлияло существенным образом на липидный спектр плазмы и содержание кетоновых тел в крови и моче. Продолжительное введение ДХА (в течение 7 дней) здоровым собакам в той же дозировке приводило к снижению показателей глюкозы, лактата, пирувата, холестерина и оксалоацетата, которые возвращались к изначальным значениям спустя 2-5 дней после заключительного введения. При этом уровни  $\beta$ -гидроксибутирата и ацетоацетата значительно возрастали. У собак с аллоксан-индуцированным диабетом, получавших только инсулин, сохранялись высокие показатели глюкозы в крови, возрастало содержание липидов и кетоновых тел, при этом концентрации лактата, пирувата и оксалоацетата не отличались существенным образом от таковых у здоровых животных. Дополнительное введение ДХА в дозировке 75 мг/кг в течение недели способствовало снижению показателей лактата, пирувата, оксалоацетата, глюкозы, общих липидов, холестерина и триглицеридов

в крови, однако не повлияло на изначально высокие уровни  $\beta$ -гидроксibuтирата и ацетоацетата. Также отмечалось быстрое и выраженное уменьшение глюкозурии, сочетавшееся с увеличением содержания в моче  $\beta$ -гидроксibuтирата и ацетона.

В исследовании на здоровых добровольцах изучалось влияние ДХА на некоторые гемодинамические параметры [В. Ludvik et al., 1991]. Исследуемым однократно внутривенно вводился ДХА в дозировке 50 мг/кг. Отмечается, что спустя 60 минут после введения сердечный индекс вырос с  $2,3 \pm 0,03$  до  $2,7 \pm 0,1$  л/(мин·м<sup>2</sup>) ( $p < 0,05$ ), общее периферическое сопротивление сосудов снизилось с  $2662 \pm 97$  до  $2398 \pm 169$  Дин·с·см<sup>-5</sup> ( $p < 0,05$ ), доставка кислорода возросла с  $442 \pm 16$  до  $535 \pm 30$  мл/(мин·м<sup>2</sup>) ( $p < 0,05$ ), а уровень лактата снизился с  $1,4 \pm 0,14$  до  $0,6 \pm 0,1$  ммоль/л ( $p < 0,05$ ). Таким образом, полученные данные позволяют рассматривать ДХА в качестве альтернативной терапии при различных формах метаболического ацидоза.

Таким образом, ДХА показал свою эффективность при широком спектре состояний и заболеваний, сопровождающихся митохондриальной дисфункцией. Продолжающиеся экспериментально-клинические исследования в этом направлении перспективны и могут быть полезны для более глубокого понимания механизмов действия этой органической соли на клеточном и субклеточном уровнях при тканевой гипоперфузии в условиях васкулярной эксклюзии печени, расширяя возможности ее применения в различных вариантах в хирургической гепатологии.

## ГЛАВА 2

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В главе описаны общие принципы организации исследования, методы лабораторного анализа и статистической обработки полученных экспериментальных данных.

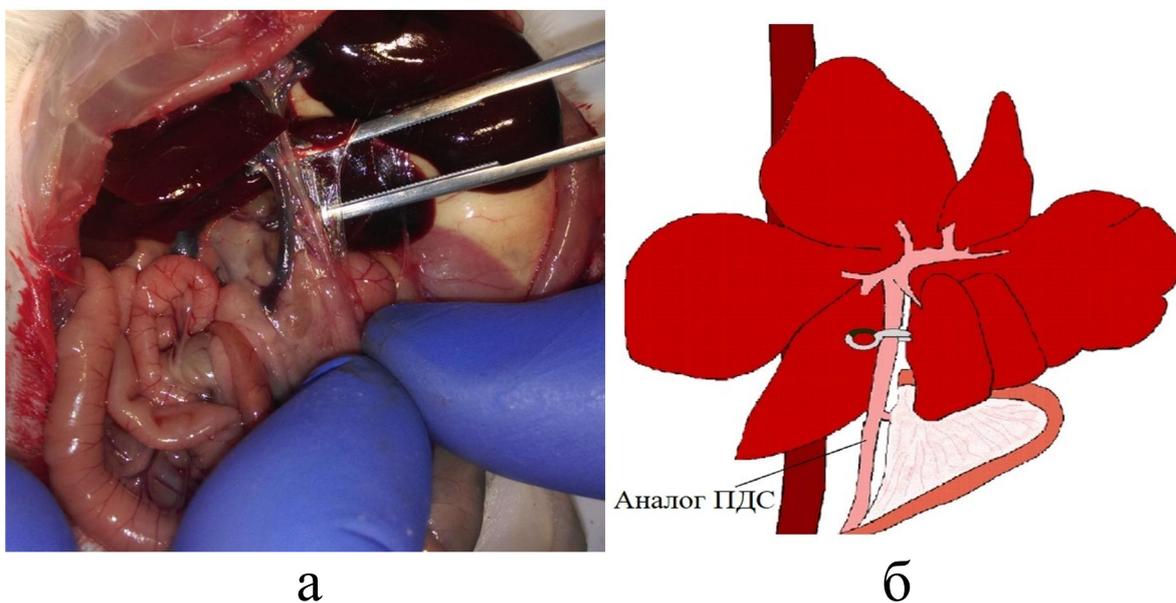
#### **2.1. Общие принципы постановки эксперимента. Моделирование васкулярной эксклюзии печени**

Экспериментальное исследование проведено на 292 беспородных крысах-самцах массой 225-265 г, содержащихся в условиях вивария ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России в стандартной экспериментальной биологически чистой комнате при температуре 22-24 °С и освещении 12 ч/12 ч – светлый/темный цикл в клетках площадью 0,6 м<sup>2</sup>, не более 4 самцов в каждой. Все исследования проводили в одно и то же время суток в первой половине дня с соблюдением принципов, изложенных в «Конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986), «Международных рекомендациях по проведению медико-биологических исследований с использованием лабораторных животных» [Р.У. Хабриев, 2005] и приказе МЗ РФ № 267 от 19.06.2003 г. «Об утверждении правил лабораторной практики». Проведение экспериментальных работ одобрено Локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России (протокол № 51 от 23.05.2017 г.).

В исследовании проводилось изучение гепатопротекторных свойств ингибитора киназы ПДГ ДХА в условиях превентивной сосудистой изоляции печени. ДХА вводился интраперитонеально в дозировке 300 мг на 1 кг массы тела животного, предварительно разведенный в 0,5 мл изотонического раствора NaCl, непосредственно в момент выключения печени из системного кровообращения.

Васкулярную эксклюзию печени воспроизводили путем наложения сосудистого зажима типа «Бульдог» на аналог ПДС крыс [M. Mendes-Braz et al.,

2012; Б.К. Шуркалин, В.А. Горский, А.П. Фаллер, 2010] на 10, 15 и 20 минут с последующим 15-минутным периодом реперфузии и выведением животного из эксперимента в результате забора печени (рисунок 2.1).



**Рисунок 2.1** – Гепатодуоденальная зона крыс: а – интраоперационное фото, б – схема моделирования васкулярной эксклюзии печени у экспериментальных животных путем пережатия аналога печеночно-двенадцатиперстной связки

Дизайн основного этапа эксперимента включает (рисунок 2.2):

1. Контрольную группу (I) составили ложнооперированные крысы, которым производилась только лапаротомия и интраперитонеальное введение 0,5 мл физиологического раствора (n=22). У животных осуществлялся забор крови и участков печени для определения исходных биохимических показателей без проведения васкулярной эксклюзии печени и коррекции ее последствий.

2. Группу сравнения (II) составили крысы (n=19), которым производилась лапаротомия, интраперитонеальное введение 0,5 мл физиологического раствора, васкулярная эксклюзия печени в течение 10 минут с последующим 15-минутным эпизодом реперфузии, но без коррекции ишемически-реперфузионного повреждения печени путем введения ДХА.

3. Группу сравнения (III) составили крысы (n=21), которым производилась лапаротомия, интраперитонеальное введение 0,5 мл

физиологического раствора, васкулярная эксклюзия печени в течение 15 минут с последующим 15-минутным эпизодом реперфузии, но без коррекции ишемически-реперфузионного повреждения печени путем введения ДХА.

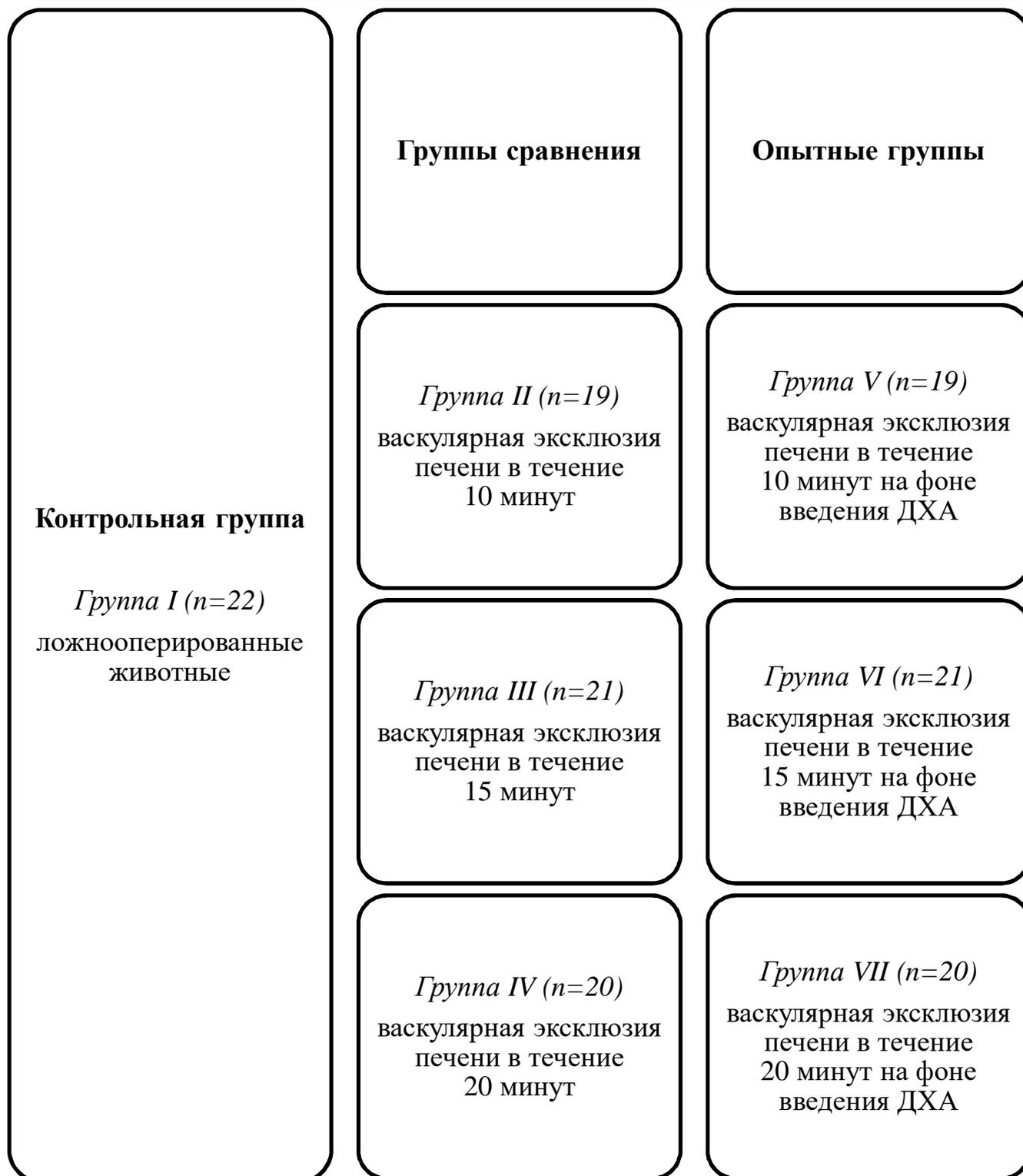
4. Группу сравнения (IV) составили крысы (n=20), которым производилась лапаротомия, интраперитонеальное введение 0,5 мл физиологического раствора, васкулярная эксклюзия печени в течение 20 минут с последующим 15-минутным эпизодом реперфузии, но без коррекции ишемически-реперфузионного повреждения печени путем введения ДХА.

5. Опытную группу (V) составили животные (n=19), которым проводили лапаротомию, интраперитонеальное введение ДХА и васкулярную эксклюзию печени на 10 минут с последующим 15-минутным периодом реперфузии.

6. Опытную группу (VI) составили животные (n=21), которым проводили лапаротомию, интраперитонеальное введение ДХА и васкулярную эксклюзию печени на 15 минут с последующим 15-минутным периодом реперфузии.

7. Опытную группу (VII) составили животные (n=20), которым проводили лапаротомию, интраперитонеальное введение ДХА и васкулярную эксклюзию печени на 20 минут с последующим 15-минутным периодом реперфузии.

**Задействованные в эксперименте лабораторные животные –  
белые нелинейные крысы-самцы массой 230-260 г  
(n=142)**



**Рисунок 2.2 – Дизайн основного этапа эксперимента**

Протокол основного этапа экспериментального исследования включает разделы (рисунок 2.3):

- 1) лапаротомия (+/- интраперитонеальное введение ДХА);
- 2) моделирование частичной сосудистой изоляции печени путем пережатия аналога ПДС крыс на 10, 15 или 20 минут;
- 3) период реперфузии печени в течение 15 минут;
- 4) забор материала для исследований (кровь и участки печени) на 15 минуте реперфузии.



**Рисунок 2.3** – Протокол основного этапа экспериментального исследования

Кроме того, перед началом исследования проводилась оценка возможности использования различных дозировок и способов введения ДХА животным с целью метаболической профилактики ИРС при васкулярной эксклюзии печени.

По результатам этого этапа исследования и была выбрана оптимальная схема введения ДХА (интраперитонеально в дозировке 300 мг на 1 кг массы тела животного, предварительно разведенный в 0,5 мл изотонического раствора NaCl, непосредственно в момент выключения печени из системного кровообращения), которая использовалась в основной части эксперимента. Для этого было сформировано 16 групп белых крыс-самцов массой 225-260 г. Животные первых семи групп подготовительного этапа составляют часть аналогичных групп основного этапа экспериментального исследования (таблица 2.1).

**Таблица 2.1** – Дизайн подготовительного этапа экспериментального исследования

№ группы	Длительность сосудистой изоляции печени, минут	Дозировка ДХА, мг/кг массы тела	Путь введения	Кратность введения
1	–	–	–	–
2	10	–	–	–
3	15	–	–	–
4	20	–	–	–
5	10	300	внутрибрюшинный	1
6	15	300	внутрибрюшинный	1
7	20	300	внутрибрюшинный	1
8	10	80	внутрибрюшинный	1
9	15	80	внутрибрюшинный	1
10	20	80	внутрибрюшинный	1
11	10	50	пероральный	1
12	15	50	пероральный	1
13	20	50	пероральный	1
14	10	50	пероральный	6
15	15	50	пероральный	6
16	20	50	пероральный	6

1. Контрольную группу (К) составили ложнооперированные крысы (n=10), которым производилась только лапаротомия и интраперитонеальное введение 0,5 мл физиологического раствора. У животных осуществлялся забор крови и участков печени для определения исходных биохимических показателей без проведения васкулярной эксклюзии печени и коррекции ее последствий.

2. Группу сравнения (10) составили крысы ( $n=10$ ), которым производилась лапаротомия, интраперитонеальное введение 0,5 мл физиологического раствора, васкулярная эксклюзия печени в течение 10 минут с последующим 15-минутным эпизодом реперфузии, но без коррекции ишемически-реперфузионного повреждения печени путем введения ДХА.

3. Группу сравнения (15) составили крысы ( $n=10$ ), которым производилась лапаротомия, интраперитонеальное введение 0,5 мл физиологического раствора, васкулярная эксклюзия печени в течение 15 минут с последующим 15-минутным эпизодом реперфузии, но без коррекции ишемически-реперфузионного повреждения печени путем введения ДХА.

4. Группу сравнения (20) составили крысы ( $n=10$ ), которым производилась лапаротомия, интраперитонеальное введение 0,5 мл физиологического раствора, васкулярная эксклюзия печени в течение 20 минут с последующим 15-минутным эпизодом реперфузии, но без коррекции ишемически-реперфузионного повреждения печени путем введения ДХА.

5. Опытную группу (10-300) составили животные ( $n=10$ ), которым проводили лапаротомию, интраперитонеальное введение ДХА в дозировке 300 мг/кг и васкулярную эксклюзию печени на 10 минут с последующим 15-минутным периодом реперфузии.

6. Опытную группу (15-300) составили животные ( $n=10$ ), которым проводили лапаротомию, интраперитонеальное введение ДХА в дозировке 300 мг/кг и васкулярную эксклюзию печени на 15 минут с последующим 15-минутным периодом реперфузии.

7. Опытную группу (20-300) составили животные ( $n=10$ ), которым проводили лапаротомию, интраперитонеальное введение ДХА в дозировке 300 мг/кг и васкулярную эксклюзию печени на 20 минут с последующим 15-минутным периодом реперфузии.

8. Опытную группу (10-80) составили животные ( $n=10$ ), которым проводили лапаротомию, интраперитонеальное введение ДХА в дозировке

80 мг/кг и васкулярную эксклюзию печени на 10 минут с последующим 15-минутным периодом реперфузии.

9. Опытную группу (15-80) составили животные (n=10), которым проводили лапаротомию, интраперитонеальное введение ДХА в дозировке 80 мг/кг и васкулярную эксклюзию печени на 15 минут с последующим 15-минутным периодом реперфузии.

10. Опытную группу (20-80) составили животные (n=10), которым проводили лапаротомию, интраперитонеальное введение ДХА в дозировке 80 мг/кг и васкулярную эксклюзию печени на 20 минут с последующим 15-минутным периодом реперфузии.

11. Опытную группу (10-50-1) составили животные (n=10), которые до эксперимента однократно с питьевой водой получали ДХА в дозировке 50 мг/кг массы тела. Через сутки проводили лапаротомию и васкулярную эксклюзию печени на протяжении 10 минут с последующим 15-минутным периодом реперфузии.

12. Опытную группу (15-50-1) составили животные (n=10), которые до эксперимента однократно с питьевой водой получали ДХА в дозировке 50 мг/кг массы тела. Через сутки проводили лапаротомию и васкулярную эксклюзию печени на протяжении 15 минут с последующим 15-минутным периодом реперфузии.

13. Опытную группу (20-50-1) составили животные (n=10), которые до эксперимента однократно с питьевой водой получали ДХА в дозировке 50 мг/кг массы тела. Через сутки проводили лапаротомию и васкулярную эксклюзию печени на протяжении 20 минут с последующим 15-минутным периодом реперфузии.

14. Опытную группу (10-50-6) составили животные (n=10), которые до эксперимента в течение шести дней ежедневно получали с питьевой водой ДХА в дозировке 50 мг/кг массы тела. На седьмые сутки проводили лапаротомию и васкулярную эксклюзию печени на 10 минут с последующим 15-минутным периодом реперфузии.

15. Опытную группу (15-50-6) составили животные (n=10), которые до эксперимента в течение шести дней ежедневно получали с питьевой водой ДХА в дозировке 50 мг/кг массы тела. На седьмые сутки проводили лапаротомию и васкулярную эксклюзию печени на 15 минут с последующим 15-минутным периодом реперфузии.

16. Опытную группу (20-50-6) составили животные (n=10), которые до эксперимента в течение шести дней ежедневно получали с питьевой водой ДХА в дозировке 50 мг/кг массы тела. На седьмые сутки проводили лапаротомию и васкулярную эксклюзию печени на 20 минут с последующим 15-минутным периодом реперфузии.

После определения наиболее оптимальной схемы введения ДХА с целью оценки безопасности его однократного интраперитонеального введения в дозировке 300 мг на 1 кг массы тела животного были сформированы следующие группы лабораторных крыс-самцов массой 225-265 г:

1. Контрольную группу ( $T_K$ ) составили крысы (n=15), которым однократно внутрибрюшинно вводили 0,5 мл изотонического раствора NaCl. У животных данной группы осуществлялся забор крови для определения биохимических показателей на следующие сутки после введения физиологического раствора.

2. Группу ( $T_1$ ) составили крысы (n=15), которым однократно внутрибрюшинно вводили ДХА в дозировке 300 мг на 1 кг массы тела животного, предварительно разведенный в 0,5 мл изотонического раствора NaCl. Забор крови для определения биохимических показателей осуществлялся через 1 сутки после введения раствора ДХА.

3. Группу сравнения ( $T_5$ ) составили крысы (n=15), которым однократно внутрибрюшинно вводили ДХА в дозировке 300 мг на 1 кг массы тела животного, предварительно разведенный в 0,5 мл изотонического раствора NaCl. Забор крови для определения биохимических показателей осуществлялся через 5 суток после введения раствора ДХА.

4. Группу сравнения ( $T_{15}$ ) составили крысы ( $n=15$ ), которым однократно внутрибрюшинно вводили ДХА в дозировке 300 мг на 1 кг массы тела животного, предварительно разведенный в 0,5 мл изотонического раствора NaCl. Забор крови для определения биохимических показателей осуществлялся через 15 суток после введения раствора ДХА.

Все манипуляции проводились под общим обезболиванием Золетилом 100 («Virbac», Франция) в дозировке 15 мг/кг внутримышечно.

Кровь отбирали из каудальной полой вены, в качестве антикоагулянта применялся гепарин, также для получения гомогената использовали печень животных. Для подготовки биоматериала к исследованию подвергали кровь центрифугированию в течение 10 минут при 2000g, после чего отбиралась плазма, а эритроцитарная масса трижды отмывалась физиологическим раствором.

Печень взвешивали для оценки ее относительной массы и подвергали гомогенизации (в среде следующего состава: 0,25 М сахараза, трис-HCl, pH 7,4) в соотношении 1 г ткани + 9,0 мл среды на гомогенизаторе (IKA ULTRA-TURRAX® T 18 digital, Германия). Гомогенат с целью удаления неразрушенных элементов ткани центрифугировался при 3000 об/мин в течение 10 минут, для дальнейших исследований отбирался супернатант.

## **2.2. Лабораторные методы исследования**

Для определения биохимических изменений, происходящих при васкулярной эксклюзии печени, а также для оценки эффективности их метаболической коррекции с использованием ДХА проводили определение маркеров цитолиза, показателей состояния прооксидантно-антиоксидантной системы и эндогенной интоксикации (таблица 2.2) в плазме крови, эритроцитарной массе и гомогенате печени. Для оценки токсичности ДХА при однократном внутрибрюшинном введении в дозировке 300 мг/кг массы тела животного в крови определяли маркеры цитолиза, содержание общего белка, мочевины, креатинина и показатели эндотоксикоза.

Таблица 2.2 – Дизайн лабораторных исследований

Лабораторные исследования	
Маркеры цитолиза	✓ активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ), аланинаминотрансферазы (АЛТ) и аспартатаминотрансферазы (АСТ);
Показатели состояния про-/антиоксидантной системы	✓ активность ферментов антиоксидантной защиты: супероксиддисмутазы (СОД), каталазы (КАТ), глутатионпероксидазы (ГПО), глутатионредуктазы (ГР); ✓ содержание тиоловых групп плазмы крови; ✓ концентрация восстановленного глутатиона (GSH); ✓ максимум вспышки хемилюминесценции (МВХЛ); ✓ площадь вспышки хемилюминесценции (ПХЛ); ✓ тиобарбитуровое число (ТБЧ);
Биохимические исследования	✓ концентрация общего белка плазмы крови; ✓ содержание веществ со средней и низкой молекулярными массами (ВСиНММ); ✓ концентрация мочевины; ✓ концентрация креатинина.

### 2.2.1. Методы определения активности маркеров цитолитического синдрома

Изучение активности ферментов-маркеров цитолитического синдрома (аланинаминотрансферазы, аспартатаминотрансферазы и лактатдегидрогеназы) проводили у животных всех групп в плазме крови.

#### *Методика определения активности трансаминаз*

В плазме крови определяли активность АЛТ и АСТ энзиматическим методом с использованием коммерческих наборов реагентов «Витал Девелопмент Корпорэйшн» (Санкт-Петербург, Россия). Количественный анализ показателей производили кинетическим фотометрическим методом при длине волны 340 нм, температуре инкубации 25 °С и длине оптического пути 10 мм.

Для определения активности АЛТ и АСТ в кювету вносили 500 мкл рабочего реагента и 50 мкл образца соответственно. Пробы тщательно перемешивали, инкубировали 60 секунд и измеряли оптическую плотность с повторением измерений 3 раза: через 1, 2 и 3 минуты. Далее вычисляли среднее изменение оптической плотности за 1 минуту ( $\Delta E/\text{мин}$ ) и определяли активность АЛТ, АСТ в плазме крови (А) в Ед/л по формуле:

$$A = \Delta E/\text{мин} \times F,$$

где:

F – фактор для расчета, значение которого при длине волны 340 нм составляет 1746.

#### *Методика определения активности лактатдегидрогеназы*

В плазме крови определяли активность ЛДГ энзиматическим методом с использованием коммерческих наборов реагентов «Витал Девелопмент Корпорэйшн» (Санкт-Петербург, Россия). Количественный анализ показателя производили кинетическим фотометрическим методом при длине волны 340 нм, температуре инкубации 25 °С и длине оптического пути 10 мм.

Для определения активности ЛДГ в кювету вносили 500 мкл рабочего реагента и 10 мкл образца соответственно. Пробы тщательно перемешивали, инкубировали 60 секунд и измеряли оптическую плотность с повторением измерений 3 раза: через 1, 2 и 3 минуты. Далее вычисляли среднее изменение оптической плотности за 1 минуту ( $\Delta E/\text{мин}$ ) и определяли активность ЛДГ в плазме крови (А) в Ед/л по формуле:

$$A = \Delta E/\text{мин} \times F,$$

где:

F – фактор для расчета, значение которого при длине волны 340 нм составляет 8095.

### **2.2.2. Методы определения показателей антиоксидантной защиты**

Изучение активности ферментативного звена АОС (каталазы, супероксиддисмутазы, глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы) проводили у животных в эритроцитарной взвеси и гомогенате печени. Функциональное состояние неферментативного звена АОС оценивалось по содержанию восстановленного глутатиона в эритроцитарной взвеси и гомогенате, а также тиоловых групп плазмы крови.

#### *Методика определения активности каталазы*

С целью оценки функционирования ферментного звена АОС определяли активность КАТ по методике, основанной на регистрации убыли перекиси

водорода при 260 нм при инкубации ее с биосубстратом. Об интенсивности утилизации  $H_2O_2$  судили по скорости снижения экстинкции реакционной смеси при длине волны 260 нм, на которой пероксид водорода имел максимум светопоглощения.

Для осуществления ферментативной реакции предварительно готовят гемолизат эритроцитов в соотношении эритроцитарная взвесь : дистиллированная вода 1:200 и гомогенат печени в разведении с дистиллированной водой в соотношении 1:100.

В ходе эксперимента к 2 мл 0,3% раствора  $H_2O_2$ , приготовленного на 0,1 М натрий-калиевом фосфатном буфере (рН 7,4), добавляли биосубстрат объемом 160 мкл и инкубировали при температуре 37 °С в течение 5 минут. Далее реакцию останавливали внесением в пробирки 50% раствора трихлоруксусной кислоты объемом 240 мкл. Параллельно с опытными пробами ставили контрольные, в которые 50% раствор трихлоруксусной кислоты вносили до добавления биосубстрата. После центрифугирования при 3000 оборотов в минуту на протяжении 10 минут супернатант из контрольных и опытных проб фотометрировали при длине волны 260 нм против 5% трихлоруксусной кислоты.

Разность в оптической плотности контрольной и опытной проб использовалась для расчета активности фермента, которую выражали в ммоль/(мин·л) [А.И. Карпищенко, 2002].

#### *Методика определения активности супероксиддисмутазы*

Активность СОД определяли по методике, основанной на регистрации степени торможения окисления кверцетина [В.А. Костюк, А.И. Потапович, Ж.В. Ковалева, 1990]. При этом реакция происходит при участии СОД в результате дисмутации супероксидного анион-радикала, образующегося при окислении кверцетина, инициируемого N,N,N<sub>1</sub>,N<sub>1</sub>-тетраметилэтилендиамином в присутствии кислорода.

Для осуществления ферментативной реакции предварительно готовят гемолизат эритроцитов в соотношении эритроцитарная взвесь : дистиллированная

вода 1:50 и гомогенат печени в разведении с дистиллированной водой в соотношении 1:100.

В ходе эксперимента спектрофотометрически определялась разница экстинкций растворов опытных и контрольных проб при длине волны 406 нм с внесенным биосубстратом и без его внесения после активации реакции аутоокисления кверцетина.

Степень ингибирования окисления кверцетина за 15 минут определялась по разнице оптических плотностей контрольной и опытной проб. Активность энзима выражали в % ингибирования (%ing).

#### *Методика определения активности глутатионпероксидазы*

С целью оценки функционирования тиолового звена АОС в эритроцитарной взвеси и гомогенате печени определяли активность ГПО по методике, основанной на измерении степени снижения концентрации глутатиона при нейтрализации гидроперекиси трет-бутила. Активность фермента определяли по изменению содержания восстановленного глутатиона в пробах до и после инкубации с модельным субстратом в «цветной» реакции с 5,5'-дитио-бис(2-нитробензойной кислотой).

Для осуществления ферментативной реакции предварительно готовят гемолизат эритроцитов в соотношении эритроцитарная взвесь : дистиллированная вода 1:200 и гомогенат печени в соотношении 1:100 с дистиллированной водой.

Для постановки эксперимента в 0,73 мл сложного буфера вносили 200 мкл биосубстрата и инкубировали на протяжении 10 минут при температуре 37 °С. Реакцию инициировали внесением в реакционную систему 70 мкл 0,14% раствора гидроперекиси трет-бутила. Строго по окончании инкубации (в течение 5 минут при температуре 37 °С) реакцию останавливали добавлением 200 мкл 20% трихлоруксусной кислоты. При этом в контрольные пробы раствор гидроперекиси трет-бутила вносили после осаждения белка трихлоруксусной кислотой. После завершения центрифугирования проб при 3000 оборотов в минуту в течение 10 минут для определения восстановленной формы глутатиона в 2,65 мл трис-НСl буфера (рН 8,5), содержащего 0,01% ЭДТА, вносили 100 мкл супернатанта и

25 мкл раствора Элмана. Далее пробы перемешивали и фотометрировали при длине волны 412 нм и длине оптического пути 10 мм против дистиллированной воды.

Активность ГПО в биосубстрате определяли по изменению содержания GSH в пробах до и после их инкубации с гидроперекисью трет-бутила. Энзиматическую активность выражали в мкмоль/(мин·л) [А.И. Карпищенко, 2002].

#### *Методика определения активности глутатионредуктазы*

Глутатионредуктазная активность определялась по измерению снижения содержания НАДФН при восстановлении окисленного глутатиона, интенсивность которого оценивалась по скорости уменьшения оптической плотности при длине волны 340 нм, при которой раствор НАДФН имеет максимальное светопоглощение.

Для проведения ферментативной реакции предварительно готовят гемолизат эритроцитов в соотношении эритроцитарная взвесь : дистиллированная вода 1:10 и гомогенат печени в таком же соотношении.

В ходе проведения эксперимента в кювету с длиной оптического пути 1 см, содержащую 1,8 мл 0,1 М калий-фосфатного буфера (рН 7,0) и 1 мМ ЭДТА с 0,1 мл раствора окисленного глутатиона, вносили 50 мкл биосубстрата. Реакцию инициировали внесением 100 мкл раствора НАДФН. Спустя 3 минуты проводили кинетическое определение экстинкции при длине волны 340 нм против воды. Энзиматическую активность выражали в мкмоль/(мин·л) [А.И. Карпищенко, 2002].

#### *Методика определения содержания восстановленного глутатиона*

Содержание восстановленного глутатиона определяли по реакции его с дитиобиснитробензойной кислотой после депротенинизации. Принцип метода основан на способности тиоловых группировок низкомолекулярных соединений в результате взаимодействия с дитиобиснитробензойной кислотой образовывать окрашенное соединение – тио-2-нитробензойную кислоту, водный раствор которой имеет максимальное светопоглощение при длине волны 412 нм.

Для проведения реакции предварительно готовят гемолизат эритроцитов в соотношении эритроцитарная взвесь : дистиллированная вода 1:10 и гомогенат печени в таком же соотношении.

В ходе эксперимента к 600 мкл биосубстрата добавляли 200 мкл 20% раствора сульфосалициловой кислоты и перемешивали пробы. После завершения центрифугирования при 3000 оборотов в минуту в течение 10 минут 200 мкл надосадочной жидкости вносили в пробирки с 2,55 мл 0,1 М трис-HCl буфера с 0,01% ЭДТА (pH 8,5). В полученную реакционную смесь добавляли 25 мкл реактива Элмана. Фотометрирование осуществляли после перемешивания проб против дистиллированной воды при длине волны 412 нм в кювете с длиной оптического пути 1 см.

Концентрация восстановленного глутатиона рассчитывалась при помощи калибровочного графика, для построения которого растворы коммерческого препарата GSH в концентрациях от 0,02 до 2 ммоль/л отрабатываются по описанной выше методике [L.S. Kolesnichenko et al., 2003].

#### *Методика определения содержания тиоловых групп в плазме крови*

Методика основана на способности SH-групп реагировать с 5,5'-дителибис(2-нитробензойной) кислотой с образованием интенсивно окрашенного тионитрофенильного аниона с максимумом поглощения при 412 нм. Количество образовавшегося тионитрофенильного аниона прямо пропорционально количеству свободных тиоловых групп [И.В. Веревкина, А.И. Точилкин, Н.А. Попова, 1977].

Ход определения: в кювету вносили 150 мкл плазмы крови и 10 мкл бидистиллированной воды, добавляли 1,5 мл 0,1 М натрий-калий-фосфатного буфера (pH 7,4), через 5 минут инкубации при 25 °С обнуляли спектрофотометр по приготовленной пробе опытного раствора в кювете с длиной оптического пути 10 мм, после чего впрыскивали 25 мкл метанольного реактива Элмана. Через 3 и 30 минут измеряли оптическую плотность проб на спектрофотометре при 412 нм, не останавливая реакцию. Аналогично выполняют определение экстинкции контрольного раствора 1 (та же самая реакционная смесь, но без добавления

реактива Элмана) и контрольного раствора 2 (реакционная смесь без добавления плазмы, но с реактивом Элмана) относительно 0,1 М фосфатного буфера.

Результат, выраженный в единицах оптической плотности, полученный через 30 минут инкубации, за вычетом контрольных растворов 1 и 2, соответствует суммарному содержанию SH-групп.

Содержание SH-групп определяли по формуле:

$$C (SH) = (A \times D) / (\epsilon \times B),$$

где:

A – оптическая плотность, соответствующая легко-/труднодоступным, или суммарным тиоловым группам;

D – разведение пробы плазмы крови;

$\epsilon$  – коэффициент молярной экстинкции тионитрофенильного аниона (11400);

B – концентрация общего белка плазмы крови.

### **2.2.3. Методы исследования интенсивности свободнорадикальных процессов**

Интенсивность СРП оценивали по содержанию продуктов, взаимодействующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-реактивные продукты, ТБК-РП), к которым, прежде всего, относятся малоновый диальдегид и диеновые конъюгаты – продукты перекисного окисления липидов. Также изучали параметры хемилюминесценции в плазме крови и гомогенате печени, суммарно отражающие активность окислительных процессов в биосреде.

#### *Методика определения содержания ТБК-реактивных продуктов*

Определение содержания базальных ТБК-РП осуществляли с помощью методики, основанной на взаимодействии продуктов окислительной модификации биомолекул, прежде всего, липидной природы, содержащихся в печени и эритроцитах, с тиобарбитуровой кислотой с образованием окрашенного комплекса. Интенсивность окраски оценивали при 450 нм и 532 нм – максимумах поглощения диеновых конъюгатов и малонового диальдегида соответственно [В.С. Камышников, 2009].

Для выполнения методики к 1,0 мл эритроцитарной взвеси или гомогената печени, разведенного в соотношении 1:10 дистиллированной водой, добавляли 1,0 мл 20% раствора трихлоруксусной кислоты, перемешивали стеклянной палочкой и через 10 минут инкубации при комнатной температуре центрифугировали при 2600g в течение 15 минут. Затем забирали 1,0 мл супернатанта и добавляли к нему 1,0 мл 0,8% раствора ТБК. Полученные пробы помещали в кипящую водяную баню на 15 минут. После кипячения пробы охлаждали под струей холодной воды. Одновременно с опытными ставили контрольную пробу, в которую вместо биожидкости вносили 1,0 мл дистиллированной воды. Далее измеряли оптическую плотность опытных проб против контрольной на длинах волн 450 нм и 532 нм в кювете с длиной оптического пути 10 мм.

Суммарное количество ТБК-РП при обеих длинах волн выражали как тиобарбитуровое число (ТБЧ). ТБЧ эритроцитов или печени рассчитывали по формуле:

$$\text{ТБЧ} = D_{450} + D_{532},$$

где:

$D_{450}$  и  $D_{532}$  – оптическая плотность опытного раствора после инкубации, измеренная при длинах волн 450 нм и 532 нм соответственно в единицах оптической плотности.

#### *Методика определения максимума и площади вспышки хемилюминесценции*

Исследование выполняли по методике, основанной на измерении максимума вспышки и площади люминол-зависимой  $\text{H}_2\text{O}_2$ -индуцированной хемилюминесценции на люминотестере LT-01 (НПО «Люмин», г. Ростов-на-Дону, РФ) с программным обеспечением [А.А. Басов, С.С. Джимаков, Н.И. Быкова, 2013; А.А. Басов и соавт., 2003]. Для выполнения методики к 2,9 мл трис-НСI буферного раствора (рН 6,8) с люминолом добавляли 100 мкл плазмы крови или гомогената печени, разведенного в соотношении 1:1000 дистиллированной водой, перемешивали и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 секунд. Затем инициировали реакцию впрыскиванием 50 мкл 3% раствора пероксида

водорода и измеряли МВХЛ и ПХЛ в течение 30 секунд. Полученные результаты сравнивали с показателями вспышки стандартного раствора люминола и выражали в условных единицах (усл. ед.) для МВХЛ и условных единицах площади (усл. ед. пл.) для ПХЛ.

#### **2.2.4. Методика определения концентрации веществ со средней и низкой молекулярными массами**

С целью оценки уровня эндогенной интоксикации определяли содержание ВСиНММ в плазме крови и эритроцитарной взвеси по методике М.Я. Малаховой [М.Я. Малахова, О.В. Зубаткина, В.В. Слепышева, 2011]. Для этого в ходе эксперимента в пробах с 1000 мкл плазмы, а также в пробах с 500 мкл эритроцитарной взвеси, предварительно доведенных до объема 1000 мкл добавлением изотонического раствора хлорида натрия, проводили депротеинизацию внесением 500 мкл 15% раствора трихлоруксусной кислоты. Пробы тщательно перемешивали и спустя 5 минут центрифугировали при 3000 оборотов в минуту в течение 10 минут, после чего отбирали 500 мкл супернатанта и после разведения в соотношении 1:9 дистиллированной водой фотометрировали в кювете с длиной оптического пути 10 мм против контрольной пробы, содержащей 0,5% раствор трихлоруксусной кислоты.

Спектр поглощения исследуемой пробы регистрировали в ультрафиолетовом спектре, начиная с длины волны 238 нм с интервалом 4 нм до 298 нм. Результат рассчитывали путем интегрального измерения площади фигуры, ограниченной осью абсцисс и спектрограммой по формуле:

$$\text{ВСиНММ}_{\text{бс}} = 4 \times (E_{238} + E_{242} + E_{246} + \dots + E_{298}),$$

где:

$\text{ВСиНММ}_{\text{бс}}$  – концентрация веществ со средней и низкой молекулярными массами в биосубстрате, выражаемая в относительных единицах (отн. ед.);

$E_{238-298}$  – значения экстинкций при длинах волн от 238 нм до 300 нм, измеряемые с интервалом 4 нм и выражаемые в единицах оптической плотности (е.о.п.).

### 2.2.5. Биохимические методы исследования содержания общего белка, мочевины и креатинина

*Определение содержания общего белка* проводили с помощью способа, основанного на регистрации интенсивности поглощения плазмой крови (1:99 с дистиллированной водой) света в ультрафиолетовой области при 260 нм и 280 нм.

Расчет концентрации общего белка проводили по формуле:

$$C = (1,45 \times D_{280} - 0,74 \times D_{260}) \times 100,$$

где:

C – концентрация общего белка, г/л;

$D_{280}$  – оптическая плотность раствора при 280 нм;

$D_{260}$  – оптическая плотность раствора при 260 нм;

1,45 и 0,74 – расчетные коэффициенты, 100 – разбавление плазмы крови.

#### *Методика определения концентрации мочевины*

В плазме крови определяли концентрацию мочевины энзиматическим методом с использованием коммерческих наборов реагентов «Витал Девелопмент Корпорэйшн» (Санкт-Петербург, Россия). Количественный анализ показателя проводили фотометрическим методом против холостой пробы при длине волны 540 нм, температуре инкубации 37 °С и длине оптического пути 10 мм.

Для определения концентрации мочевины в пробирку вносили 100 мкл реагента № 1 (раствор уреазы) и 10 мкл образца соответственно. Параллельно с опытными пробами ставили холостую и калибровочную, в которые вносили по 100 мкл реагента № 1, с добавлением в последнюю 10 мкл калибратора. Пробы тщательно перемешивали и инкубировали в течение 5 минут при 25 °С, после чего во все вносили по 1000 мкл фенол/нитропруссидного реагента (№ 3) и реагента № 4 (гипохлорит). После тщательного перемешивания и инкубации в течение 15 минут при 37 °С пробы охлаждали и измеряли оптическую плотность опытных ( $E_{оп}$ ) и калибровочной проб ( $E_{к}$ ) против холостой.

Далее вычисляли концентрацию мочевины в плазме крови (C) по формуле:

$$C = E_{оп}/E_{к} \times 5,0 \text{ ммоль/л},$$

где:

$E_{\text{оп}}$  – оптическая плотность опытной пробы, ед. опт. плотн.;

$E_{\text{к}}$  – оптическая плотность калибратора, ед. опт. плотн.;

5,0 – концентрация мочевины в калибраторе, ммоль/л.

#### *Методика определения концентрации креатинина*

В плазме крови определяли концентрацию креатинина энзиматическим методом с использованием коммерческих наборов реагентов «Витал Девелопмент Корпорэйшн» (Санкт-Петербург, Россия). Количественный анализ показателя проводили кинетическим фотометрическим методом против контроля на реактивы (рабочий реагент/вода=10/1) при длине волны 340 нм и температуре инкубации 37 °С.

Для определения концентрации креатинина в кювету вносили 500 мкл рабочего реагента и 50 мкл образца соответственно. Пробы тщательно перемешивали и через 120 секунд измеряли начальную экстинкцию. Ровно через 60 секунд проводили повторное измерение и вычисляли изменение экстинкции за одну минуту ( $\Delta E$ ). Аналогично обрабатывали разведенный в 100 раз калибратор.

Далее вычисляли концентрацию креатинина в плазме крови ( $C$ ) по формуле:

$$C = (\Delta E_{\text{пробы}} / \Delta E_{\text{кал}}) \times 177 \text{ мкмоль/л,}$$

где:

$\Delta E_{\text{пробы}}$  – изменение экстинкции пробы за 1 минуту;

$\Delta E_{\text{кал}}$  – изменение экстинкции калибратора за 1 минуту;

177 – концентрация креатинина в калибраторе, мкмоль/л.

### **2.3. Расчетные методы оценки**

#### *Расчет коэффициента соотношения КАТ/СОД*

С целью более углубленного исследования механизмов реализации антиоксидантной защиты и установления причин развития нарушений ее функционирования были изучены изменения соотношения активности КАТ и СОД эритроцитарной взвеси и гомогената печени.

Показатель КАТ/СОД рассчитывали по формуле:

$$\text{КАТ/СОД} = (\text{КАТ}_1 / \text{КАТ}_к) / (\text{СОД}_1 / \text{СОД}_к),$$

где:

КАТ/СОД – интегральный коэффициент функционирования ферментов антиоксидантной защиты;

КАТ<sub>1</sub> – активность каталазы эритроцитов или гомогената печени испытуемого животного;

СОД<sub>1</sub> – активность супероксиддисмутазы эритроцитов или гомогената печени испытуемого животного;

КАТ<sub>к</sub> – среднее значение активности каталазы контрольной группы;

СОД<sub>к</sub> – среднее значение активности супероксиддисмутазы контрольной группы.

#### *Расчет относительной массы печени*

При заборе органов осуществляли взвешивание печени и с учетом массы тела животного, измеренной до проведения экспериментального исследования, вычисляли индекс ее относительной массы.

Относительная масса печени (в %) вычислялась по формуле:

$$S = m/M \times 100,$$

где:

m – масса печени лабораторного животного;

M – масса тела лабораторного животного.

## **2.4. Статистические методы исследования**

Полученные экспериментальные данные обрабатывали методами вариационной статистики [R.A. Fisher, 2006] с помощью программного обеспечения. Перед началом процедур статистической обработки массивы данных подвергались проверке нормальности распределения с помощью W-критерия Shapiro-Wilk. Учитывая характер распределения, отличный от нормального, данные были представлены в виде медианы (Me) и квартилей (p<sub>0,25</sub>/p<sub>0,75</sub>).

В связи с особенностями дизайна исследования для выявления статистических различий между группами применялся непараметрический U-

критерий Mann-Whitney (для независимых групп). Достоверными считались различия, при которых уровень доверительного интервала ( $p$ ) составлял более 95% ( $p < 0,05$ ).

## ГЛАВА 3

### РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

#### **3.1. Разработка оптимальной схемы введения дихлорацетата натрия с целью коррекции ишемически-реперфузионного синдрома при васкулярной эксклюзии печени**

В процессе работы в связи с отсутствием данных о применении ДХА в качестве митохондриального цитопротектора при острых гипоксических состояниях был проведен поиск оптимальных дозировок и путей его введения. Исследовались следующие схемы введения ДХА: 50 мг/кг вместе с питьевой водой однократно за один день до эксперимента, 50 мг/кг вместе с питьевой водой в течение 6 дней до эксперимента, 80 мг/кг интраперитонеально непосредственно перед экспериментом и 300 мг/кг интраперитонеально непосредственно перед экспериментом (таблица 3.1).

В результате проведенных исследований было показано, что введение ДХА с питьевой водой в дозировке 50 мг/кг однократно за сутки до эксперимента (группы 11-13) не оказывало никакого влияния на активность классических маркеров цитолиза гепатоцитов – АЛТ и АСТ. Точно так же никакого эффекта, по данным активности аминотрансфераз в плазме крови, не имело однократное введение ДХА интраперитонеально в дозировке 80 мг/кг непосредственно перед васкулярной эксклюзией печени (группы 8-10). Введение ДХА в течение 6 дней с питьевой водой в дозировке 50 мг/кг (группы 14-16) показало обнадеживающие результаты. Так, при 10-минутной сосудистой изоляции печени у крыс 14-й группы активность АЛТ и АСТ в плазме крови была ниже аналогичных показателей 2-й группы животных, не получавших метаболического корректора, на 29,2% и 21,5% соответственно. При 15-минутной васкулярной эксклюзии печени активность АЛТ и АСТ на фоне коррекции с использованием ДХА была ниже показателей 3-й группы сравнения на 32,7% и 34,4% соответственно.

**Таблица 3.1** – Влияние дихлорацетата натрия на активность маркеров цитолиза и лактатдегидрогеназы при васкулярной эксклюзии печени (Me (p0,25/p0,75))

Группы	ЛДГ, ед/л	АСТ, ед/л	АЛТ, ед/л
1 (К)	145,54 (107,35/173,18)	47,93 (41,69/52,54)	27,61 (20,52/30,20)
2 (10)	659,14 (550,55/712,43) <sup>1</sup>	86,81 (80,66/95,08) <sup>1</sup>	53,57 (48,00/60,45) <sup>1</sup>
3 (15)	1714,52 (1535,93/1947,22) <sup>1</sup>	130,07 (121,46/140,15) <sup>1</sup>	109,32 (102,20/115,71) <sup>1</sup>
4 (20)	1455,67 (1368,05/1537,45) <sup>1</sup>	118,67 (109,31/128,24) <sup>1</sup>	88,83 (73,57/92,10) <sup>1</sup>
5 (10-300)	435,57 (378,17/506,48) <sup>1,2</sup>	56,27 (51,03/64,40) <sup>1,2</sup>	31,59 (28,41/40,70) <sup>1,2</sup>
6 (15-300)	557,44 (468,39/631,08) <sup>1,3</sup>	85,15 (80,23/90,00) <sup>1,3</sup>	51,32 (42,34/59,19) <sup>1,3</sup>
7 (20-300)	714,26 (640,52/819,92) <sup>1,4</sup>	126,30 (115,40/137,53) <sup>1</sup>	106,55 (89,87/126,73) <sup>1,4</sup>
8 (10-80)	423,67 (348,80/457,38) <sup>1,2</sup>	91,22 (78,03/95,36) <sup>1</sup>	39,56 (34,20/49,33) <sup>1,2</sup>
9 (15-80)	1255,72 (1103,98/1304,27) <sup>1,3</sup>	128,55 (119,74/135,73) <sup>1</sup>	108,46 (100,07/112,50) <sup>1</sup>
10 (20-80)	773,26 (687,26/826,21) <sup>1,4</sup>	121,28 (107,99/130,39) <sup>1</sup>	78,27 (68,26/83,68) <sup>1</sup>
11 (10-50-1)	343,23 (295,47/429,88) <sup>1,2</sup>	86,37 (74,47/94,32) <sup>1</sup>	45,34 (37,94/53,23) <sup>1</sup>
12 (15-50-1)	1195,15 (1115,55/1245,73) <sup>1,3</sup>	129,63 (123,61/132,23) <sup>1</sup>	103,63 (99,26/114,50) <sup>1</sup>
13 (20-50-1)	773,64 (713,22/837,03) <sup>1,4</sup>	125,83 (115,68/130,26) <sup>1</sup>	69,13 (61,59/80,98) <sup>1</sup>
14 (10-50-6)	390,21 (358,45/445,08) <sup>1,2</sup>	68,14 (62,34/73,18) <sup>1,2</sup>	37,94 (34,70/41,21) <sup>1,2</sup>
15 (15-50-6)	734,20 (681,26/801,34) <sup>1,3</sup>	85,30 (79,24/88,32) <sup>1,3</sup>	73,54 (68,71/77,20) <sup>1,3</sup>
16 (20-50-6)	849,44 (785,09/910,55) <sup>1,4</sup>	117,07 (105,72/123,80) <sup>1</sup>	128,06 (115,10/132,22) <sup>1,4</sup>

*Примечание:* <sup>1</sup> – p<0,05 по отношению к группе 1, <sup>2</sup> – p<0,05 по отношению к группе 2, <sup>3</sup> – p<0,05 по отношению к группе 3, <sup>4</sup> – p<0,05 по отношению к группе 4.

Активность АСТ при 20-минутном выключении печени из системного кровообращения на фоне введения животным ДХА не отличалась от показателя крыс, не получавших корректора. В то же время активность АЛТ в плазме крови крыс 16-й группы даже превышала значения этого показателя у животных 4-й группы, однако следует заметить, что максимальные значения активности аминотрансфераз в группах сравнения регистрировались при 15-минутной сосудистой изоляции печени. Таким образом, использование ДХА при введении его в дозировке 50 мг/кг массы тела ежедневно в течение 6 дней с целью

метаболической коррекции ИРС позволяло отсрочить развитие цитолиза гепатоцитов на 5 минут.

Похожие результаты были получены и при введении ДХА интраперитонеально в дозировке 300 мг/кг (группы 5-7) непосредственно перед выключением печени из системного кровообращения. Так, при сосудистой изоляции печени в течение 10 минут активность АЛТ и АСТ на фоне введения ДХА в группе 5 была ниже значений 2-й группы сравнения на 41% и 35,2% соответственно. При 15-минутной васкулярной эксклюзии печени у крыс 6-й группы активность АЛТ и АСТ была ниже на 53,1% и 34,5% соответственно по сравнению с аналогичными показателями 3-й группы. У животных 7-й группы активность АСТ соответствовала значениям 4-й группы сравнения, а активность АЛТ была несколько выше, как и в 16-й группе.

Учитывая более выраженное снижение активности аминотрансфераз в плазме крови при введении ДХА интраперитонеально в дозировке 300 мг/кг, а также возможность выполнения данной манипуляции экстренно – непосредственно перед выполнением сосудистой изоляции печени и однократно, для дальнейших исследований была выбрана именно эта схема метаболической профилактики ИРС.

Необходимо также отметить, что первоначально в качестве маркера цитолиза рассматривалось определение активности ЛДГ в плазме крови, значения которой приведены в таблице 3.1. Анализируя значения этого параметра, можно заметить, что он существенно снижен во всех группах животных, получавших ДХА, по сравнению с группами 2-4. Однако это вряд ли зависит от интенсивности гепатоцитолита, так как данные не согласуются с показателями активности аминотрансфераз в плазме крови, а скорее всего, являются следствием конкурентного ингибирования ЛДГ структурным аналогом пирувата – дихлорацетатом. Поэтому этот показатель в дальнейшем как классический маркер цитолитического синдрома не рассматривался.

### 3.2. Оценка токсичности дихлорацетата натрия при его однократном введении интраперитонеально в дозировке 300 мг/кг массы тела

В связи с отсутствием данных в литературе о применении исследуемой схемы введения ДХА необходимо было оценить ее потенциальную токсичность. С этой целью были сформированы несколько групп крыс, которым вводили ДХА в дозировке 300 мг/кг массы тела однократно интраперитонеально, а также контрольная группа, которой внутрибрюшинно вводили физиологический раствор в том же объеме. Через 1, 5 и 15 суток у животных в плазме крови определяли активность АСТ, АЛТ, ЛДГ, концентрацию общего белка, креатинина, мочевины и содержание ВСиНММ в плазме крови и эритроцитарной взвеси (таблица 3.2).

**Таблица 3.2** – Влияние дихлорацетата натрия в дозировке 300 мг/кг массы тела крыс при его однократном интраперитонеальном введении на биохимические показатели крови (Ме (p0,25/p0,75))

Показатели	Группы			
	T <sub>к</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>5</sub>	T <sub>15</sub>
ЛДГ, ед/л	128,49 (115,26/141,35)	152,28 (124,55/169,67)	126,72 (120,97/136,46)	123,73 (114,05/129,42)
АСТ, ед/л	37,28 (33,64/41,92)	49,02 (38,60/52,77)	46,41 (42,20/53,60)	39,17 (35,93/41,74)
АЛТ, ед/л	19,51 (18,55/23,48)	27,08 (20,85/30,83)	29,57 (24,44/34,21)	24,61 (20,36/28,24)
Мочевина, ммоль/л	4,45 (3,88/4,81)	4,70 (4,37/4,99)	4,30 (3,84/4,68)	4,51 (4,10/4,85)
Креатинин, мкмоль/л	82,20 (64,05/91,32)	75,52 (55,07/89,16)	65,58 (55,98/76,51)	72,11 (62,03/80,33)
Общий белок, г/л	66,30 (64,20/68,95)	64,10 (61,75/66,50)	62,90 (61,10/67,60)	65,70 (64,00/68,00)
ВСиНММ <sub>пл</sub> , отн. ед.	5,51 (5,07/6,36)	5,80 (5,50/6,00)	7,11 (6,24/7,86)	5,57 (5,00/6,02)
ВСиНММ <sub>эр</sub> , отн. ед.	18,10 (16,97/19,69)	18,24 (17,28/19,32)	15,85 (15,05/16,48)	17,39 (16,65/17,92)

*Примечание:* эр – в эритроцитах, пл – в плазме крови.

По результатам определения исследуемых показателей было установлено, что существенных изменений обмена веществ в организме крыс при однократном введении ДХА по предложенной нами схеме не происходит (таблица 3.2). Так, ни один из изученных биохимических показателей крови лабораторных животных, подвергшихся введению ДХА, не отличался от соответствующих значений показателей контрольной группы  $T_k$ .

### **3.3. Оценка гепатопротекторных свойств и механизмов действия дихлорацетата натрия на экспериментальной модели васкулярной эксклюзии печени**

С целью оценки эффективности применения ДХА в качестве цитопротектора в условиях сосудистой изоляции печени была определена активность классических маркеров цитолиза гепатоцитов в плазме крови (таблица 3.3). Полученные данные свидетельствуют о развитии и нарастании цитолитического синдрома у животных в группах с сосудистой изоляцией печени без коррекции (группы сравнения, II-IV). Так, у крыс, подвергшихся 10-минутному выключению печени из системного кровообращения, активность ЛДГ возрастала в 4,1 раза, при 15-минутной сосудистой изоляции печени этот показатель увеличивался уже в 12,2 раза по сравнению с аналогичным в контрольной группе. Дальнейшего увеличения активности ЛДГ в плазме крови при 20-минутной сосудистой изоляции печени не наблюдалось по сравнению с III-й группой. Активность АЛТ и АСТ изменялась схожим образом друг с другом и с активностью ЛДГ. Так, при выключении печени из системного кровообращения на 10 минут наблюдалось увеличение активности АЛТ в 2,3 раза и АСТ в 2,0 раза по сравнению с аналогичными параметрами контрольной группы. Васкулярная эксклюзия печени продолжительностью 15 минут сопровождалась дальнейшим увеличением выброса ферментов гепатоцитов в кровь с возрастанием активности АЛТ в 4,4 раза и в меньшей степени АСТ – в 3,0 раза. Пережатие аналога ПДС у крыс на 20 минут не сопровождалось дальнейшим увеличением активности АЛТ и АСТ по сравнению с III-й группой.

**Таблица 3.3** – Влияние дихлорацетата натрия на активность маркеров цитолиза и лактатдегидрогеназы при васкулярной эксклюзии печени (Me (p0,25/p0,75))

Группы	ЛДГ, ед/л	АСТ, ед/л	АЛТ, ед/л
I (К)	152,34 (99,24/167,47)	44,64 (42,89/51,93)	23,51 (18,41/25,52)
II (10')	622,4 (560,25/700,34) <sup>1</sup>	89,77 (79,59/95,98) <sup>1</sup>	54,29 (48,91/59,79) <sup>1</sup>
III (15')	1856,82 (1365,92/1956,12) <sup>1</sup>	133,07 (118,46/139,97) <sup>1</sup>	104,08 (99,29/118,39) <sup>1</sup>
IV (20')	1429,94 (1198,25/1588,76) <sup>1</sup>	115,68 (108,42/128,05) <sup>1</sup>	65,37 (60,77/78,15) <sup>1</sup>
V (10'ДХА)	445,43 (398,67/476,6) <sup>1,2</sup>	59,36 (53,42/64,83) <sup>1,2</sup>	31,16 (29,01/41,12) <sup>1,2</sup>
VI (15'ДХА)	583,64 (499,4/611,88) <sup>1,3</sup>	87,99 (84,02/90,74) <sup>1,3</sup>	49,88 (37,66/76,73) <sup>1,3</sup>
VII (20'ДХА)	702,66 (636,72/888,54) <sup>1,4</sup>	126,97 (111,24/144,76) <sup>1</sup>	110,64 (102,38/117,74) <sup>1,4</sup>

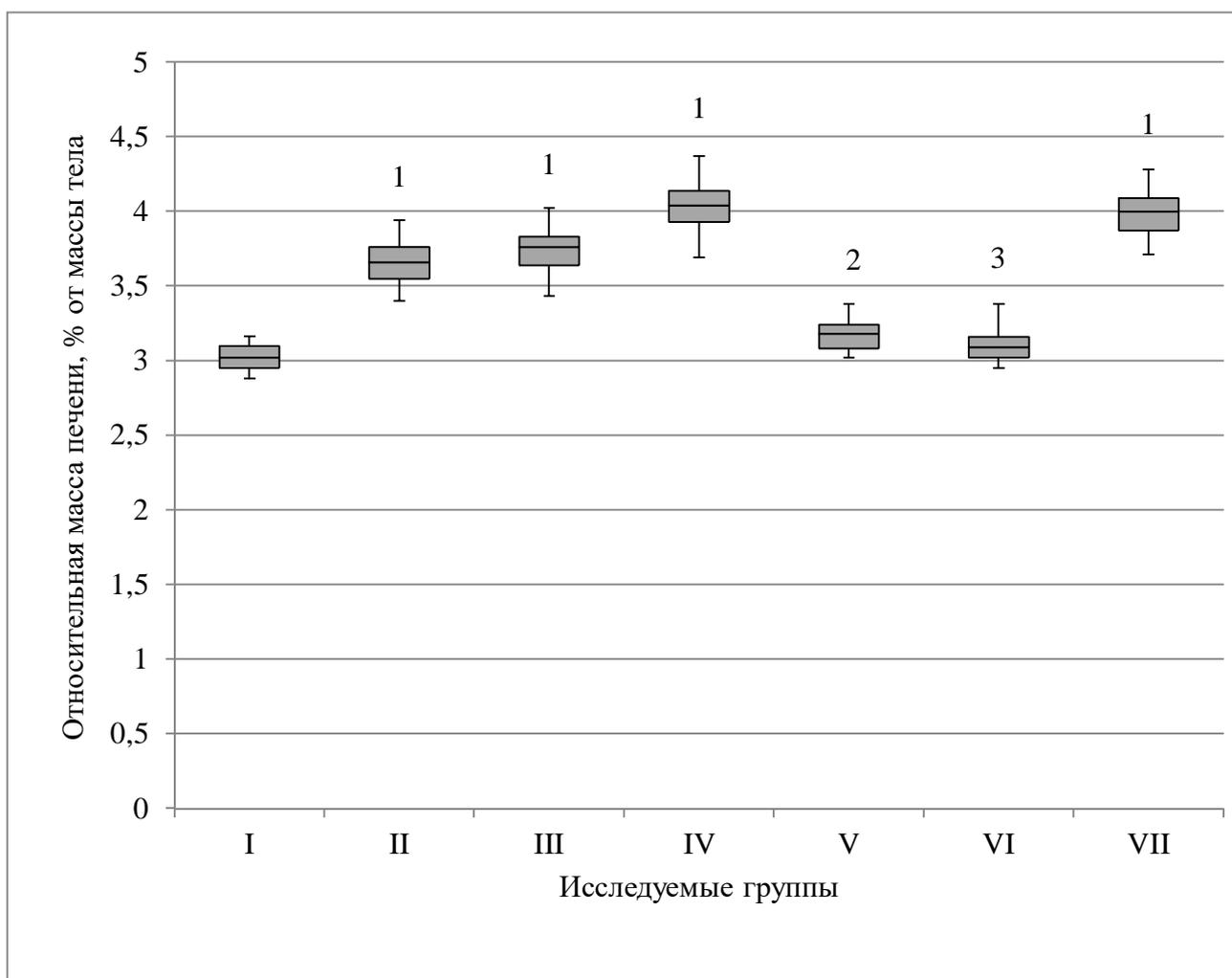
*Примечание:* <sup>1</sup> – p<0,05 по отношению к группе I, <sup>2</sup> – p<0,05 по отношению к группе II, <sup>3</sup> – p<0,05 по отношению к группе III, <sup>4</sup> – p<0,05 по отношению к группе IV.

Введение ДХА перед пережатием ПДС приводило к значительному снижению выраженности цитолитического синдрома (таблица 3.3, группы V-VII). Так, активность ЛДГ при пережатии ПДС на 10, 15 или 20 минут увеличивалась всего в 2,9-4,6 раза по сравнению со значением аналогичного показателя контрольной группы. Сопоставление результатов основных опытных групп с показателями соответствующих им по продолжительности васкулярной эксклюзии печени групп сравнения показало более низкие значения активности ЛДГ при введении животным ДХА. Так, этот показатель в группе V был ниже в 1,4 раза аналогичного во II-й группе. В остальных группах разница была еще более существенной. Активность ЛДГ плазмы крови в VI-й группе была в 3,2 раза ниже по сравнению со значением показателя III-й группы, а в VII-й группе соответственно ниже показателя IV-й группы в 2,0 раза.

Активность АЛТ возрастала в V-й группе по сравнению с контролем на 32,5%, но была ниже показателя II-й группы сравнения на 42,6%. Активность АСТ на фоне 10-минутного пережатия ПДС при введении ДХА увеличивалась по сравнению с контрольной группой на 33,0% и была ниже показателя группы, соответствующей по длительности сосудистой изоляции печени без

метаболической коррекции, на 33,9%. При васкулярной эксклюзии печени продолжительностью 15 минут наблюдался дальнейший рост активности АЛТ и АСТ по сравнению с контролем в 2,1 и 2,0 раза соответственно. Однако показатели VI-й группы были все же ниже аналогичных III-й группы животных, не получавших коррекции. Так, активность АЛТ и АСТ в плазме крови животных VI-й группы была на 52,1% и 33,9% ниже значений соответствующих показателей крыс III-й группы. Животные VII-й группы характеризовались повышенной активностью АЛТ и АСТ по сравнению с контролем в 4,7 и 2,8 раза соответственно.

Относительная масса печени у крыс групп сравнения достоверно увеличивалась при пережатии гепатодуоденальной связки (рисунок 3.1), что в данном случае связано с отеком органа, однако также косвенно подтверждает развитие и усугубление морфофункциональных изменений паренхимы печени в результате более продолжительной ее васкулярной эксклюзии. Так, в группах II-III отмечался рост этого показателя в 1,2-1,3 раз, а в группе IV – в 1,4 раза соответственно в сравнении со значением данного показателя контрольной группы. Однако при использовании ДХА для метаболической коррекции ишемически-реперфузионных нарушений в группах животных с 10- и 15-минутными эпизодами васкулярной эксклюзии значения относительной массы печени были близки к таковым в контрольной группе и ниже соответствующих показателей в группах сравнения в 1,2 раза. Полученные результаты можно объяснить развитием менее выраженных застойных явлений, внутриклеточного и интерстициального отека печени при применении метаболической коррекции. В то же время значения этого показателя опытной группы VII статистически значимо не отличались от таковых у животных IV-й группы. Возможно, васкулярная эксклюзия печени продолжительностью 20 минут является достаточно сильным повреждающим фактором, при действии которого эффекты метаболической коррекции становятся все менее заметными.



**Рисунок 3.1** – Изменение относительной массы печени при коррекции ишемически-реперфузионных нарушений в условиях васкулярной эксклюзии печени (min; p0,25; Me; p0,75; max)

*Примечание:* <sup>1</sup> – p<0,05 по отношению к группе I, <sup>2</sup> – p<0,05 по отношению к группе II, <sup>3</sup> – p<0,05 по отношению к группе III.

С целью раскрытия механизмов воздействия ДХА на клеточный метаболизм в условиях развития ишемически-реперфузионного повреждения печени было изучено функциональное состояние прооксидантно-антиоксидантной системы. Одним из наиболее чувствительных компонентов АОС является тиоловое звено, включающее глутатион, другие тиолсодержащие белки и низкомолекулярные компоненты, а также ферменты их метаболизма.

Результаты исследований тиолового обмена демонстрируют достаточно обширную картину происходящих изменений (таблица 3.4). Так, в группах без

использования ДХА в качестве метаболического протектора активность ГПО и ГР изменялась однонаправленно. К 10 минуте сосудистой изоляции печени в эритроцитах происходило увеличение активности обоих ферментов (ГПО на 74,0%, ГР на 15,2%) с последующим уменьшением в группе III до контрольных значений, а в группе IV ниже их (ГПО на 31%, ГР на 44,9%). Концентрация восстановленного глутатиона поддерживалась на исходном уровне до 10 минут частичной сосудистой изоляции печени с последующим снижением в 1,5 раза к 15-20 минутам.

**Таблица 3.4** – Влияние дихлорацетата натрия на систему глутатиона при васкулярной эксклюзии печени (Me (p0,25/p0,75))

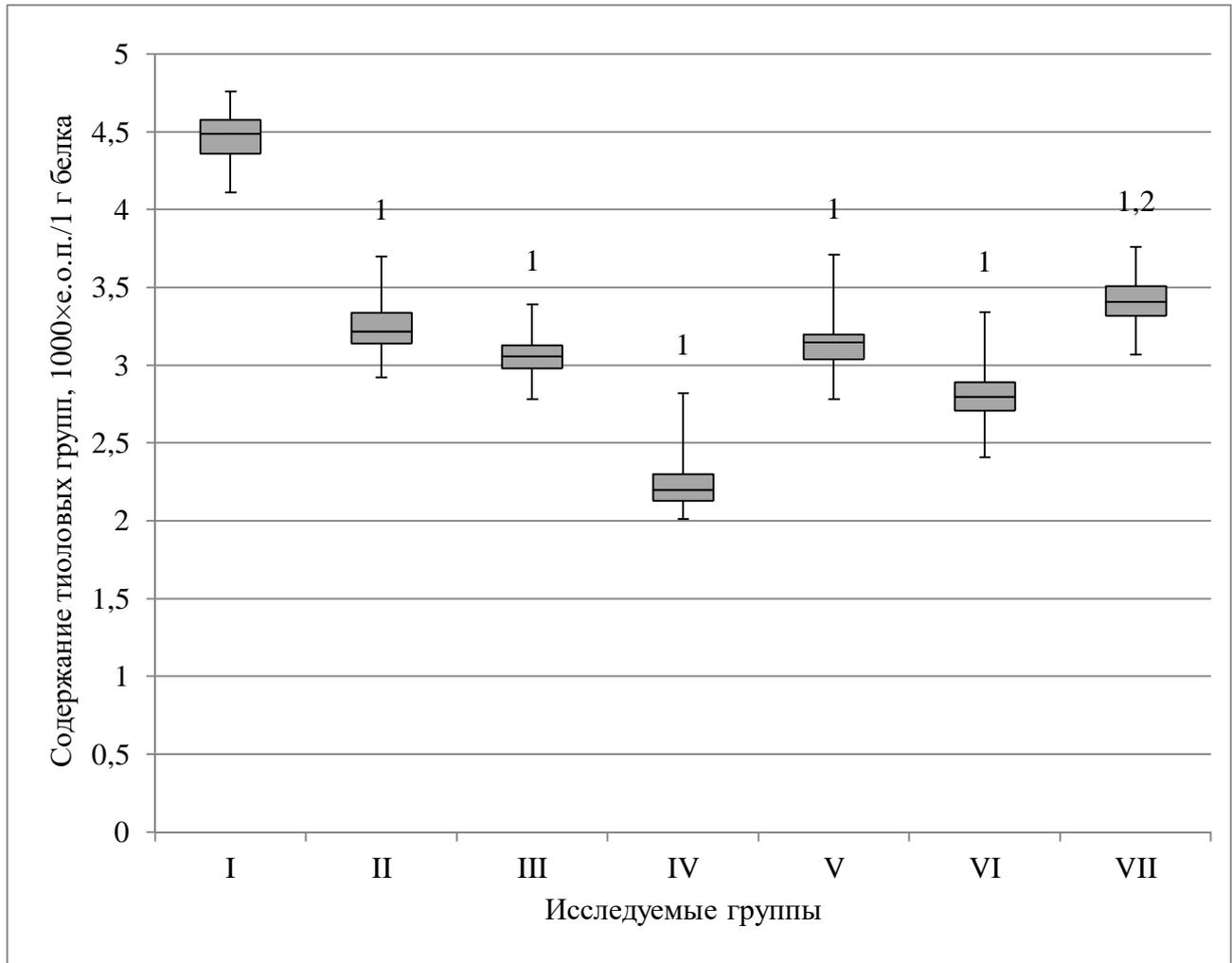
Группы	Биоматериал	ГПО, мкмоль/(мин·л)	ГР, мкмоль/(мин·л)	GSH, мкмоль/мл
I (К)	эритроциты	49,68 (43,95/56,49)	742,23 (600,36/802,34)	2,76 (2,66/2,85)
	гомогенат	15,48 (13,47/17,41)	4169,2 (4031,2/4429,8)	3,37 (2,99/3,48)
II (10')	эритроциты	86,45 (78,4/91,45) <sup>1</sup>	854,8 (800,11/966,12) <sup>1</sup>	2,76 (2,61/2,85)
	гомогенат	20,55 (19,8/20,99) <sup>1</sup>	5172,1 (4871,4/5498,3) <sup>1</sup>	3,24 (2,97/3,34)
III (15')	эритроциты	44,07 (40,33/45,66)	702,56 (608,49/750,01)	1,97 (1,91/2,08) <sup>1</sup>
	гомогенат	19,03 (18,23/21,34) <sup>1</sup>	3225,04 (3130,22/3346,16) <sup>1</sup>	2,38 (2,32/2,45) <sup>1</sup>
IV (20')	эритроциты	34,27 (31,11/40,41) <sup>1</sup>	408,95 (324,28/453,11) <sup>1</sup>	1,82 (1,75/1,93) <sup>1</sup>
	гомогенат	15,19 (14,04/15,76)	3398,6 (3150,77/3502,96) <sup>1</sup>	2,64 (2,56/2,75) <sup>1</sup>
V (10'ДХА)	эритроциты	38,84 (36,24/44,56) <sup>1,2</sup>	818,42 (794,87/844,89)	2,75 (2,66/2,99)
	гомогенат	33,91 (26,63/37,84) <sup>1,2</sup>	3417,33 (3362,19/3580,87) <sup>1,2</sup>	2,36 (2,29/2,43) <sup>1,2</sup>
VI (15'ДХА)	эритроциты	42,22 (38,5/48,94) <sup>1</sup>	686,58 (616,34/723,97)	2,71 (2,53/2,83) <sup>3</sup>
	гомогенат	43,75 (39,7/46,22) <sup>1,3</sup>	2817,48 (2201,33/3499,94) <sup>1</sup>	2,46 (2,39/2,58) <sup>1</sup>
VII (20'ДХА)	эритроциты	37,71 (36,43/38,47) <sup>1</sup>	797,19 (708,46/880,89) <sup>4</sup>	3,01 (2,87/3,21) <sup>4</sup>
	гомогенат	26,19 (21,67/27,13) <sup>1,4</sup>	4909,17 (4761,29/5156,45) <sup>1,4</sup>	2,25 (2,18/2,41) <sup>1,4</sup>

*Примечание:* <sup>1</sup> – p<0,05 по отношению к группе I, <sup>2</sup> – p<0,05 по отношению к группе II, <sup>3</sup> – p<0,05 по отношению к группе III, <sup>4</sup> – p<0,05 по отношению к группе IV.

В ткани печени крыс, подвергшихся моделированию васкулярной эксклюзии печени без метаболической коррекции, наблюдали похожие изменения активности ферментов тиолового метаболизма и содержания GSH. Так, к 10 минуте сосудистой изоляции печени наблюдалось возрастание активности ГПО на 32,8% и ГР на 24%, а затем снижение. Активность ГПО при этом уменьшалась до значения контрольной группы, а ГР – ниже контрольной на 18,5-22,6% в группах III и IV. Концентрация глутатиона в гомогенате печени сохранялась на уровне контрольной в течение 10 минут васкулярной эксклюзии, как и в эритроцитарной взвеси, а затем снижалась на 21,7-29,4% к 15-20 минутам сосудистой изоляции печени.

Введение крысам ДХА перед пережатием ПДС способствовало поддержанию адекватного функционирования изученных показателей метаболизма глутатиона (таблица 3.4). Активность ГР эритроцитарной взвеси в группах V и VII существенно не изменялась и превышала контрольные значения на 7,4-10,3%, а ГПО немного снижалась в группах V-VII – на 15-24% в сравнении с контрольной группой. Содержание восстановленного глутатиона в эритроцитах поддерживалось на нормальном уровне у крыс всех опытных групп, при этом было выше значений групп сравнения, животные которых подвергались 15-20-минутным пережатиям ПДС (на 37,6% в группе VI по сравнению с III-й группой, на 65,4% в группе VII по сравнению с IV-й группой). Более выраженные изменения тиолового метаболизма при васкулярной эксклюзии печени с метаболической коррекцией ДХА наблюдались в гомогенате печени. Активность ГПО значительно возрастала по сравнению с аналогичным показателем контрольной группы: в 2,2 раза в группе V, в 2,8 раза в группе VI и в 1,7 раза в группе VII. Активность ГР, наоборот, снижалась в группах V и VI на 18,0% и 32,4% соответственно, однако, в группе VII резко возрастала – на 17,8% в сравнении с группой I. Содержание глутатиона в печени снижалось уже в группе V – на 30%, оставаясь на этом уровне при увеличении продолжительности сосудистой изоляции печени.

Содержание общих тиоловых групп в плазме крови, представленных в основном белковыми SH-группами, снижалось по сравнению с контрольными значениями во всех изученных группах (рисунок 3.2). Причем в соответствующих по длительности ишемии основной опытной группе и группе сравнения наблюдались похожие изменения, кроме групп с 20-минутной васкулярной эксклюзией печени.



**Рисунок 3.2** – Содержание тиоловых групп в плазме крови при коррекции ишемически-реперфузионных нарушений в условиях васкулярной эксклюзии печени (min; p0,25; Me; p0,75; max)

*Примечание:* <sup>1</sup> – p<0,05 по отношению к группе I, <sup>2</sup> – p<0,05 по отношению к группе IV.

Так, в группах II и V отмечалось снижение уровня тиоловых групп плазмы крови на 28,3-30,3%, в группах III и VI – на 32,3-38,1% по сравнению с контрольной группой. В группе IV наблюдалось дальнейшее снижение

содержания SH-групп на 51,5% по сравнению с аналогичным показателем контрольной группы, тогда как при использовании ДХА в группе VII снижение на 24,5% соответствовало уровню 10-15-минутной ишемии. Такие результаты демонстрируют повышение функциональной активности АОС крови при использовании ДХА в условиях ишемии-реперфузии печени и являются отражением усиления ферментного звена АРЗ, нейтрализующего свободные радикалы и реактивные молекулы, а также поддерживающего концентрацию неферментных антиоксидантов на достаточном уровне [N.I. Vykova et al., 2016; А.А. Басов, С.С. Джимаков, Н.И. Быкова, 2013].

Для оценки изменений первых двух линий ферментного звена АОС проводили определение активности СОД и КАТ в эритроцитах и гомогенате печени. В эритроцитах групп сравнения активность КАТ имела тенденцию к снижению (таблица 3.5). Так, в группах II и III у животных, подвергавшихся 10- и 15-минутному пережатию ПДС, снижение относительно контрольной группы составляло до 12,0%, а в группе IV, с 20-минутной сосудистой изоляцией печени без коррекции, – 29,6%.

**Таблица 3.5** – Показатели функционирования антиоксидантной системы крови при васкулярной эксклюзии печени (Me (p0,25/p0,75))

Группы	КАТ, ммоль/(мин·л)	СОД, %ing
I (К)	26698 (24970,5/29877,5)	45,74 (43,93/47,51)
II (10')	23500 (20550,5/24819,5) <sup>1</sup>	38,1 (36,35/40,45) <sup>1</sup>
III (15')	24659 (23224,5/27150)	33,3 (31,65/35,85) <sup>1</sup>
IV (20')	18808 (17927,5/20277,5) <sup>1</sup>	52,3 (50,5/54,3)
V (10'ДХА)	32759 (31960/33283,5) <sup>1,2</sup>	54,48 (51,84/57,75) <sup>1,2</sup>
VI (15'ДХА)	29078 (27382,5/29815) <sup>3</sup>	57,11 (54,16/59,61) <sup>1,3</sup>
VII (20'ДХА)	43483 (41879/44437) <sup>1,4</sup>	50,76 (49,01/52,74)

*Примечание:* <sup>1</sup> – p<0,05 по отношению к группе I, <sup>2</sup> – p<0,05 по отношению к группе II, <sup>3</sup> – p<0,05 по отношению к группе III, <sup>4</sup> – p<0,05 по отношению к группе IV.

Применение ДХА, наоборот, способствовало увеличению активности КАТ на 22,7% и 62,9% в V-й и VII-й группах соответственно. Активность СОД в

эритроцитах имела ту же тенденцию – снижение в группах II и III на 16,7% и 27,2%, но возрастание в группах V и VI, животным которых вводился ДХА, на 19,1% и 24,9%. Полученные данные отражают усиление компенсаторных возможностей ферментов АОС крови при воздействии ДХА, что может являться одним из механизмов его цитопротективного эффекта.

В гомогенате печени активность КАТ снижалась как в группах сравнения, так и в основных опытных группах с коррекцией ДХА (таблица 3.6). Однако если в группах II-IV это происходило уже при 10-минутной васкулярной эксклюзии печени, то в группах V-VII снижение наблюдалось, начиная только с 15 минут ишемии. В группах II-IV каталазная активность в среднем снижалась на 15,6-18,3%, в группах VI-VII снижение активности составляло 16,1-32,0%.

**Таблица 3.6** – Показатели функционирования антиоксидантной системы печени при ее васкулярной эксклюзии (Me (p0,25/p0,75))

Группы	КАТ, ммоль/(мин·л)	СОД, %ing
I (К)	14808 (13901/15863)	48,7 (47,00/50,10)
II (10')	12492 (11519/13536,5) <sup>1</sup>	46,6 (45,25/48,55)
III (15')	12234 (10746/13372) <sup>1</sup>	44,98 (43,08/46,89)
IV (20')	12094 (11448/13110) <sup>1</sup>	51,8 (50,65/53,45)
V (10'ДХА)	14099 (13279/15275) <sup>2</sup>	56,27 (54,01/58,22) <sup>1,2</sup>
VI (15'ДХА)	10073 (8073,5/11427) <sup>1</sup>	55,78 (53,35/58,12) <sup>1,3</sup>
VII (20'ДХА)	12423 (11398,5/13257) <sup>1</sup>	53,02 (51,22/55,28) <sup>1</sup>

*Примечание:* <sup>1</sup> – p<0,05 по отношению к группе I, <sup>2</sup> – p<0,05 по отношению к группе II, <sup>3</sup> – p<0,05 по отношению к группе III.

Активность СОД в группах II-IV не изменялась по сравнению с контрольной группой, а при метаболической коррекции с использованием ДХА отмечался небольшой рост ее активности на 8,9-15,5%. Таким образом, в гомогенате печени при введении ДХА происходят изменения, похожие на описанные выше в крови, направленные на повышение резистентности ткани к действию прооксидантных факторов на органном уровне [М.И. Вуков, А.А. Васов, 2015].

Для более объективного суждения об активности окислительного стресса и выраженности перекисного окисления биомолекул на местном и системном уровнях, кроме оценки функционального состояния АОС, необходимо изучение интенсивности СРП [А.А. Басов и соавт., 2016].

Исследование показателей интенсивности окислительных процессов на системном уровне, по данным накопления ТБК-РП, в группах без проведения метаболической профилактики ишемически-реперфузионных нарушений показало неуклонный рост их активности (таблица 3.7).

**Таблица 3.7** – Показатели интенсивности свободнорадикальных процессов в крови при васкулярной эксклюзии печени (Me (p0,25/p0,75))

Группы	ТБЧ <sub>эр</sub> , усл. ед.	МВХЛ <sub>пл</sub> , усл. ед.	ПХЛ <sub>пл</sub> , усл. ед. пл.
I (К)	13,2 (12,2/14,1)	0,27 (0,19/0,34)	1,08 (0,7/1,37)
II (10')	15,22 (14,75/15,74) <sup>1</sup>	0,57 (0,51/0,62) <sup>1</sup>	2,92 (2,55/3,26) <sup>1</sup>
III (15')	19,27 (18,29/20,05) <sup>1</sup>	0,48 (0,45/0,53) <sup>1</sup>	3,36 (2,9/3,92) <sup>1</sup>
IV (20')	18,6 (17,75/19,5) <sup>1</sup>	0,86 (0,81/0,90) <sup>1</sup>	3,49 (2,99/3,92) <sup>1</sup>
V (10'ДХА)	13,68 (13,07/14,49)	0,37 (0,31/0,44) <sup>1,2</sup>	2,12 (1,5/2,83) <sup>1,2</sup>
VI (15'ДХА)	14,03 (13,2/14,73) <sup>3</sup>	0,43 (0,34/0,5) <sup>1</sup>	2,37 (1,82/3,12) <sup>1,3</sup>
VII (20'ДХА)	15,26 (14,53/15,56) <sup>1,4</sup>	0,66 (0,6/0,73) <sup>1,4</sup>	3,07 (2,64/3,52) <sup>1</sup>

*Примечание:* <sup>1</sup> – p<0,05 по отношению к группе I, <sup>2</sup> – p<0,05 по отношению к группе II, <sup>3</sup> – p<0,05 по отношению к группе III, <sup>4</sup> – p<0,05 по отношению к группе IV; эр – в эритроцитах, пл – в плазме крови.

Так, уровень ТБЧ в эритроцитарной взвеси животных без коррекции в группах III и IV постепенно возрастал, к 15-20 минутам васкулярной эксклюзии печени достигая величин, в 1,5 раза превышающих контрольные значения. Тогда

как при сосудистой изоляции печени продолжительностью 10 минут у животных II-й группы уровень ТБЧ превышал контрольные значения всего на 15,3%. Показатели МВХЛ плазмы крови значительно возрастали к 10 и 20 минутам васкулярной эксклюзии в группах без применения метаболической коррекции – в 2,1 и 3,2 раза соответственно по сравнению со значением аналогичного параметра контрольной группы. Однако в промежутке между 10 и 15 минутами сосудистой изоляции печени явного роста интенсивности окислительных процессов не наблюдалось. ПХЛ, отражающая более длительное образование вторичных, третичных радикалов и реактивных молекул, а также развитие цепи свободнорадикального окисления биомолекул, увеличивалась уже к 10 минуте почти в 3 раза, но дальнейший рост был не таким значительным.

Введение ДХА существенно замедляло интенсификацию СРП (таблица 3.7). По данным хемилюминесцентного анализа, наблюдалось постепенное увеличение МВХЛ и ПХЛ, но значительно меньшее, чем в соответствующих группах сравнения. Так, МВХЛ при 10-минутной васкулярной эксклюзии печени с введением ДХА (группа V) был ниже значений группы II на 35,1%, при 15-минутном пережатии ПДС с введением ДХА (группа VI) – ниже показателя III-й группы на 10,4% и при 20-минутной ишемии с введением ДХА – ниже группы IV на 23,3%. ПХЛ, которая в группах сравнения резко возрастала уже к 10 минуте сосудистой изоляции печени и в дальнейшем существенных изменений не претерпевала, при использовании ДХА с целью метаболической коррекции увеличивалась более плавно. В V-й группе ПХЛ увеличивалась в 2,0 раза по сравнению с контрольной группой, при этом была ниже значения аналогичного показателя II-й группы на 27,4%; в VI-й группе – в 2,2 раза выше контроля и в VII-й группе – в 2,8 раза соответственно. Таким образом, только к 20 минуте пережатия ПДС при интраперитонеальном введении ДХА интенсивность окислительных процессов, по данным ПХЛ, достигала значений 10-минутной васкулярной эксклюзии печени без метаболической коррекции. Что касается накопления продуктов окислительных модификаций биомолекул – ТБК-РП, то при 10-15-минутной сосудистой изоляции печени их избыточное накопление не

регистрировалось. Однако при пережатии ПДС на протяжении 20 минут определялось статистически значимое увеличение уровня ТБЧ на 15,6%, что было ниже соответствующей группы сравнения на 18,0%.

В гомогенате печени не отмечалось существенных изменений показателей МВХЛ и ПХЛ, что, возможно, связано с быстрым затуханием СРП на местном уровне после 15-минутной реперфузии (таблица 3.8). Однако в печеночной паренхиме успевали накапливаться ТБК-РП в группах без коррекции (II-IV) на 28,2-50,2% выше содержания их у животных контрольной группы. Введение ДХА на фоне сосудистой изоляции печени у крыс сопровождалось увеличением ТБЧ лишь в VII-й группе, после 20-минутного пережатия ПДС, на 25,2%.

**Таблица 3.8** – Показатели интенсивности свободнорадикальных процессов в печени при ее васкулярной эксклюзии (Me (p0,25/p0,75))

Группы	ТБЧ, усл. ед.	МВХЛ, усл. ед.	ПХЛ, усл. ед. пл.
I (К)	6,34 (5,88/6,78)	0,84 (0,8/0,88)	0,39 (0,34/0,45)
II (10')	8,76 (8,02/9,44) <sup>1</sup>	0,68 (0,6/0,75) <sup>1</sup>	0,45 (0,41/0,51) <sup>1</sup>
III (15')	9,52 (8,73/10,1) <sup>1</sup>	0,81 (0,75/0,86)	0,68 (0,6/0,74) <sup>1</sup>
IV (20')	8,13 (7,4/9,12) <sup>1</sup>	0,58 (0,52/0,64) <sup>1</sup>	0,35 (0,26/0,43)
V (10'ДХА)	6,42 (5,79/7,0) <sup>2</sup>	0,81 (0,74/0,87)	0,41 (0,33/0,44)
VI (15'ДХА)	6,91 (6,43/7,59) <sup>3</sup>	0,86 (0,8/0,92)	0,42 (0,36/0,51) <sup>3</sup>
VII (20'ДХА)	7,94 (7,47/8,37) <sup>1</sup>	0,75 (0,66/0,83)	0,43 (0,37/0,51)

*Примечание:* <sup>1</sup> – p<0,05 по отношению к группе I, <sup>2</sup> – p<0,05 по отношению к группе II, <sup>3</sup> – p<0,05 по отношению к группе III.

Исследование содержания ВСиНММ продемонстрировало поэтапное развитие эндогенной интоксикации у лабораторных животных изученных групп

по мере увеличения продолжительности васкулярной эксклюзии печени (таблица 3.9). В группе II наблюдалось увеличение содержания ВСиНММ в плазме крови на 30,2% и в эритроцитах на 70,6%, что соответствует фазе накопления эндотоксинов из очага повреждения по М.Я. Малаховой [М.Я. Малахова, О.В. Зубаткина, В.В. Слепышева, 2011; И.И. Павлюченко и соавт., 2004]. В то же время в группе V, животные которой подвергались также 10-минутной сосудистой изоляции печени, но с предварительным введением ДХА, отмечался рост только эритроцитарной фракции ВСиНММ на 58,5% при исходном уровне в плазме крови, что, вероятнее всего, соответствует начальной фазе эндотоксикоза.

**Таблица 3.9** – Показатели уровня эндогенной интоксикации при васкулярной эксклюзии печени (Me (p0,25/p0,75))

Группы	ВСиНММ <sub>пл</sub> , отн. ед.	ВСиНММ <sub>эр</sub> , отн. ед.
I (К)	8,65 (7,9/9,77)	12,08 (11,29/13,13)
II (10')	11,26 (10,51/11,86) <sup>1</sup>	20,61 (19,93/21,22) <sup>1</sup>
III (15')	15,79 (15,4/16,14) <sup>1</sup>	20,29 (19,85/20,84) <sup>1</sup>
IV (20')	15,99 (15,5/16,82) <sup>1</sup>	15,8 (14,93/16,69) <sup>1</sup>
V (10'ДХА)	9,35 (8,52/10,03) <sup>2</sup>	19,15 (18,46/19,56) <sup>1</sup>
VI (15'ДХА)	11,87 (11,28/12,39) <sup>1,3</sup>	19,08 (18,54/19,67) <sup>1</sup>
VII (20'ДХА)	14,66 (13,66/14,93) <sup>1</sup>	18,44 (17,99/19,22) <sup>1,4</sup>

*Примечание:* <sup>1</sup> – p<0,05 по отношению к группе I, <sup>2</sup> – p<0,05 по отношению к группе II, <sup>3</sup> – p<0,05 по отношению к группе III, <sup>4</sup> – p<0,05 по отношению к группе IV; пл – в плазме крови, эр – в эритроцитах.

При 15-минутной васкулярной эксклюзии печени в группе III наблюдалось дальнейшее увеличение содержания ВСиНММ плазмы крови – на 82,5% в сравнении с контрольной группой, содержание эритроцитарной фракции сохранялось на уровне 10-минутной ишемии, что соответствует фазе обратимой декомпенсации системы функциональной детоксикации. При этом в группе VI при введении ДХА тоже наблюдался рост плазменной фракции ВСиНММ – на 37,2% при сравнении с группой I, а эритроцитарная фракция стабилизировалась, что позволяет аналогично отнести эту группу к 3-й фазе – обратимой

декомпенсации. Однако учитывая более низкий уровень плазменной фракции в сравнении с группой III, можно говорить о менее существенном уровне интоксикации. В группе IV в результате 20-минутной васкулярной эксклюзии печени без метаболической коррекции наблюдалось уже падение содержания ВСиНММ в эритроцитах на 22,1% по сравнению с III-й группой при сохранном уровне их в плазме крови, что может говорить о развитии фазы необратимой декомпенсации системы детоксикации. При этом у животных VII-й группы уровень эритроцитарной фракции продолжал оставаться стабильным, а плазменная фракция возросла на 69,5%. Такие изменения отчетливо демонстрируют отставание повреждения печеночной паренхимы и развития интоксикации на 5 минут при использовании ДХА по сравнению с группами без применения метаболической коррекции.

## ГЛАВА 4

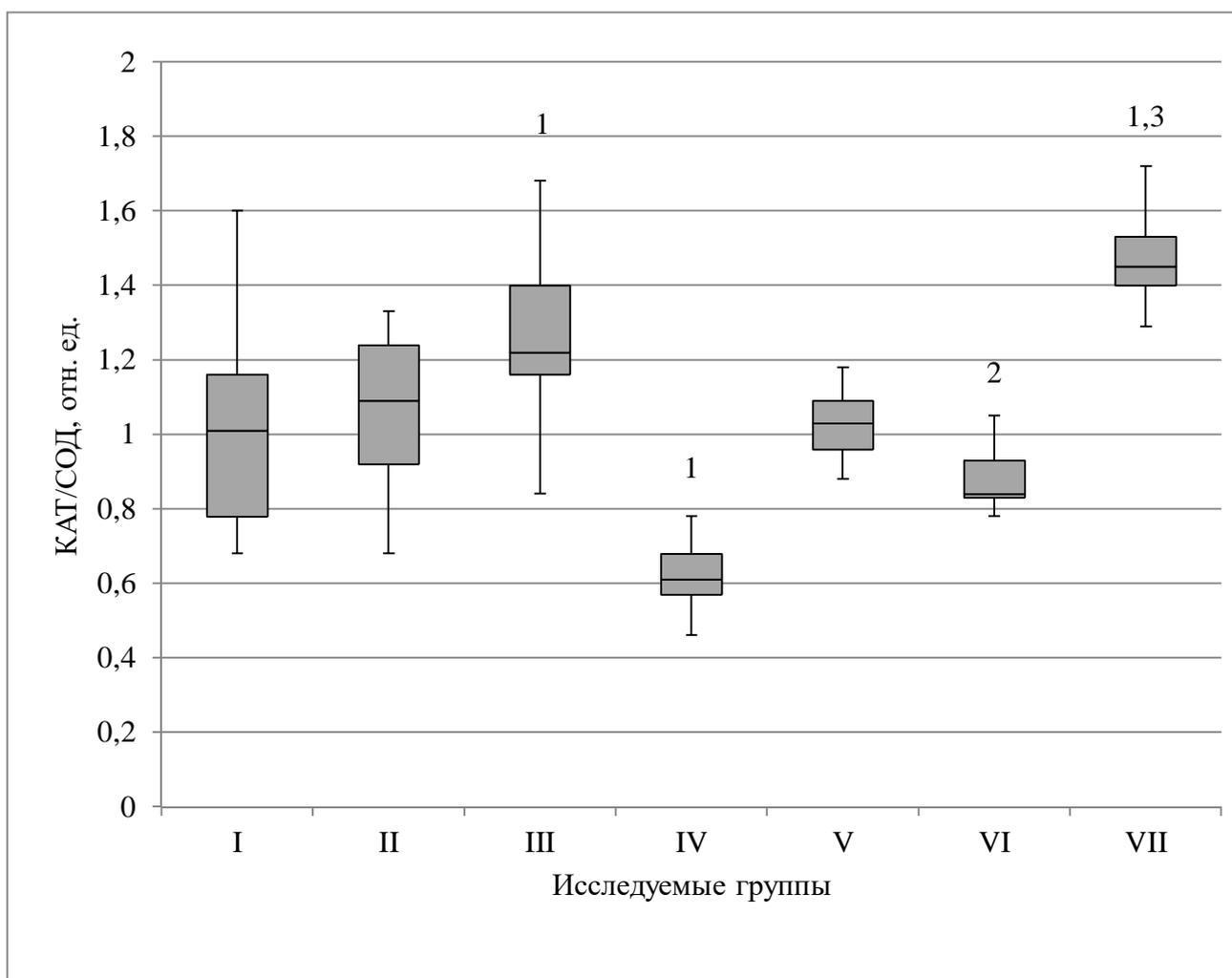
### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

#### **4.1. Развитие ишемически-реперфузионного синдрома при моделировании васкулярной эксклюзии печени**

Полученные результаты демонстрируют поэтапное развитие повреждения печеночной паренхимы у крыс с частичной сосудистой изоляцией печени [F. Wang et al., 2010], что подтверждается многократным и постепенным возрастанием активности ЛДГ, АСТ и АЛТ – классических маркеров цитолиза в плазме крови [И.Ю. Цымбалюк и соавт., 2016]. Так, уже при 10-минутном выключении печени из системного кровообращения развивался цитолитический синдром, характеризующийся ростом активности в плазме крови ЛДГ в 4,1 раза, АЛТ в 2,3 раза и АСТ в 2,0 раза. Васкулярная эксклюзия печени продолжительностью 15 минут сопровождалась еще бóльшим ростом активности вышеперечисленных ферментов в плазме крови. По сравнению с 10-минутной ишемией 15-минутная характеризовалась увеличением активности ЛДГ еще в 3,0 раза, АЛТ – в 1,9 раза и АСТ – в 1,5 раза. Интересно, что данные биохимические показатели не продемонстрировали дальнейшего роста при 20-минутной васкулярной эксклюзии, а наоборот, были несколько ниже аналогичных параметров крыс, подвергшихся 15-минутному пережатию аналога ПДС. Так, активность ЛДГ была ниже на 23%, АЛТ – на 37,2%, АСТ – на 13,1%. Это может быть связано с тем, что уже через 15 минут ишемии развивается выраженное повреждение печеночной паренхимы, которое заметно не усугубляется в течение последующих 5 минут. Кроме того, можно предположить, что как раз к этому времени защитные механизмы организма позволяют несколько сдержать дальнейшее прогрессирование патологического процесса. Возможно, именно с этим связаны рекомендации по выполнению сосудистой изоляции печени не более чем на 20 минут одномоментно [S.A. Celinski, T.C. Gamblin, 2010]. Однако для данного исследования имеет важное значение то, что уже при 15-минутной

васкулярной эксклюзии наблюдается пик повреждения печени, регистрируемый на основании определения активности ЛДГ и аминотрансфераз.

Для формирования целостной картины нарушений гомеостаза при развитии ИРС в результате васкулярной эксклюзии печени были изучены параметры функционирования прооксидантно-антиоксидантной системы и системы функциональной детоксикации на местном и системном уровнях. Ферменты первых двух линий антиоксидантной защиты – СОД и КАТ – обеспечивают нейтрализацию супероксид анион-радикала, образующегося в самом начале инициации СРП. СОД осуществляет его дисмутацию с образованием пероксида водорода, который, в свою очередь, разрушается при участии КАТ с образованием нетоксичных продуктов – кислорода и воды. В условиях васкулярной эксклюзии печени наблюдается снижение защитного потенциала этих ферментов. Активность СОД и КАТ эритроцитов снижается уже после 10-минутного пережатия аналога ПДС на 17% и 12% соответственно. В дальнейшем сохраняется тенденция снижения активности КАТ, которое достигает при 20-минутной сосудистой изоляции печени 30% по сравнению с контрольным значением. Активность СОД при 15-минутной васкулярной эксклюзии продолжает снижаться, но возвращается к исходным значениям при 20-минутной ишемии печени. Это увеличение активности СОД, возможно, как раз связано с запоздалым реагированием защитных систем [И.М. Быков и соавт., 2016]. Кроме того, оно прогностически неблагоприятно, что можно наглядно продемонстрировать расчетом коэффициента КАТ/СОД (рисунок 4.1). На диаграмме видно, что у животных при 10-минутной сосудистой изоляции печени сохраняется баланс функционирования ферментов первых двух линий АОС, 15-минутная васкулярная эксклюзия сопровождается небольшим смещением баланса в сторону относительной недостаточности СОД. Однако при 20-минутном выключении печени из системного кровообращения баланс резко сдвигается в сторону каталазной недостаточности, что может сопровождаться избыточным образованием пероксида водорода в результате активной деятельности СОД и недостаточной его нейтрализации.

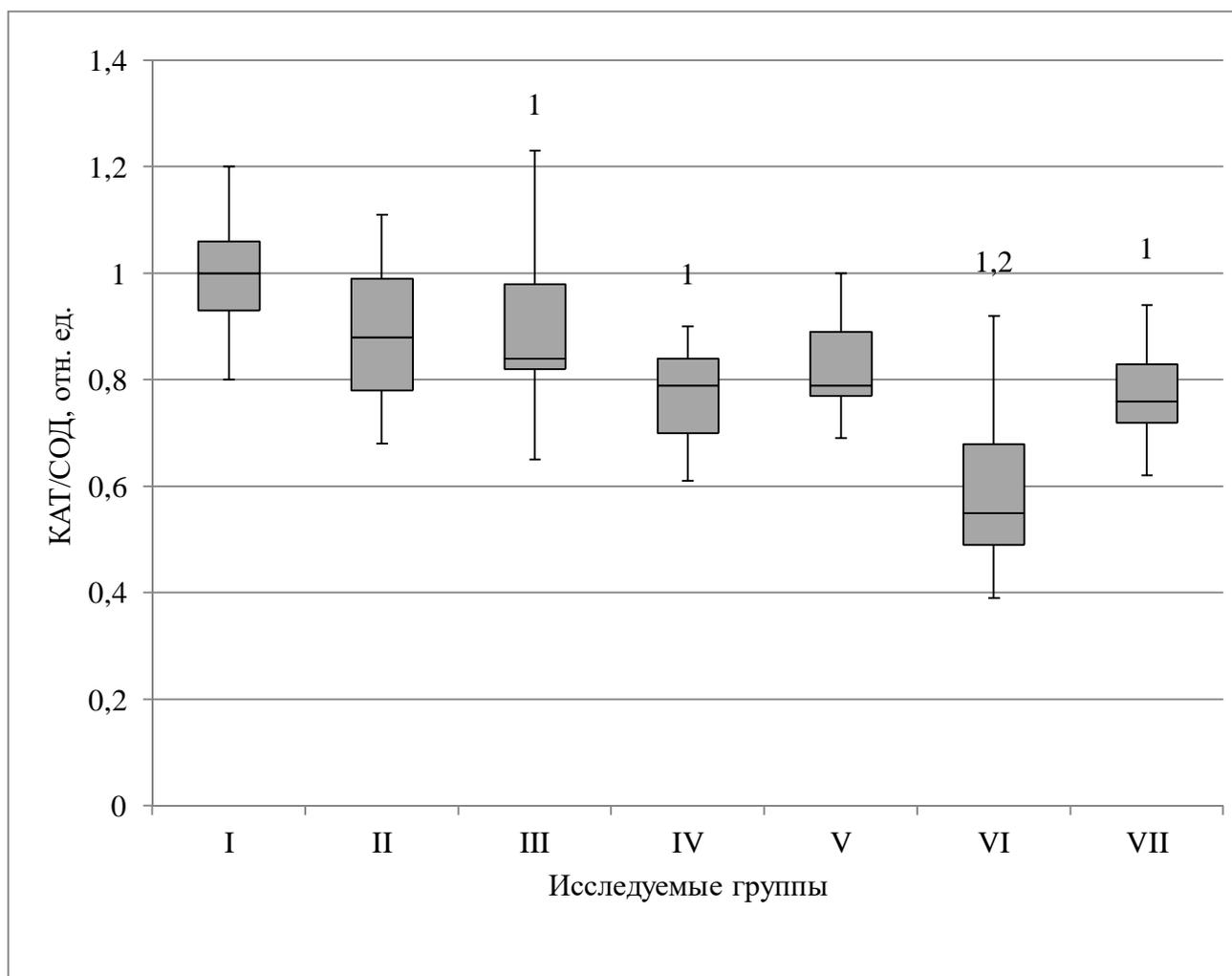


**Рисунок 4.1** – Соотношение активности каталазы и супероксиддисмутазы в эритроцитах крыс при васкулярной эксклюзии печени (min; p0,25; Me; p0,75; max)

*Примечание:* <sup>1</sup> – p<0,05 по отношению к группе I, <sup>2</sup> – p<0,05 по отношению к группе III, <sup>3</sup> – p<0,05 по отношению к группе IV.

В гомогенате печени наблюдалась похожая картина нарушений функционирования ферментов первых двух линий антиоксидантной защиты. Активность КАТ имела тенденцию к уменьшению при развитии ИРС. Так, она снижалась на 16-18% уже к 10 минуте сосудистой изоляции печени и сохранялась на этом уровне при 15- и 20-минутном выключении органа из системного кровообращения. Активность СОД в гомогенате печени статистически значимо не изменялась. Расчет соотношения активности КАТ и СОД показал аналогичные с эритроцитами результаты – развитие относительной каталазной недостаточности в группе животных, подвергавшихся 20-минутной васкулярной эксклюзии

печени, что характеризовалось значением соотношения КАТ/СОД, равным 0,79 отн. ед. (рисунок 4.2).



**Рисунок 4.2** – Соотношение активности каталазы и супероксиддисмутазы в гомогенате печени крыс при ее васкулярной эксклюзии  
(min; p0,25; Me; p0,75; max)

*Примечание:* <sup>1</sup> – p<0,05 по отношению к группе I, <sup>2</sup> – p<0,05 по отношению к группе III.

Зафиксированные изменения тиолового метаболизма в эритроцитах и гомогенате были направлены на поддержание адекватного функционирования печени в условиях ее сосудистой изоляции, поскольку известно, что роль глутатиона в организме связана с деятельностью АОС, систем иммунологической реактивности, детоксикации и других [В.И. Кулинский, Л.С. Колесниченко, 2009]. Так, при 10-минутном пережатии аналога ПДС у крыс определялось повышение активности ГПО и ГР эритроцитарной взвеси на 74% и 15,2% соответственно, что,

скорее всего, имеет компенсаторный характер. В дальнейшем при увеличении продолжительности сосудистой изоляции печени происходит срыв компенсаторных возможностей организма с падением активности ферментов тиолового метаболизма и снижением концентрации самого восстановленного глутатиона. В условиях 15-минутной васкулярной эксклюзии печени активность ГПО и ГР снижалась до значений аналогичных показателей контрольной группы. При 20-минутном выключении печени из системного кровообращения активность этих ферментов продолжала уменьшаться: ГПО на 44,9% и ГР на 31% ниже значений показателей контроля. Изменения активности ферментов тиолового метаболизма хорошо согласуются с полученными данными об изменениях концентрации восстановленного глутатиона в эритроцитарной взвеси, которая сохранялась на уровне контрольной группы в течение 10 минут сосудистой изоляции печени, а затем также снижалась в 1,5 раза. Таким образом, можно проследить, что компенсаторное увеличение активности ГПО и ГР вначале позволяет поддерживать содержание GSH на должном уровне. Однако с уменьшением активности ферментов в дальнейшем резко снижается и концентрация восстановленного глутатиона [И.Ю. Цымбалюк и соавт., 2015].

На местном (в печени) и на системном (в крови) уровнях изменения обмена глутатиона происходят практически одновременно. В гомогенате печени регистрировалось существенное увеличение активности ГПО и ГР в группе животных, подвергавшихся 10-минутной сосудистой изоляции печени. При 15-минутном пережатии аналога ПДС у крыс активность ГПО оставалась также повышенной (на 23%), а активность ГР снижалась на 22,6% по сравнению с показателем контрольной группы. 20-минутная васкулярная эксклюзия печени сопровождалась снижением активности ГПО до контрольных значений. При этом активность ГР сохранялась на том же уровне, что у животных с 15-минутной ишемией печени. Такие изменения, вероятнее всего, также связаны с попытками организма увеличить защитный потенциал на местном уровне, однако к 15-20 минутам сосудистой изоляции печени отмечается срыв компенсаторных возможностей. Это подтверждается и изменениями содержания восстановленного

глутатиона в ткани печени. Так, концентрация GSH поддерживается на исходном уровне при 10-минутном пережатии аналога ПДС у крыс, как и в крови, а в дальнейшем регистрируется снижение его содержания на 22-29% в гомогенатах печени крыс, подвергавшихся 15-20-минутной сосудистой изоляции.

Содержание тиоловых групп белков плазмы крови снижается на 28% практически сразу – такие результаты были зафиксированы в группе животных, подвергавшихся 10-минутной васкулярной эксклюзии печени, 15-минутное пережатие аналога ПДС у крыс сопровождалось снижением уровня SH-групп плазмы крови до тех же значений, что и у предыдущей группы крыс. В плазме крови лабораторных животных, которым проводили 20-минутное пережатие аналога ПДС, наблюдалось резкое снижение уровня сульфгидрильных групп биомолекул плазмы крови в 2 раза. Вероятнее всего, это свидетельствует о более быстром ответе метаболических систем плазмы крови на системный патологический процесс по сравнению с эритроцитарными, которые к тому же имеют более мощные защитные механизмы.

Для оценки того, как со своими задачами справляется АОС в условиях экспериментальной васкулярной эксклюзии печени, была изучена интенсивность СРП также на местном и системном уровнях. По данным МВХЛ плазмы крови, имеется два выраженных пика роста окислительных процессов – в группах животных, подвергавшихся 10- и 20-минутным сосудистым изоляциям печени, поэтому можно предположить, что с 10 по 15 минуты АОС эффективно сдерживает усиление свободнорадикального окисления. Результаты, полученные при измерении ПХЛ в плазме крови, показали выраженную интенсификацию окислительных процессов уже к 10 минуте пережатия аналога ПДС у крыс. В дальнейшем уровень ПХЛ, достигнутый к 10 минуте васкулярной эксклюзии печени, сохранялся. Уровень ТБЧ эритроцитов значительно возрастал при сосудистой изоляции продолжительностью 15-20 минут, тогда как существенного увеличения при 10-минутном пережатии аналога ПДС не наблюдалось. Анализ полученных результатов позволяет проследить, что уже к 10 минуте васкулярной эксклюзии печени происходит наиболее существенное усиление СРП в крови,

вторая волна интенсификации которых наблюдается к 20 минуте и она менее выраженная. Низкий уровень ТБЧ эритроцитов в крови животных, подвергавшихся 10-минутному пережатию аналога ПДС, связан с тем, что продукты окислительных модификаций еще не успевают накопиться в достаточном для их определения количестве и – в меньшей степени – с деятельностью АОС.

В гомогенате печени, по данным параметров хемилюминесценции, явных изменений обнаружено не было. Вероятно, это связано с тем, что в ходе 15-минутной реперфузии орган в целом успевает подавить СРП на местном уровне, и дальнейшие события связаны с устранением последствий уже развившихся окислительных нарушений. Это указывает на то, что повреждение печени крыс при ее 20-минутной васкулярной эксклюзии, вероятнее всего, обратимый процесс.

При этом данные, отражающие уровень эндогенной интоксикации, указывают на то, что 20-минутная сосудистая изоляция печени крыс приближает метаболические системы организма к необратимым изменениям. Пережатие ПДС на 10 минут уже ведет к развитию выраженного эндотоксикоза, характеризующегося ростом и эритроцитарной, и плазменной фракций ВСиНММ, что говорит об образовании избытка токсинов, с которыми не справляется система детоксикации и которые не могут полностью сорбираться мембранами эритроцитов [И.И. Павлюченко и соавт., 2003].

#### **4.2. Влияние дихлорацетата натрия на развитие и течение ишемически-реперфузионного синдрома при моделировании васкулярной эксклюзии печени**

Использование ДХА при пережатии ПДС ведет к существенному снижению уровня цитолиза гепатоцитов, что подтверждается более низкими значениями активности печеночных трансаминаз в плазме крови. Прослеживая изменение ферментов-маркеров цитолитического синдрома, можно заметить, что его развитие при введении животным ДХА запаздывает на 5 минут. Так, показатели V-й группы животных, которым вводили ДХА и осуществляли сосудистую

изоляцию печени длительностью 10 минут, представляют среднее между контролем и группой сравнения II, крысам которой не проводилась метаболическая коррекция. Активность АЛТ и АСТ при использовании ДХА на фоне 10-минутной васкулярной эксклюзии печени ниже, чем у животных без коррекции, на 43% и 34% соответственно. Естественно, что и в этом случае развивается повреждение печени, но значительно менее выраженное. Увеличение продолжительности сосудистой изоляции печени до 15 минут сопровождалось дальнейшим ростом активности АЛТ и АСТ в плазме крови до значений, соответствующих уровню у крыс с 10-минутным пережатием аналога ПДС, но без коррекции. У животных с 20-минутной сосудистой изоляцией на фоне введения ДХА показатели активности печеночных трансаминаз соответствовали аналогичным параметрам группы крыс, которым пережимался аналог ПДС на 15 минут и, соответственно, в ней наблюдались пиковые значения маркеров цитолиза. Таким образом, введение ДХА замедляет повреждение печени в результате развития ИРС, позволяя потенциально продлить время безопасной сосудистой изоляции печени при применении маневра Прингла у крыс на 5 минут, что в перспективе для клинической хирургии, безусловно, имеет большое значение.

Исследование активности ЛДГ в плазме крови при введении крысам ДХА показало, что он, вероятно, является ее ингибитором. Учитывая структурную аналогию между ДХА и пируватом, что широко обсуждается в литературе, это было ожидаемо. Однако прямого указания на данный факт, в том числе в доступных экспериментальных данных, найдено не было. В 3-й главе указывается, что активность ЛДГ при введении животным ДХА в качестве маркера цитолитического синдрома использоваться не может, поскольку в данном случае регистрируются существенно заниженные значения этого показателя, которые никак не согласуются с результатами определения активности печеночных трансаминаз. Анализируя полученные данные, можно заметить, что активность ЛДГ была снижена во всех группах животных, которым вводился ДХА на фоне васкулярной эксклюзии печени в дозировке 50 мг/кг массы тела и

выше, по сравнению с крысами, которым метаболическая коррекция не проводилась. Не было зафиксировано снижения активности ЛДГ при введении ДХА в дозировках 50 мг/кг с питьевой водой однократно или 300 мг/кг внутрибрюшинно однократно интактным крысам, которым впоследствии не проводилось моделирование васкулярной эксклюзии печени. Вероятно, это связано с тем, что при низкой активности фермента свойства конкурентного ингибитора проявляются не так выражено, как при ее существенно более высоких значениях в плазме крови, наблюдающихся при повреждении печени. Также интересно заметить, что существенной разницы активности ЛДГ в плазме крови при 15- и 20-минутной сосудистой изоляции печени с введением ДХА по разным схемам зафиксировано не было. Возможно, это связано с тем, что концентрация циркулирующего в плазме крови ДХА слабо зависит от дозировки и схемы его введения.

Для частичного объяснения протективных свойств ДХА были изучены параметры функционирования прооксидантно-антиоксидантной системы, играющей одну из ведущих ролей в развитии ИРС и его последствий.

Введение ДХА способствовало увеличению активности КАТ эритроцитарной взвеси во всех основных опытных группах по сравнению с контролем на 23-63% на фоне, наоборот, снижения активности данного фермента при васкулярной эксклюзии печени без коррекции. Активность СОД также возрастала в эритроцитах при использовании ДХА на 11-25% по сравнению с контролем при сниженных ее значениях в группах сравнения. Это, вероятнее всего, положительная тенденция, но следует также оценить изменение соотношения активности этих ферментов, так как в метаболических системах организма они работают взаимосвязанно. Анализ соотношения КАТ/СОД эритроцитов (рисунок 4.1) показал, что при 10-15-минутном пережатии аналога ПДС у крыс на фоне введения ДХА баланс ферментов первых двух линий антиоксидантной защиты сохраняется, и лишь при 20-минутной сосудистой изоляции печени отмечается его смещение в сторону небольшой относительной недостаточности СОД (КАТ/СОД в среднем составил 1,5). Это не так критично, как недостаточность

КАТ эритроцитов у животных с такой же продолжительностью васкулярной эксклюзии печени без применения ДХА, тем более учитывая, что активность этих ферментов существенно превышает контрольные значения.

В гомогенате печени крыс, подвергавшихся сосудистой изоляции печени на фоне введения ДХА, изменения активности КАТ и СОД были не такими значительными, как в группах без метаболической коррекции. Активность КАТ снижалась только в результате 15-20-минутного пережатия аналога ПДС, тогда как при 10-минутном сохранялась на уровне контрольных значений. Активность же СОД возрастала во всех группах с введением ДХА на 9-16%. Таким образом, введение ДХА способствует усилению деятельности АОС на местном (органном) уровне, что выражается в увеличении активности ферментов первой и второй линий антиоксидантной защиты. В то же время следует отметить, что расчет коэффициента КАТ/СОД показал, как и в группах без коррекции, наличие относительной недостаточности КАТ при 10-15-минутной сосудистой изоляции печени (рисунок 4.2).

Исследование метаболизма глутатиона при ишемически-реперфузионном повреждении гепатодуоденальной зоны на фоне коррекции ДХА также показало усиление этого звена системы неспецифической резистентности. Так, активность ГР и концентрация глутатиона в эритроцитах при применении ДХА на протяжении даже 20-минутной ишемии печени не снижались. В гомогенате наблюдалось возрастание активности ГПО с максимумом при 15-минутной сосудистой изоляции и снижение активности ГР с ростом при 20-минутной. Однако концентрация GSH снижалась уже при 10-минутном пережатии аналога ПДС и далее поддерживалась на том же уровне. Такие изменения могут быть вызваны интенсивным функционированием системы метаболизма глутатиона при повреждении на местном уровне, что сопровождается более высоким защитным потенциалом, активным противодействием повреждающему фактору. Изменения обмена GSH в крови и печени, кроме того, говорят о локализации метаболических нарушений с сохранным потенциалом низкомолекулярного тиолового звена АОС

на системном уровне, что в перспективе должно позволить восстановить функции органа.

Уровень тиоловых групп плазмы крови при использовании ДХА, как и в группах сравнения, снижался при 10-15-минутном пережатии аналога ПДС. Однако при 20-минутной васкулярной эксклюзии печени снижение содержания белковых SH-групп плазмы крови животных на фоне коррекции с использованием ДХА было менее значительным – на 25% (против 52% в группе сравнения).

Исследование показателей интенсивности окислительных процессов выявило менее выраженное, но постепенное усиление СРП на системном уровне (в крови) у крыс с сосудистой изоляцией печени при условии коррекции метаболических нарушений с использованием ДХА. Однако деятельность АОС, очевидно, сдерживает в таких условиях прогрессирующие окислительные повреждения биомолекул, что отражается в замедленном накоплении ТБК-РП [И.И. Павлюченко и соавт., 2006], повышенное содержание которых регистрируется только у животных, подвергавшихся 20-минутной сосудистой изоляции печени с введением ДХА, со значениями ТБЧ, равными показателю группы крыс с 10-минутным пережатием аналога ПДС без коррекции. По данным параметров хемилюминесценции, отмечался менее значительный рост МВХЛ во всех группах животных, которым вводили ДХА, по сравнению с группами без метаболической коррекции. При 10-минутной васкулярной эксклюзии печени МВХЛ плазмы крови крыс, получавших ДХА, был ниже животных группы сравнения на 35%, а при 20-минутной – на 23%. ПХЛ при введении животным ДХА увеличивалась, в отличие от крыс групп сравнения, более плавно. Так, отмечался рост ПХЛ при 10-минутной сосудистой изоляции печени с применением коррекции в 2 раза и при 20-минутной – в 2,8 раза по сравнению со значениями контрольной группы. Тогда как у животных в группах сравнения этот показатель увеличивался уже при 10-минутной васкулярной эксклюзии в 2,7 раза, а дальнейший рост был незначительным.

На местном уровне (в печени) также развиваются выраженные нарушения окислительного метаболизма, которые быстро распространяются на системный уровень и вызывают более значительные изменения, регистрирующиеся в крови. Использование ДХА позволяет эффективно подавить выявленные нарушения окислительного метаболизма. Так же как и в крови, при сосудистой изоляции печени с интраперитонеальным введением ДХА рост содержания ТБК-РП в гомогенате печени (на 25%) наблюдается только лишь при 20-минутном пережатии аналога ПДС у крыс.

По данным содержания ВСиНММ в плазме крови и эритроцитарной взвеси видно, что применение ДХА при васкулярной эксклюзии печени позволяет снизить уровень эндогенной интоксикации. Анализ соотношения плазменной и эритроцитарной фракций ВСиНММ позволяет говорить о том, что введение ДХА способствует замедлению развития фаз эндотоксикоза на 5 минут, что хорошо согласуется с данными о развитии цитолитического синдрома.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В современной хирургической гепатологии большое значение придается профилактике кровопотери. Для этой цели успешно используется современное оборудование, позволяющее осуществлять электролигирование сосудов технологией LigaSure [M. Yoshimoto et al., 2014], ультразвуковую кавитационную хирургическую аспирацию, водоструйную диссекцию [Д.В. Сидоров и соавт., 2013], аргоноплазменную коагуляцию, радиочастотную абляцию [E.M. Alkozai, T. Lisman, R.J. Porte, 2009]. Для снижения объема интраоперационной кровопотери используются также техники сосудистого контроля – превентивная сосудистая изоляция печени в различных ее вариантах в сочетании со снижением центрального венозного давления и обработкой резекционной поверхности препаратами на основе фибрина [В.А. Горский, А.М. Зрянин, М.А. Агапов, 2011]. Наиболее доступным и легко осуществимым является пережатие ПДС [В.В. Цвиркун и соавт., 2010], внедренное ирландским хирургом Принглом. Такой вариант сосудистой изоляции позволяет редуцировать артериальный и портальный приток крови в печень без значимых гемодинамических нарушений.

Однако вследствие ишемии и последующей реперфузии органа запускается каскад метаболических, морфологических и иммунологических изменений – ИРС, который потенциально может привести к развитию печеночной недостаточности в раннем послеоперационном периоде, что особенно опасно для пациентов с хроническим гепатитом и циррозом печени. Помимо этого, имеются данные об ускорении роста колоректальных микрометастазов при длительном ишемическом повреждении печени в условиях сосудистой окклюзии. Кроме того, синдром ишемии-реперфузии трансплантата разной степени выраженности присутствует при каждой трансплантации печени и вносит значительный вклад в раннюю послеоперационную его дисфункцию.

В связи с этим актуальны поиск и применение способов метаболической коррекции, позволяющих минимизировать последствия ишемически-

реперфузионного повреждения, уменьшая при этом тканевую гипоксию или подавляя интенсификацию СРП в момент восстановления кровотока.

Одной из ключевых мишеней на субклеточном уровне при ишемии является митохондрия, повреждаемая как при редуцировании кровотока в сосудах органа, так и при его восстановлении. Митохондриальное окислительное повреждение усиливается образованием АФК, провоспалительных цитокинов, факторов активации апоптоза [J.J. Lemasters, A.-L. Nieminen, 2001]. В условиях тканевой гипоксии ферментные системы клеточного дыхания представляются потенциальной точкой коррекции. Поэтому приобретает интерес исследование ДХА, стимулирующего активность МПДК, в качестве митохондриального цитопротектора с целью возможной коррекции последствий ишемически-реперфузионного повреждения печени в условиях ее васкулярной эксклюзии.

В результате проведенных исследований была выбрана схема метаболической профилактики ИРС, предусматривающая интраперитонеальное введение ДХА в дозировке 300 мг/кг непосредственно перед выполнением пережатия ПДС, в связи с наиболее выраженным снижением активности aminотрансфераз в плазме крови крыс с васкулярной эксклюзией печени и возможностью выполнения данной манипуляции экстренно. Исследование потенциальной токсичности предложенной схемы введения ДХА показало ее безопасность.

В ходе проведенных исследований было показано, что использование ДХА при пережатии ПДС ведет к существенному снижению уровня цитолиза гепатоцитов. Эффективность применения ДХА в качестве цитопротектора в условиях сосудистой изоляции печени была подтверждена определением активности АЛТ и АСТ в плазме крови. Активность АЛТ возрастала в плазме крови животных, подвергавшихся 10-минутной васкулярной эксклюзии и введению ДХА, на 32,5% по сравнению с контролем, но была ниже соответствующей группы сравнения на 42,6%. Активность АСТ на фоне 10-минутного пережатия ПДС при введении ДХА увеличивалась по сравнению с контрольной группой на 33,0% и была ниже показателя группы, соответствующей

по продолжительности сосудистой изоляции печени без проведения метаболической коррекции, на 33,9%. Увеличение длительности васкулярной эксклюзии печени до 15 минут сопровождалось дальнейшим ростом активности АЛТ и АСТ по сравнению с контролем в 2,1 и 2,0 раза соответственно. Однако данные показатели были все же ниже аналогичных у не получавших коррекции животных III-й группы сравнения на 52,1% и 33,9% соответственно. Плазма крови животных, которым вводили ДХА на фоне 20-минутной сосудистой изоляции печени, характеризовалась повышенной активностью АЛТ и АСТ по сравнению с контролем в 4,7 и 2,8 раза соответственно. Проследивая изменение ферментов-маркеров цитолитического синдрома, можно заметить, что его развитие при введении животным ДХА запаздывает на 5 минут. Таким образом, ДХА замедляет повреждение печени в результате развития ИРС, что может позволить продлить продолжительность относительно безопасной сосудистой изоляции печени при применении маневра Прингла у крыс на 5 минут.

Исследование активности ЛДГ в плазме крови при введении крысам ДХА показало, что он, вероятно, является ее ингибитором. В связи с этим определение активности ЛДГ при введении животным ДХА в качестве маркера цитолитического синдрома использоваться не может, так как в этом случае регистрируются заниженные значения показателя, которые никак не согласуются с данными определения активности печеночных трансаминаз.

Кроме того, было установлено, что при использовании ДХА для метаболической профилактики ишемически-реперфузионных нарушений в группах животных с 10- и 15-минутными эпизодами васкулярной эксклюзии значения относительной массы печени были близки к таковым в контрольной группе и ниже соответствующих показателей в группах сравнения в 1,2 раза. Полученные результаты можно объяснить развитием менее выраженных застойных явлений, а также внутриклеточного и интерстициального отека печени при применении метаболической коррекции, что также подтверждает наличие выявленных протекторных свойств ДХА.

Выраженность патобиохимических изменений также оценивали по уровню эндогенной интоксикации. Исследование содержания ВСиНММ продемонстрировало поэтапное развитие эндотоксикоза у лабораторных животных изученных групп по мере увеличения продолжительности васкулярной эксклюзии печени. При этом также было зафиксировано отставание повреждения печеночной паренхимы и развития интоксикации на 5 минут при использовании ДХА по сравнению с группами без применения метаболической коррекции.

С целью раскрытия механизмов воздействия ДХА на клеточный метаболизм в условиях развития ишемически-реперфузионного повреждения печени было изучено функциональное состояние прооксидантно-антиоксидантной системы. Для оценки изменений первых двух линий ферментного звена АОС проводили определение активности СОД и КАТ в эритроцитах и гомогенате печени. В эритроцитах животных групп сравнения активность КАТ имела тенденцию к снижению. Применение ДХА, наоборот, способствовало увеличению активности КАТ на 22,7% и 62,9% в V-й и VII-й группах соответственно. Активность СОД в эритроцитах имела ту же тенденцию – снижение в группах II и III на 16,7% и 27,2%, но возрастание в группах V и VI, животным которых вводился ДХА, на 19,1% и 24,9%. Анализ же соотношения КАТ/СОД эритроцитов показал, что при 10-15-минутном пережатии аналога ПДС у крыс на фоне введения ДХА баланс ферментов первых двух линий антиоксидантной защиты сохраняется, и лишь при 20-минутной сосудистой изоляции печени отмечается его смещение в сторону небольшой относительной недостаточности СОД. Это не так критично, как недостаточность КАТ эритроцитов у животных с такой же продолжительностью васкулярной эксклюзии печени без применения ДХА, тем более учитывая, что активность этих ферментов существенно превышает контрольные значения.

В гомогенате печени активность КАТ снижалась как в группах сравнения, так и в основных опытных группах с коррекцией ДХА. Однако если в группах II-IV это происходило уже при 10-минутной васкулярной эксклюзии печени, то в группах V-VII снижение наблюдалось, начиная только с 15 минут ишемии. Полученные данные отражают усиление компенсаторных возможностей

ферментов АОС крови и печени при воздействии ДХА, что может являться одним из механизмов его цитопротективного эффекта.

Исследование метаболизма глутатиона при ишемически-реперфузионном повреждении гепатодуоденальной зоны на фоне коррекции ДХА также показало усиление этого звена системы неспецифической резистентности. В группах без использования ДХА в качестве метаболического корректора активность ГПО и ГР изменялась однонаправленно. К 10 минуте сосудистой изоляции печени в эритроцитах происходило увеличение активности обоих ферментов с последующим уменьшением в группе III до контрольных значений, а в группе IV ниже их. Концентрация восстановленного глутатиона поддерживалась на исходном уровне до 10 минут частичной сосудистой изоляции печени с последующим снижением в 1,5 раза к 15-20 минутам. В ткани печени крыс, подвергшихся моделированию васкулярной эксклюзии без метаболической коррекции, наблюдали похожие изменения активности ферментов тиолового метаболизма и содержания GSH. Введение крысам ДХА перед пережатием аналога ПДС способствовало поддержанию адекватного функционирования изученных показателей метаболизма глутатиона. Активность ГР эритроцитарной взвеси в группах V и VII существенно не изменялась, а ГПО немного снижалась в группах V-VII – на 15-24% в сравнении с контрольной группой. Содержание восстановленного глутатиона в эритроцитах поддерживалось на нормальном уровне у крыс всех опытных групп, при этом было выше значений групп сравнения, животные которых подвергались 15-20-минутным пережатиям ПДС. Изменения обмена GSH в крови и печени, кроме того, говорят о локализации метаболических нарушений с сохраненным потенциалом низкомолекулярного тиолового звена АОС на системном уровне, что в перспективе должно позволить восстановить функции органа.

Также введение ДХА существенно замедляло интенсификацию СРП на системном уровне при частичной сосудистой изоляции печени. По данным хемилюминесцентного анализа, наблюдалось постепенное увеличение МВХЛ и ПХЛ, но значительно меньшее, чем в соответствующих группах сравнения. Так,

МВХЛ при 10-минутной васкулярной эксклюзии печени с введением ДХА был ниже значений группы II на 35,1%, при 15-минутном пережатии аналога ПДС с введением ДХА – ниже показателя III-й группы на 10,4% и при 20-минутной ишемии с введением ДХА – ниже группы IV на 23,3%. ПХЛ, которая в группах сравнения возрастала уже к 10 минуте сосудистой изоляции печени и в дальнейшем существенных изменений не претерпевала, при использовании ДХА с целью метаболической коррекции увеличивалась более плавно. В V-й группе ПХЛ увеличивалась в 2,0 раза по сравнению с контрольной группой, при этом была ниже значения аналогичного показателя II-й группы на 27,4%; в VI-й группе – в 2,2 раза выше контроля и в VII-й группе – в 2,8 раза соответственно. Таким образом, только к 20 минуте пережатия ПДС при интраперитонеальном введении ДХА интенсивность окислительных процессов, по данным ПХЛ, достигала значений 10-минутной васкулярной эксклюзии печени без метаболической коррекции.

Активное функционирование АОС, очевидно, сдерживает прогрессирующие окислительные повреждения биомолекул при применении ДХА в условиях васкулярной эксклюзии печени, что отражается в замедленном накоплении ТБК-РП, повышенное содержание которых регистрируется только у крыс, подвергавшихся 20-минутной сосудистой изоляции с введением ДХА. Значения ТБК в этой группе были близки к показателю крыс с 10-минутным пережатием аналога ПДС без проведения метаболической коррекции ишемически-реперфузионных нарушений. Таким образом, одним из вероятных механизмов действия ДХА является активация компенсаторных возможностей системы неспецифической резистентности, в том числе АОС, ввиду развития окислительного стресса как ведущего повреждающего фактора при реперфузии.

Данные, полученные в ходе исследования, демонстрируют цитопротективные свойства ДХА, активатора МПДК, на модели сосудистой изоляции печени (маневра Прингла) и могут быть использованы в дальнейших исследованиях на клинических моделях, а также рекомендованы с целью уменьшения ишемически-реперфузионного повреждения. Применение данного

метаболического протектора при васкулярной эксклюзии печени представляется перспективным при введении его даже в большой дозе, но однократно или небольшим курсом, так как действие развивается очень быстро, а для появления побочных эффектов этого, как правило, недостаточно.

## ВЫВОДЫ

1. Разработан способ метаболической коррекции ишемически-реперфузионных нарушений при использовании превентивной васкулярной эксклюзии печени в ходе оперативного вмешательства, предусматривающий интраоперационное интраперитонеальное введение дихлорацетата натрия в дозировке 300 мг/кг массы тела.

2. Установлено, что при васкулярной эксклюзии печени продолжительностью 10 минут поддерживается адекватное функционирование антиоксидантной системы: увеличение активности глутатионпероксидазы эритроцитов на 74%, поддержание концентрации восстановленного глутатиона эритроцитов и печени на физиологическом уровне, несмотря на существенное нарастание интенсивности свободнорадикальных процессов. При увеличении времени сосудистой изоляции печени до 15 минут уже на фоне снижения активности ферментов антирадикальной защиты до уровня контрольной группы или несколько ниже нарастает дисбаланс прооксидантно-антиоксидантной системы. После 20 минут пережатия печеночно-двенадцатиперстной связки наблюдается срыв компенсаторных возможностей антиоксидантной системы, сопровождающийся снижением активности ферментов антирадикальной защиты и в эритроцитах, и в печени, а также еще бóльшим нарастанием интенсивности окислительных процессов (в 3-3,2 раза).

3. Применение дихлорацетата натрия с целью метаболической коррекции ишемически-реперфузионного повреждения печени при хирургическом моделировании ее васкулярной эксклюзии позволяет добиться увеличения потенциала ферментного и неферментного звеньев антиоксидантной системы как на местном, так и на системном уровнях, а также приводит к существенному замедлению интенсификации свободнорадикальных процессов.

4. Доказана возможность снижения уровня эндогенной интоксикации при васкулярной эксклюзии печени с использованием интраоперационно дихлорацетата натрия, что подтверждается меньшими значениями (на 10-25%)

плазменной и эритроцитарной фракций веществ со средней и низкой молекулярными массами.

5. Выявлена максимальная гепатопротекторная эффективность дихлорацетата натрия при васкулярной эксклюзии печени продолжительностью 10-15 минут, что подтверждается достоверным уменьшением цитолиза гепатоцитов при сравнении с оперированными животными без метаболической коррекции (по данным активности в плазме крови, АЛТ на 43-52% и АСТ на 34%). Сравнивая показатели активности трансаминаз в плазме крови крыс, подвергавшихся сосудистой изоляции печени с и без метаболической коррекции, можно заключить, что использование дихлорацетата натрия в дозировке 300 мг/кг массы тела достоверно замедляет развитие цитолитического синдрома на 5 минут.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Рекомендовать использование дихлорацетата натрия для повышения эффективности коррекции патобиохимических изменений, сопровождающих васкулярную эксклюзию печени в эксперименте.

2. Использование дихлорацетата натрия в дозировке 300 мг/кг массы тела перед пережатием печеночно-двенадцатиперстной связки позволяет продлить относительно безопасные сроки экспериментальной васкулярной эксклюзии печени, улучшая переносимость ее ишемии в течение 10-15 минут, за счет снижения цитолиза гепатоцитов.

3. Для оценки выраженности ишемически-реперфузионного синдрома при васкулярной эксклюзии печени в экспериментальной хирургии целесообразно использование разработанной констелляции лабораторных показателей (АСТ, АЛТ, ЛДГ, ГПО, ГР и GSH).

## **ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Полученные данные позволяют рекомендовать дихлорацетат натрия для проведения целенаправленных доклинических исследований возможностей коррекции ишемически-реперфузионных нарушений при превентивной сосудистой изоляции печени в ходе ее резекций и хирургии внутripеченочных сосудистых магистралей. Результаты исследований особенностей окислительного метаболизма у животных на фоне развития ишемически-реперфузионного синдрома при проведении метаболической коррекции позволяют говорить о перспективе разработки схем комбинированной терапии с использованием дихлорацетата натрия и средств антиоксидантной направленности, в том числе супероксиддисмутазы.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

<b>АЛТ</b>	– аланинаминотрансфераза
<b>АОС</b>	– антиоксидантная система
<b>АСТ</b>	– аспаратаминотрансфераза
<b>АФК</b>	– активные формы кислорода
<b>ВСиНММ</b>	– вещества со средней и низкой молекулярными массами
<b>ГЛП</b>	– гиперлипопротеинемия
<b>ГПО</b>	– глутатионпероксидаза
<b>ГР</b>	– глутатионредуктаза
<b>ДХА</b>	– дихлорацетат натрия
<b>ИРС</b>	– ишемически-реперфузионный синдром
<b>КАТ</b>	– каталаза
<b>ЛДГ</b>	– лактатдегидрогеназа
<b>МВХЛ</b>	– максимум вспышки хемилюминесценции
<b>МПДК</b>	– мультиферментный пируватдегидрогеназный комплекс
<b>ПДГ</b>	– пируватдегидрогеназа
<b>ПДС</b>	– печеночно-двенадцатиперстная связка
<b>ПХЛ</b>	– площадь вспышки хемилюминесценции
<b>СОД</b>	– супероксиддисмутаза
<b>СРП</b>	– свободнорадикальные процессы
<b>ТБК-РП</b>	– вторичные продукты перекисного окисления липидов, реагирующие с тиобарбитуровой кислотой
<b>ТБЧ</b>	– тиобарбитуровое число
<b>GSH</b>	– восстановленный глутатион

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Абдулаев, М.А. Современное состояние проблемы малоинвазивных методов локального лечения метастазов колоректального рака в печени (обзор литературы) / М.А. Абдулаев, Е.В. Напольская, М.Ю. Цикоридзе // Онкологическая колопроктология. – 2016. – Т. 6, № 1. – С. 43-47.
2. Алиханов, Р.Б. Патофизиологические аспекты реперфузионных повреждений печени / Р.Б. Алиханов, В.А. Кубышкин // Кубанский научный медицинский вестник. – 2013. – № 7 (142). – С. 170-173.
3. Аллилуев, И.А. Транскрипционный фактор NF1: механизмы регуляции при гипоксии и нормоксии / И.А. Аллилуев // Известия вузов. Северо-Кавказский регион. Естественные науки. – 2014. – № 3. – С. 56-60.
4. Ахметзянов, Ф.Ш. Способы резекции печени / Ф.Ш. Ахметзянов, М.Н. Идрисов // Казанский медицинский журнал. – 2015. – Т. 96, № 4. – С. 563-567.
5. Басов, А.А. Мониторинг и коррекция свободнорадикальных процессов в экспериментальной и клинической практике: монография / А.А. Басов, С.С. Джимаков, Н.И. Быкова. – Краснодар: Изд-во Кубанского гос. ун-та, 2013. – 169 с.
6. Басов, А.А. Влияние льняного масла и питьевого рациона с пониженным содержанием дейтерия на изотопный D/H состав и функциональное состояние антиоксидантной защиты гепатобилиарной системы у кроликов при интоксикации четыреххлористым углеродом / А.А. Басов, И.М. Быков, С.С. Джимаков [и др.] // Вопросы питания. – 2016. – Т. 85, № 6. – С. 30-38.
7. Басов, А.А. Использование аналогово-цифрового преобразователя в составе системы сбора и обработки информации с хемилюминитестером LT-01 / А.А. Басов, И.И. Павлюченко, А.М. Плаксин [и др.] // Вестник новых медицинских технологий. – 2003. – Т. 10, № 4. – С. 67-68.
8. Биленко, М.В. Ишемические и реперфузионные повреждения органов / М.В. Биленко. – М.: Медицина, 1989. – 368 с.

9. Бойко, В.В. Диссекция паренхимы в резекционной хирургии печени. Оценка пяти методов в проспективном рандомизированном исследовании / В.В. Бойко, А.М. Тищенко, Д.И. Скорый [и др.] // Хірургія України. – 2012. – № 4. – С. 21-30.
10. Быков, И.М. Метаболическая коррекция экспериментального аллоксанового диабета средствами антиоксидантной направленности / И.М. Быков, К.А. Попов, И.Ю. Цымбалюк [и др.] // Вопросы питания. – 2017. – Т. 86, № 3. – С. 68-76.
11. Быков, И.М. Перспективы изучения ротовой жидкости в лабораторной диагностике нарушений окислительного метаболизма / И.М. Быков, Е.А. Алексеенко, К.А. Попов [и др.] // Кубанский научный медицинский вестник. – 2016. – № 4 (159). – С. 16-20.
12. Васильев, П.В. Гемо- и билиостаз при резекциях печени / П.В. Васильев, В.П. Ионин, Д.П. Кислицин [и др.] // Уральский медицинский журнал. – 2008. – № 6 (46). – С. 27-30.
13. Васляева, С.Н. Безболевая ишемия миокарда: патогенетические и патофизиологические механизмы. Традиционные и метаболические аспекты терапии / С.Н. Васляева, В.А. Люсов, О.В. Цыганкова [и др.] // Российский кардиологический журнал. – 2004. – № 4 (48). – С. 74-83.
14. Веревкина, И.В. Колориметрический метод определения SH-групп и SS-связей в белках при помощи 5,5-дитиобис(2-нитробензойной) кислоты / И.В. Веревкина, А.И. Точилкин, Н.А. Попова // Современные методы биохимии / под ред. В.Н. Ореховича. – М.: Медицина, 1977. – С. 223-231.
15. Вишневский, В.А. Обширные резекции печени при высоком риске массивной кровопотери / В.А. Вишневский, Н.А. Назаренко, Р.З. Икрамов [и др.] // Альманах Института хирургии имени А.В. Вишневского. – 2008. – Т. 3, № 3. – С. 18-22.
16. Вишневский, В.А. Прогноз и профилактика массивной интраоперационной кровопотери при резекциях печени / В.А. Вишневский,

В.В. Субботин, М.Г. Ефанов [и др.] // *Анналы хирургической гепатологии*. – 2012. – Т. 17, № 1. – С. 35-44.

17. Вишневский, В.А. Селективная сосудистая изоляция печени при сегментарных резекциях: безопасность, влияние на объем кровопотери / В.А. Вишневский, М.Г. Ефанов, Р.З. Икрамов [и др.] // *Анналы хирургической гепатологии*. – 2010. – Т. 15, № 2. – С. 24-30.

18. Вишневский, В.А. Способ воротного доступа к сосудисто-секреторным элементам при анатомических сегментарных резекциях печени / В.А. Вишневский, М.Г. Ефанов, Р.З. Икрамов [и др.] // *Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова*. – 2008. – № 9. – С. 33-40.

19. Горский, В.А. Эффективность использования Тахокомба в гепатобилиарной хирургии / В.А. Горский, А.М. Зрянин, М.А. Агапов // *Современные технологии в медицине*. – 2011. – № 2. – С. 61-68.

20. Заривчацкий, М.Ф. Профилактика и лечение осложнений при резекциях очаговых образований печени / М.Ф. Заривчацкий, И.Н. Мугатаров, Е.Д. Каменских [и др.] // *Анналы хирургической гепатологии*. – 2013. – Т. 18, № 3. – С. 47-53.

21. *Здравоохранение в России. 2017: Стат. сб.* / Росстат. – М., 2017. – 170 с.

22. Камышников, В.С. *Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике* / В.С. Камышников. – 3-е изд. – М.: МЕДпресс-информ, 2009. – 896 с.

23. Костюк, В.А. Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина / В.А. Костюк, А.И. Потапович, Ж.В. Ковалева // *Вопросы медицинской химии*. – 1990. – Т. 36, № 2. – С. 88-91.

24. Кулинский, В.И. Система глутатиона I. Синтез, транспорт, глутатионтрансферазы, глутатионпероксидазы / В.И. Кулинский, Л.С. Колесниченко // *Биомедицинская химия*. – 2009. – Т. 55, № 3. – С. 255-277.

25. Лопатин, Д.В. Коррекция ишемических и реперфузионных повреждений печени при хирургических вмешательствах с использованием метода дистантного прекондиционирования и фармакологической защиты L-норвалином / Д.В. Лопатин, С.А. Алехин, М.В. Покровский [и др.] // Кубанский научный медицинский вестник. – 2012. – № 4 (133). – С. 171-175.

26. Малахова, М.Я. Эндогенная интоксикация и методы ее верификации: учебное пособие / М.Я. Малахова, О.В. Зубаткина, В.В. Слепышева. – СПб.: Изд-во СПбМАПО, 2011. – 87 с.

27. Мануйлов, А.М. Биологическая активность дихлорацетата натрия: концепции и механизмы (обзор литературы) / А.М. Мануйлов, К.А. Попов, И.Ю. Цымбалюк [и др.] // Кубанский научный медицинский вестник. – 2016. – № 6 (161). – С. 156-163.

28. Медицинские лабораторные технологии: справочник: в 2 т. / под ред. профессора А.И. Карпищенко. – 2-е изд., перераб. и доп. – СПб.: Интермедика, 2002. – Т. 2. – 600 с.

29. Новиков, В.Е. Гипоксией индуцированный фактор (HIF-1 $\alpha$ ) как мишень фармакологического воздействия / В.Е. Новиков, О.С. Левченкова // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2013. – Т. 11, № 2. – С. 8-16.

30. Операции на печени. Руководство для хирургов / В.А. Вишневский [и др.]. – М.: Миклош, 2003. – 156 с.

31. Павлюченко, И.И. Интегральные методы оценки уровня эндогенной интоксикации и перекисного окисления биомолекул при острых и хронических заболеваниях / И.И. Павлюченко, А.А. Басов, И.М. Быков [и др.] // Аллергология и иммунология. – 2004. – Т. 5, № 4. – С. 551-555.

32. Павлюченко, И.И. Интегральные показатели эндогенной интоксикации и окислительного стресса у больных с почечной недостаточностью / И.И. Павлюченко, Ю.В. Дынько, А.А. Басов [и др.] // Нефрология и диализ. – 2003. – Т. 5, № S1. – С. 28-32.

33. Павлюченко, И.И. Комплексная оценка состояния системы про-антиоксиданты в различных биологических средах у хирургических больных с гнойно-септическими осложнениями / И.И. Павлюченко, М.И. Быков, С.Р. Федосов [и др.] // Успехи современного естествознания. – 2006. – № 6. – С. 82-83.
34. Патютко, Ю.И. Резекция печени: современные технологии при опухолевом поражении / Ю.И. Патютко, И.В. Сагайдак, А.Г. Котельников [и др.] // Анналы хирургической гепатологии. – 2010. – Т. 15, № 2. – С. 9-17.
35. Патютко, Ю.И. Хирургическое лечение первичного рака печени / Ю.И. Патютко, И.В. Сагайдак, Е.С. Чучуев [и др.] // Практическая онкология. – 2008. – Т. 9, № 4 (36). – С. 197-201.
36. Писецкая, М.Э. Применение методов васкулярной эксклюзии печени при ее резекциях / М.Э. Писецкая // Международный медицинский журнал. – 2014. – Т. 20, № 3. – С. 67-71.
37. Руководство по хирургии печени и желчевыводящих путей: монография: в 2 т. / под ред. профессора А.Е. Борисова. – СПб.: Скифия, 2003. – Т. 1: Хирургия печени. – 488 с.
38. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / под общей редакцией члена-корреспондента РАМН, профессора Р.У. Хабриева. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Медицина, 2005. – 832 с.
39. Сейсембаев, М.А. Применение приема Прингла в хирургическом лечении пациентов с очаговыми заболеваниями печени / М.А. Сейсембаев, Б.Б. Баймаханов, Д.С. Токсанбаев [и др.] // Практическая медицина. – 2013. – № 2 (67). – С. 74-77.
40. Сидоров, Д.В. Анатомические резекции печени по поводу метастазов колоректального рака с использованием водоструйной диссекции паренхимы: методологические аспекты и непосредственные результаты / Д.В. Сидоров, М.В. Ложкин, Н.А. Гришин [и др.] // Онкологическая колопроктология. – 2013. – № 1. – С. 35-41.

41. Федоров, В.Д. Основные осложнения обширных резекций печени и пути их предупреждения / В.Д. Федоров, В.А. Вишневский, Н.А. Назаренко [и др.] // Бюллетень сибирской медицины. – 2007. – Т. 6, № 3. – С. 16-21.

42. Ходосовский, М.Н. Влияние нитропрусида натрия на кислородсвязывающие свойства крови при ишемии-реперфузии печени у кроликов / М.Н. Ходосовский, В.В. Зинчук // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2012. – Т. 98, № 5. – С. 610-617.

43. Ходосовский, М.Н. Влияние нитропрусида натрия на прооксидантно-антиоксидантную систему печени при ее ишемии-реперфузии у кроликов / М.Н. Ходосовский // Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя медыцынскіх навук. – 2008. – № 3. – С. 23-27.

44. Ходосовский, М.Н. Коррекция окислительных повреждений при синдроме ишемии-реперфузии печени / М.Н. Ходосовский // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2016. – № 4 (56). – С. 20-25.

45. Ходосовский, М.Н. Роль NO-зависимых механизмов в реализации антиоксидантных эффектов мелатонина при ишемии-реперфузии печени / М.Н. Ходосовский, В.В. Зинчук // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2014. – Т. 77, № 6. – С. 33-38.

46. Хубутя, М.Ш. Трансплантация печени как радикальный метод лечения конечных стадий заболеваний печени / М.Ш. Хубутя, А.В. Чжао, К.Р. Джаграев [и др.] // Практическая медицина. – 2010. – № 8 (47). – С. 13-19.

47. Хубутя, М.Ш. Трансплантация печени при ее злокачественных поражениях / М.Ш. Хубутя, А.А. Салиенко, А.В. Чжао // Анналы хирургической гепатологии. – 2011. – Т. 16, № 1. – С. 17-22.

48. Цвиркун, В.В. Резолюция XIII Международного конгресса хирургов-гепатологов стран СНГ «Актуальные проблемы хирургической гепатологии» / В.В. Цвиркун, И.М. Буриев, В.П. Глабай [и др.] // Анналы хирургической гепатологии. – 2006. – Т. 11, № 4. – С. 113-115.

49. Цвиркун, В.В. Эндовидеохирургические технологии резекций печени / В.В. Цвиркун, И.Е. Хатьков, Р.Е. Израилов [и др.] // *Анналы хирургической гепатологии*. – 2010. – Т. 15, № 2. – С. 38-45.
50. Цымбалюк, И.Ю. Динамика метаболических показателей при частичной сосудистой изоляции печени у крыс / И.Ю. Цымбалюк, К.А. Попов, Е.Е. Есауленко [и др.] // *Кубанский научный медицинский вестник*. – 2016. – № 3 (158). – С. 137-144.
51. Цымбалюк, И.Ю. Изменения в системе глутатиона при интраоперационной ишемии печени у крыс / И.Ю. Цымбалюк, К.А. Попов, К.И. Мелконян [и др.] // *Современные проблемы науки и образования* [Электронный ресурс]. – Электрон. журн. – 2015. – № 5. – URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=21775> (дата обращения: 20.03.2018).
52. Шуркалин, Б.К. Руководство по экспериментальной хирургии: монография / Б.К. Шуркалин, В.А. Горский, А.П. Фаллер. – М.: Атмосфера, 2010. – 174 с.
53. Щерба, А.Е. Резекция печени в условиях гипотермической консервации / А.Е. Щерба, Л.В. Кирковский, А.М. Дзядзько [и др.] // *Новости хирургии*. – 2012. – Т. 20, № 6. – С. 45-52.
54. Юрлевич, Д.И. Применение селективной сосудистой изоляции в хирургии печени / Д.И. Юрлевич, Л.В. Кирковский, С.В. Коротков [и др.] // *Новости хирургии*. – 2008. – Т. 16, № 4. – С. 126-130.
55. Ярошенко, И.Ф. Патогенез ишемии-реперфузии печени (обзор литературы) / И.Ф. Ярошенко, Т.Ю. Каланчина // *Бюллетень Волгоградского научного центра Российской академии медицинских наук и Администрации Волгоградской области*. – 2006. – № 1. – С. 29-34.
56. Abdalla, E.K. Hepatic vascular occlusion: which technique? / E.K. Abdalla, R. Noun, J. Belghiti // *Surgical Clinics of North America*. – 2004. – Vol. 84, № 2. – P. 563-585.

57. Abu-Amara, M. Liver ischemia/reperfusion injury: processes in inflammatory networks – a review / M. Abu-Amara, S.Y. Yang, N. Tapuria [et al.] // *Liver Transplantation*. – 2010. – Vol. 16, № 9. – P. 1016-1032.
58. Abu-Amara, M. The nitric oxide pathway – evidence and mechanisms for protection against liver ischaemia reperfusion injury / M. Abu-Amara, S.Y. Yang, A. Seifalian [et al.] // *Liver International*. – 2012. – Vol. 32, № 4. – P. 531-543.
59. Agbenyega, T. Population kinetics, efficacy, and safety of dichloroacetate for lactic acidosis due to severe malaria in children / T. Agbenyega, T. Planche, G. Bedu-Addo [et al.] // *The Journal of Clinical Pharmacology*. – 2003. – Vol. 43, № 4. – P. 386-396.
60. Alkozai, E.M. Bleeding in liver surgery: prevention and treatment / E.M. Alkozai, T. Lisman, R.J. Porte // *Clinics in Liver Disease*. – 2009. – Vol. 13, № 1. – P. 145-154.
61. Ammini, C.V. Biotransformation, toxicology and pharmacogenomics of dichloroacetate / C.V. Ammini, P.W. Stacpoole // *The Handbook of Environmental Chemistry*. – 2003. – Vol. 3. – Part P. – P. 215-234.
62. Aragon, R.J. Techniques of hepatic resection / R.J. Aragon, N.L. Solomon // *Journal of Gastrointestinal Oncology*. – 2012. – Vol. 3, № 1. – P. 28-40.
63. Benzoni, E. Liver resective surgery: a multivariate analysis of postoperative outcome and complication / E. Benzoni, A. Cojutti, D. Lorenzin [et al.] // *Langenbeck's Archives of Surgery*. – 2007. – Vol. 392, № 1. – P. 45-54.
64. Bonnet, S. A mitochondria-K<sup>+</sup> channel axis is suppressed in cancer and its normalization promotes apoptosis and inhibits cancer growth / S. Bonnet, S.L. Archer, J. Allalunis-Turner [et al.] // *Cancer Cell*. – 2007. – Vol. 11, № 1. – P. 37-51.
65. Brandsma, D. Severe encephalopathy and polyneuropathy induced by dichloroacetate / D. Brandsma, T.P. Dorlo, J.H. Haanen [et al.] // *Journal of Neurology*. – 2010. – Vol. 257, № 12. – P. 2099-2100.
66. Brenner, C. Decoding cell death signals in liver inflammation / C. Brenner, L. Galluzzi, O. Kepp [et al.] // *Journal of Hepatology*. – 2013. – Vol. 59, № 3. – P. 583-594.

67. Bykov, M.I. Change of parameters in prooxidant-antioxidant bile system in patients with the obstruction of bile-excreting ducts / M.I. Bykov, A.A. Basov // *Medical News of North Caucasus*. – 2015. – Vol. 10, № 2. – P. 131-135.
68. Bykova, N.I. Non-invasive monitoring for local immune and antioxidant resistance in patients with ischemic heart disease and type 2 diabetes / N.I. Bykova, A.A. Basov, K.I. Melkonyan [et al.] // *Medical News of North Caucasus*. – 2016. – Vol. 11, № 2. – P. 147-149.
69. Calvert, L.D. Dichloroacetate enhances performance and reduces blood lactate during maximal cycle exercise in chronic obstructive pulmonary disease / L.D. Calvert, R. Shelley, S.J. Singh [et al.] // *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. – 2008. – Vol. 177, № 10. – P. 1090-1094.
70. Cannistrà, M. Hepatic ischemia reperfusion injury: a systematic review of literature and the role of current drugs and biomarkers / M. Cannistrà, M. Ruggiero, A. Zullo [et al.] // *International Journal of Surgery*. – 2016. – Vol. 33. – Suppl. 1. – P. S57-S70.
71. Cao, L. Mechanism of hepatocyte apoptosis / L. Cao, X.-B. Quan, W.J. Zeng [et al.] // *Journal of Cell Death*. – 2016. – Vol. 9. – P. 19-29.
72. Celinski, S.A. Hepatic resection nomenclature and techniques / S.A. Celinski, T.C. Gamblin // *Surgical Clinics of North America*. – 2010. – Vol. 90, № 4. – P. 737-748.
73. Curry, S.H. Disposition and pharmacodynamics of dichloroacetate (DCA) and oxalate following oral DCA doses / S.H. Curry, A. Lorenz, P.I. Chu [et al.] // *Biopharmaceutics & Drug Disposition*. – 1991. – Vol. 12, № 5. – P. 375-390.
74. Curry, S.H. Haemodialysis studies with dichloroacetate / S.H. Curry, A. Lorenz, G.N. Henderson [et al.] // *European Journal of Clinical Pharmacology*. – 1991. – Vol. 40, № 6. – P. 613-617.
75. Datta, G. Molecular mechanisms of liver ischemia reperfusion injury: insights from transgenic knockout models / G. Datta, B.J. Fuller, B.R. Davidson // *World Journal of Gastroenterology*. – 2013. – Vol. 19, № 11. – P. 1683-1698.

76. D'Ignazio, L. NF- $\kappa$ B and HIF crosstalk in immune responses / L. D'Ignazio, D. Bandarra, S. Rocha // *The FEBS Journal*. – 2016. – Vol. 283, № 3. – P. 413-424.
77. Donadon, M. Pharmacological modulation of ischemic-reperfusion injury during Pringle maneuver in hepatic surgery. A prospective randomized pilot study / M. Donadon, A.F. Molinari, F. Corazzi [et al.] // *World Journal of Surgery*. – 2016. – Vol. 40, № 9. – P. 2202-2212.
78. Duncan, G.E. Dichloroacetate therapy attenuates the blood lactate response to submaximal exercise in patients with defects in mitochondrial energy metabolism / G.E. Duncan, L.A. Perkins, D.W. Theriaque [et al.] // *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. – 2004. – Vol. 89, № 4. – P. 1733-1738.
79. Fereidoonzhad, M. Novel approach synthesis, molecular docking and cytotoxic activity evaluation of N-phenyl-2,2-dichloroacetamide derivatives as anticancer agents / M. Fereidoonzhad, Z. Faghih, A. Mojaddami [et al.] // *Journal of Sciences, Islamic Republic of Iran*. – 2016. – Vol. 27, № 1. – P. 39-49.
80. Fisher, R.A. Statistical methods for research workers / R.A. Fisher. – 6th ed. – New Delhi: Cosmo, 2006. – 354 p.
81. Flavin, D.F. Non-Hodgkin's lymphoma reversal with dichloroacetate / D.F. Flavin // *Journal of Oncology*. – 2010. – Vol. 2010. – Article ID 414726. – 4 p.
82. Gomes, H.M.P. Unfeasible experimental model of normothermic hepatic ischemia and reperfusion in rats using the Pringle maneuver / H.M.P. Gomes, L.C. Serigiolle, D.A.B. Rodrigues [et al.] // *Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva*. – 2014. – Vol. 27, № 3. – P. 196-200.
83. Guan, L.-Y. Mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and protective effects of nitric oxide / L.-Y. Guan, P.-Y. Fu, P.-D. Li [et al.] // *World Journal of Gastrointestinal Surgery*. – 2014. – Vol. 6, № 7. – P. 122–128.
84. Gurusamy, K.S. Current protective strategies in liver surgery / K.S. Gurusamy, H.D. Gonzalez, B.R. Davidson // *World Journal of Gastroenterology*. – 2010. – Vol. 16, № 48. – P. 6098-6103.

85. Gurusamy, K.S. Methods of vascular occlusion for elective liver resections / K.S. Gurusamy, H. Sheth, Y. Kumar [et al.] // *Cochrane Database of Systematic Reviews*. – 2009. – № 1. – Art. No.: CD007632. – 101 p.
86. Gurusamy, K.S. Techniques for liver parenchymal transection in liver resection / K.S. Gurusamy, V. Pamecha, D. Sharma [et al.] // *Cochrane Database of Systematic Reviews*. – 2009. – № 1. – Art. No.: CD006880. – 82 p.
87. Gurusamy, K.S. Vascular occlusion for elective liver resections / K.S. Gurusamy, Y. Kumar, R. Ramamoorthy [et al.] // *Cochrane Database of Systematic Reviews*. – 2009. – № 1. – Art. No.: CD007530. – 49 p.
88. Henderson, G.N. Kinetics and metabolism of chloral hydrate in children: identification of dichloroacetate as a metabolite / G.N. Henderson, Z. Yan, M.O. James [et al.] // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 1997. – Vol. 235, № 3. – P. 695-698.
89. Hoekstra, L.T. Vascular occlusion or not during liver resection: the continuing story / L.T. Hoekstra, J.D. van Trigt, M.J. Reiniers [et al.] // *Digestive Surgery*. – 2012. – Vol. 29, № 1. – P. 35-42.
90. Hogarth Pringle, J. Notes on the arrest of hepatic hemorrhage due to trauma / J. Hogarth Pringle // *Annals of Surgery*. – 1908. – Vol. 48, № 4. – P. 541-549.
91. Ishiguro, T. Co-treatment of dichloroacetate, omeprazole and tamoxifen exhibited synergistically antiproliferative effect on malignant tumors: in vivo experiments and a case report / T. Ishiguro, R. Ishiguro, M. Ishiguro [et al.] // *Hepatogastroenterology*. – 2012. – Vol. 59, № 116. – P. 994-996.
92. Jackson, V.N. The kinetics, substrate, and inhibitor specificity of the monocarboxylate (lactate) transporter of rat liver cells determined using the fluorescent intracellular pH indicator, 2',7'-bis(carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein / V.N. Jackson, A.P. Halestrap // *Journal of Biological Chemistry*. – 1996. – Vol. 271, № 2. – P. 861-868.
93. Jaeschke, H. Current strategies to minimize hepatic ischemia-reperfusion injury by targeting reactive oxygen species / H. Jaeschke, B.L. Woolbright // *Transplantation Reviews*. – 2012. – Vol. 26, № 2. – P. 103-114.

94. Jaeschke, H. Reperfusion injury after warm ischemia or cold storage of the liver: role of apoptotic cell death / H. Jaeschke // *Transplantation Proceedings*. – 2002. – Vol. 34, № 7. – P. 2656-2658.
95. Jarnagin, W.R. Improvement in perioperative outcome after hepatic resection: analysis of 1,803 consecutive cases over the past decade / W.R. Jarnagin, M. Gonen, Y. Fong [et al.] // *Annals of Surgery*. – 2002. – Vol. 236, № 4. – P. 397-407.
96. 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*. – 2011. – Vol. 13, № 2. – P. 71-78.
97. Jin, L.-M. Ischemic preconditioning attenuates morphological and biochemical changes in hepatic ischemia/reperfusion in rats / L.-M. Jin, Y.-X. Liu, L. Zhou [et al.] // *Pathobiology*. – 2010. – Vol. 77, № 3. – P. 136-146.
98. Kaufmann, P. Dichloroacetate causes toxic neuropathy in MELAS: a randomized, controlled clinical trial / P. Kaufmann, K. Engelstad, Y. Wei [et al.] // *Neurology*. – 2006. – Vol. 66, № 3. – P. 324-330.
99. Khan, A. Case report of long term complete remission of metastatic renal squamous cell carcinoma after palliative radiotherapy and adjuvant dichloroacetate / A. Khan // *Advances in Cancer: Research & Treatment*. – 2012. – Vol. 2012. – Article ID 441895. – 7 p.
100. Knoechel, T.R. Regulatory roles of the N-terminal domain based on crystal structures of human pyruvate dehydrogenase kinase 2 containing physiological and synthetic ligands / T.R. Knoechel, A.D. Tucker, C.M. Robinson [et al.] // *Biochemistry*. – 2006. – Vol. 45, № 2. – P. 402-415.
101. Kolesnichenko, L.S. Influence of changes in glutathione concentration on body temperature and tolerance to cerebral ischemia / L.S. Kolesnichenko, V.I. Kulinsky, G.V. Sotnikova [et al.] // *Biochemistry (Moscow)*. – 2003. – Vol. 68, № 5. – P. 534-540.
102. Koneru, B. Ischemic preconditioning in deceased donor liver transplantation: a prospective randomized clinical trial of safety and efficacy /

B. Koneru, A. Fisher, Y. He [et al.] // *Liver Transplantation*. – 2005. – Vol. 11, № 2. – P. 196-202.

103. Kuo, K.K. NO donor KMUP-1 improves hepatic ischemia-reperfusion and hypoxic cell injury by inhibiting oxidative stress and pro-inflammatory signaling / K.K. Kuo, B.N. Wu, E.Y. Chiu [et al.] // *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*. – 2013. – Vol. 26, № 1. – P. 93-106.

104. Lewis, J.F. Effects of dichloroacetate in patients with congestive heart failure / J.F. Lewis, M. DaCosta, T. Wargowich [et al.] // *Clinical Cardiology*. – 1998. – Vol. 21, № 12. – P. 888-892.

105. Li, B. Cell apoptosis and Fas gene expression in liver and renal tissues after ischemia-reperfusion injury in liver transplantation / B. Li, B. Chen, G. Zhang [et al.] // *Transplantation Proceedings*. – 2010. – Vol. 42, № 5. – P. 1550-1556.

106. Li, J. The mechanisms and strategies to protect from hepatic ischemia-reperfusion injury / J. Li, R.-J. Li, G.-Y. Lv [et al.] // *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. – 2015. – Vol. 19, № 11. – P. 2036-2047.

107. Li, T. Quantitative evaluation of dichloroacetic acid kinetics in human – a physiologically based pharmacokinetic modeling investigation / T. Li, I. Schultz, D.A. Keys [et al.] // *Toxicology*. – 2008. – Vol. 245, № 1. – P. 35-48.

108. Liu, B. Cytoprotective role of heme oxygenase-1 in liver ischemia reperfusion injury / B. Liu, J.M. Qian // *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*. – 2015. – Vol. 8, № 11. – P. 19867-19873.

109. Ludvik, B. Effects of dichloroacetate and bicarbonate on haemodynamic parameters in healthy volunteers / B. Ludvik, G. Peer, A. Berzlanovich [et al.] // *Clinical Science*. – 1991. – Vol. 80, № 1. – P. 47-51.

110. Manzini, G. Reperfusion of liver graft during transplantation: techniques used in transplant centres within Eurotransplant and meta-analysis of the literature / G. Manzini, M. Kremer, P. Houben [et al.] // *Transplant International*. – 2013. – Vol. 26, № 5. – P. 508-516.

111. Maurer, C.A. Liver resections can be performed safely without Pringle maneuver: a prospective study / C.A. Maurer, M. Walensi, S.A. Käser [et al.] // *World Journal of Hepatology*. – 2016. – Vol. 8, № 24. – P. 1038-1046.
112. Mendes-Braz, M. The current state of knowledge of hepatic ischemia-reperfusion injury based on its study in experimental models / M. Mendes-Braz, M. Elias-Miró, M.B. Jiménez-Castro [et al.] // *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. – 2012. – Vol. 2012. – Article ID 298657. – 20 p.
113. 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 // *Journal of Natural Science, Biology and Medicine*. – 2015. – Vol. 6, № 2. – P. 351-355.
114. Michelakis, E.D. Dichloroacetate (DCA) as a potential metabolic-targeting therapy for cancer / E.D. Michelakis, L. Webster, J.R. Mackey // *British Journal of Cancer*. – 2008. – Vol. 99, № 7. – P. 989-994.
115. Miller, J.W. Characterization of nonvolatile aqueous chlorination products of humic substances / J.W. Miller, P.C. Uden // *Environmental Science & Technology*. – 1983. – Vol. 17, № 3. – P. 150-157.
116. *Mitochondria in pathogenesis* / edited by J.J. Lemasters, A.-L. Nieminen. – New York; London: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2001. – 529 p.
117. Peralta, C. Hepatic ischemia and reperfusion injury: effects on the liver sinusoidal milieu / C. Peralta, M.B. Jiménez-Castro, J. Gracia-Sancho // *Journal of Hepatology*. – 2013. – Vol. 59, № 5. – P. 1094-1106.
118. Ribes, G. Metabolic effects of sodium dichloroacetate in normal and diabetic dogs / G. Ribes, G. Valette, M.-M. Loubatières-Mariani // *Diabetes*. – 1979. – Vol. 28, № 9. – P. 852-857.
119. Robinson, S.M. N-acetylcysteine administration does not improve patient outcome after liver resection / S.M. Robinson, R. Saif, G. Sen [et al.] // *HPB*. – 2013. – Vol. 15, № 6. – P. 457-462.
120. Roche, T.E. Pyruvate dehydrogenase kinase regulatory mechanisms and inhibition in treating diabetes, heart ischemia, and cancer / T.E. Roche, Y. Hiromasa // *Cellular and Molecular Life Sciences*. – 2007. – Vol. 64. – P. 830-849.

121. Roh, J.-L. Activation of mitochondrial oxidation by PDK2 inhibition reverses cisplatin resistance in head and neck cancer / J.-L. Roh, J.Y. Park, E.H. Kim [et al.] // *Cancer Letters*. – 2016. – Vol. 371, № 1. – P. 20-29.
122. Saidi, R.F. Liver ischemia/reperfusion injury: an overview / R.F. Saidi, S.K.H. Kenari // *Journal of Investigative Surgery*. – 2014. – Vol. 27, № 6. – P. 366-379.
123. Salamon, S. Glucose metabolism in cancer and ischemia: possible therapeutic consequences of the Warburg effect / S. Salamon, E. Podbregar, P. Kubatka [et al.] // *Nutrition and Cancer*. – 2017. – Vol. 69, № 2. – P. 177-183.
124. Schmidt, R. Hepatic organ protection: from basic science to clinical practice / R. Schmidt // *World Journal of Gastroenterology*. – 2010. – Vol. 16, № 48. – P. 6044-6045.
125. Semenza, G.L. A compendium of proteins that interact with HIF-1 $\alpha$  / G.L. Semenza // *Experimental Cell Research*. – 2017. – Vol. 356, № 2. – P. 128-135.
126. Shao, Z. Prevention of TLR9 pathway in warm ischemia in porcine donor liver after cardiac death / Z. Shao, B. Jiao, D. Yi [et al.] // *Cellular Physiology and Biochemistry*. – 2017. – Vol. 41, № 4. – P. 1547-1554.
127. Shen, Y.-C. Activating oxidative phosphorylation by a pyruvate dehydrogenase kinase inhibitor overcomes sorafenib resistance of hepatocellular carcinoma / Y.-C. Shen, D.-L. Ou, C. Hsu [et al.] // *British Journal of Cancer*. – 2013. – Vol. 108, № 1. – P. 72-81.
128. Shirabe, K. Risk factors for massive bleeding during major hepatectomy / K. Shirabe, K. Kajiyama, N. Harimoto [et al.] // *World Journal of Surgery*. – 2010. – Vol. 34, № 7. – P. 1555-1562.
129. Shroads, A.L. Age-dependent kinetics and metabolism of dichloroacetate: possible relevance to toxicity / A.L. Shroads, X. Guo, V. Dixit [et al.] // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. – 2008. – Vol. 324, № 3. – P. 1163-1171.
130. Song, A.T.W. Liver transplantation: fifty years of experience / A.T.W. Song, V.I. Avelino-Silva, R.A.A. Pecora [et al.] // *World Journal of Gastroenterology*. – 2014. – Vol. 20, № 18. – P. 5363-5374.

131. Song, X. Combined preconditioning and postconditioning provides synergistic protection against liver ischemic reperfusion injury / X. Song, N. Zhang, H. Xu [et al.] // *International Journal of Biological Sciences*. – 2012. – Vol. 8, № 5. – P. 707-718.

132. Stacpoole, P.W. A controlled clinical trial of dichloroacetate for treatment of lactic acidosis in adults / P.W. Stacpoole, E.C. Wright, T.G. Baumgartner [et al.] // *The New England Journal of Medicine*. – 1992. – Vol. 327, № 22. – P. 1564-1569.

133. Stacpoole, P.W. Controlled clinical trial of dichloroacetate for treatment of congenital lactic acidosis in children / P.W. Stacpoole, D.S. Kerr, C. Barnes [et al.] // *Pediatrics*. – 2006. – Vol. 117, № 5. – P. 1519-1531.

134. Stacpoole, P.W. Efficacy of dichloroacetate as a lactate-lowering drug / P.W. Stacpoole, N.V. Nagaraja, A.D. Hutson // *Journal of Clinical Pharmacology*. – 2003. – Vol. 43, № 7. – P. 683-691.

135. Stacpoole, P.W. Evaluation of long-term treatment of children with congenital lactic acidosis with dichloroacetate / P.W. Stacpoole, L.R. Gilbert, R.E. Neiberger [et al.] // *Pediatrics*. – 2008. – Vol. 121, № 5. – P. e1223-e1228.

136. Stacpoole, P.W. Metabolic effects of dichloroacetate in patients with diabetes mellitus and hyperlipoproteinemia / P.W. Stacpoole, G.W. Moore, D.M. Kornhauser // *The New England Journal of Medicine*. – 1978. – Vol. 298, № 10. – P. 526-530.

137. Stacpoole, P.W. Pharmacokinetics, metabolism and toxicology of dichloroacetate / P.W. Stacpoole, G.N. Henderson, Z. Yan [et al.] // *Drug Metabolism Reviews*. – 1998. – Vol. 30, № 3. – P. 499-539.

138. Stacpoole, P.W. Review of the pharmacologic and therapeutic effects of diisopropylammonium dichloroacetate (DIPA) / P.W. Stacpoole // *Journal of Clinical Pharmacology and Journal of New Drugs*. – 1969. – Vol. 9, № 5. – P. 282-291.

139. Stacpoole, P.W. Role of dichloroacetate in the treatment of genetic mitochondrial diseases / P.W. Stacpoole, T.L. Kurtz, Z. Han [et al.] // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2008. – Vol. 60, № 13-14. – P. 1478-1487.

140. Stacpoole, P.W. The dichloroacetate dilemma: environmental hazard versus therapeutic goldmine – both or neither? / P.W. Stacpoole // *Environmental Health Perspectives*. – 2011. – Vol. 119, № 2. – P. 155-158.
141. Stacpoole, P.W. The pharmacology of dichloroacetate / P.W. Stacpoole // *Metabolism: Clinical and Experimental*. – 1989. – Vol. 38, № 11. – P. 1124-1144.
142. Stacpoole, P.W. Treatment of congenital lactic acidosis with dichloroacetate / P.W. Stacpoole, C.L. Barnes, M.D. Hurbanis [et al.] // *Archives of Disease in Childhood*. – 1997. – Vol. 77, № 6. – P. 535-541.
143. Strum, S.B. Case report: sodium dichloroacetate (DCA) inhibition of the "Warburg effect" in a human cancer patient: complete response in non-Hodgkin's lymphoma after disease progression with rituximab-CHOP / S.B. Strum, O. Adalsteinsson, R.R. Black [et al.] // *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. – 2013. – Vol. 45, № 3. – P. 307-315.
144. Sun, H. Suppression of pyruvate dehydrogenase kinase-2 re-sensitizes paclitaxel-resistant human lung cancer cells to paclitaxel / H. Sun, A. Zhu, X. Zhou [et al.] // *Oncotarget*. – 2017. – Vol. 8, № 32. – P. 52642-52650.
145. Sun, L. Metabolic analysis of radioresistant medulloblastoma stem-like clones and potential therapeutic targets / L. Sun, T. Moritake, K. Ito [et al.] // *PLoS One*. – 2017. – Vol. 12, № 4. – e0176162.
146. Sun, R.C. Reversal of the glycolytic phenotype by dichloroacetate inhibits metastatic breast cancer cell growth in vitro and in vivo / R.C. Sun, M. Fadia, J.E. Dahlstrom [et al.] // *Breast Cancer Research and Treatment*. – 2010. – Vol. 120, № 1. – P. 253-260.
147. Sun, Y. Dichloroacetate treatment improves mitochondrial metabolism and reduces brain injury in neonatal mice / Y. Sun, T. Li, C. Xie [et al.] // *Oncotarget*. – 2016. – Vol. 7, № 22. – P. 31708-31722.
148. Treatment of cerebral ischemia with dichloroacetate: patent number 4,631,294 United States of America: Int. Cl. A61K 31/19 / W.G. Barsan; assignee University E.M., Inc., Cincinnati, Ohio. – Appl. No. 752,091; filed Jul. 5, 1985; date of patent Dec. 23, 1986. – 4 p.

149. Treatment of hyperlipoproteinemia with a dichloroacetate salt: patent number 4,122,188 United States of America: Int. Cl. A61K 31/19 / P.W. Stacpoole; assignee Vanderbilt University, Nashville, Tenn. – Appl. No. 828,677; filed Aug. 29, 1977; date of patent Oct. 24, 1978. – 3 p.

150. Uhlmann, D. Endothelin-A receptor blockade improves postischemic hepatic microhemodynamics / D. Uhlmann, S. Glasser, H. Lauer [et al.] // *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. – 2004. – Vol. 44. – Suppl. 1. – P. S103-S104.

151. van der Bilt, J.D.W. European survey on the application of vascular clamping in liver surgery / J.D.W. van der Bilt, D.P. Livestro, A. Borren [et al.] // *Digestive Surgery*. – 2007. – Vol. 24, № 6. – P. 423-435.

152. van der Bilt, J.D.W. Ischemia/reperfusion accelerates the outgrowth of hepatic micrometastases in a highly standardized murine model / J.D.W. van der Bilt, O. Kranenburg, M.W. Nijkamp [et al.] // *Hepatology*. – 2005. – Vol. 42, № 1. – P. 165-175.

153. Walsh, K.B. Inflammatory mediators of liver ischemia-reperfusion injury / K.B. Walsh, A.H. Toledo, F.A. Rivera-Chavez [et al.] // *Experimental and Clinical Transplantation*. – 2009. – Vol. 7, № 2. – P. 78-93.

154. Wang, F. Remote ischemic preconditioning by hindlimb occlusion prevents liver ischemic/reperfusion injury: the role of High Mobility Group-Box 1 / F. Wang, S.E. Birch, R. He [et al.] // *Annals of Surgery*. – 2010. – Vol. 251, № 2. – P. 292-299.

155. Wargovich, T.J. Myocardial metabolic and hemodynamic effects of dichloroacetate in coronary artery disease / T.J. Wargovich, R.G. MacDonald, J.A. Hill [et al.] // *The American Journal of Cardiology*. – 1988. – Vol. 61, № 1. – P. 65-70.

156. Washington, J.T. Dichloroacetate induces different rates of cell death in cancer and noncancer cell lines in vitro / J.T. Washington, N.J. Quintyne // *Tumori Journal*. – 2012. – Vol. 98, № 1. – P. 142-151.

157. Wei, A.C. Risk factors for perioperative morbidity and mortality after extended hepatectomy for hepatocellular carcinoma / A.C. Wei, R. Tung-Ping Poon, S.-T. Fan [et al.] // *British Journal of Surgery*. – 2003. – Vol. 90, № 1. – P. 33-41.

158. Weigand, K. Ischemia/reperfusion injury in liver surgery and transplantation: pathophysiology / K. Weigand, S. Brost, N. Steinebrunner [et al.] // *HPB Surgery*. – 2012. – Vol. 2012. – Article ID 176723. – 8 p.
159. Xiao, H. A dual-targeting hybrid platinum (IV) prodrug for enhancing efficacy / H. Xiao, L. Yan, Y. Zhang [et al.] // *Chemical Communications*. – 2012. – Vol. 48, № 87. – P. 10730-10732.
160. Yoon, S.-Y. Protective effect of ischemic postconditioning against hepatic ischemic reperfusion injury in rat liver / S.-Y. Yoon, C.Y. Kim, H.J. Han [et al.] // *Annals of Surgical Treatment and Research*. – 2015. – Vol. 88, № 5. – P. 241-245.
161. Yoshimoto, M. Effectiveness of the LigaSure Small Jaw vessel-sealing system in hepatic resection / M. Yoshimoto, K. Endo, T. Hanaki [et al.] // *Yonago Acta Medica*. – 2014. – Vol. 57, № 2. – P. 93-98.
162. Zajac, J. Potentiation of mitochondrial dysfunction in tumor cells by conjugates of metabolic modulator dichloroacetate with a Pt(IV) derivative of oxaliplatin / J. Zajac, H. Kostrhunova, V. Novohradsky [et al.] // *Journal of Inorganic Biochemistry*. – 2016. – Vol. 156. – P. 89-97.
163. Zhai, Y. Ischaemia-reperfusion injury in liver transplantation – from bench to bedside / Y. Zhai, H. Petrowsky, J.C. Hong [et al.] // *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*. – 2013. – Vol. 10, № 2. – P. 79-89.

**П Р И Л О Ж Е Н И Я**

## РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



## ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2644305

**СПОСОБ СНИЖЕНИЯ ГЕПАТОЦИТОЛИЗА В  
УСЛОВИЯХ ЧАСТИЧНОЙ СОСУДИСТОЙ ИЗОЛЯЦИИ  
ПЕЧЕНИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

Патентообладатели: *Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Кубанский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации, ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России (RU), Цымбалюк Игорь Юрьевич (RU), Мануйлов Александр Михайлович (RU), Басов Александр Александрович (RU), Попов Константин Андреевич (RU), Хубиева Фатима Умаровна (RU)*

Авторы: *см. на обороте*

Заявка № 2017101902

Приоритет изобретения 20 января 2017 г.

Дата государственной регистрации в

Государственном реестре изобретений

Российской Федерации 08 февраля 2018 г.

Срок действия исключительного права

на изобретение истекает 20 января 2037 г.

Руководитель Федеральной службы  
по интеллектуальной собственности

*Г.П. Ивлиев* Г.П. Ивлиев





ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«КУБАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
(ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России)

350063, г. Краснодар, ул. Седина, 4 тел. (861)268-36-84 факс (861)268-32-84 e-mail: [corpus@ksma.ru](mailto:corpus@ksma.ru)  
ИНН 2309023448 КПП 230901001 БИК 040349001

№ \_\_\_\_\_ от " \_\_\_\_\_ " \_\_\_\_\_ 2017 г.

на № \_\_\_\_\_ от « \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2017 г.



**УТВЕРЖДАЮ**

Проректор по научно-исследовательской  
работе ФГБОУ ВО КубГМУ  
Минздрава России д.м.н., профессор

А.Н. Редько

« \_\_\_\_\_ » 20 17 г.

**АКТ**

об использовании предложения

Наименование предложения: «Способ профилактики ишемически-реперфузионных нарушений печени при ее васкулярной эксклюзии в эксперименте».

Наименование научно-исследовательской работы, в рамках которой разработано предложение: кандидатская диссертация «Коррекция патобиохимических изменений при васкулярной эксклюзии печени с использованием дихлорацетата натрия (экспериментальное исследование)».

Исполнитель: аспирант кафедры хирургии № 2 ФПК и ППС ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России Цымбалюк Игорь Юрьевич.

Научные руководители: заведующий кафедрой хирургии № 2 ФПК и ППС доктор медицинских наук, профессор А.М. Мануйлов; профессор кафедры фундаментальной и клинической биохимии доктор медицинских наук, доцент А.А. Басов.

Дата использования предложения: с мая 2017 года.

Эффективность внедрения: предложенный способ может служить одним из методов моделирования ишемически-реперфузионного повреждения печени и последующего исследования возможностей метаболической коррекции патобиохимических изменений с использованием цитопротективного средства (дихлорацетата натрия).

Заведующая Центральной  
научно-исследовательской лабораторией  
ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России  
д.б.н., профессор

Автор предложения



*(Handwritten signatures in blue ink)*

Н.В. Колесникова

И.Ю. Цымбалюк

**Федеральное государственное бюджетное научное учреждение  
«Научно-исследовательский институт медицинской приматологии»  
(ФГБНУ «НИИ МП»)**

ОКПО 21056447 ОГРН 1022302721484 ИНН/КПП 2317006252/231701001  
Российская Федерация, 354376, Краснодарский край, г.Сочи, Аллерский р-н, с.Весёлое, ул.Мира, д.177  
Тел./факс (862) 243-20-28, e-mail: mail@primatologia.ru, primatologia@ramn.ru, web:www.primatologia.ru

№ \_\_\_\_\_  
УТВЕРЖДАЮ  
Заместитель директора по науке  
Федерального государственного бюджетного  
научного учреждения  
«Научно-исследовательский институт  
медицинской приматологии»  
О.И. Вышемирский  
» \_\_\_\_\_ 20 \_\_\_\_ г.  
И.И. Чугуева  
И.Ю. Цымбалюк  
Акт  
об использовании предложения

Наименование предложения: «Способ снижения гепатоцитолита в условиях частичной сосудистой изоляции печени в эксперименте».

Наименование научно-исследовательской работы, в рамках которой разработано предложение: кандидатская диссертация «Коррекция патобиохимических изменений при васкулярной эксклюзии печени с использованием дихлорацетата натрия (экспериментальное исследование)».

Исполнитель: аспирант кафедры хирургии № 2 ФПК и ППС ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России Цымбалюк Игорь Юрьевич.

Научные руководители: заведующий кафедрой хирургии № 2 ФПК и ППС ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России доктор медицинских наук, профессор А.М. Мануйлов; профессор кафедры фундаментальной и клинической биохимии ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России доктор медицинских наук, доцент А.А. Басов.

Дата использования предложения: с апреля 2017 года.

Эффективность внедрения: предложенный способ позволяет достичь эффективной метаболической коррекции цитолитического синдрома с использованием дихлорацетата натрия при превентивной васкулярной эксклюзии печени.

Ветеринарный врач клиническо-ветеринарного  
отделения ФГБНУ «НИИ  
медицинской приматологии»

Автор предложения

*Чугуева*  
*Цымбалюк*

И.И. Чугуева

И.Ю. Цымбалюк



ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
**«КУБАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**  
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
(ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России)

350063, г. Краснодар, ул. Седина, 4 тел. (861)268-36-84 факс (861)268-32-84 e-mail: [corpus@ksma.ru](mailto:corpus@ksma.ru)  
ИНН 2309023448 КПП 230901001 БИК 040349001

№ \_\_\_\_\_ от " \_\_\_\_ " \_\_\_\_\_ 2017 г.

на № \_\_\_\_\_ от « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2017 г.

**УТВЕРЖДАЮ**

Проректор по лечебной работе и  
последипломному образованию  
ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России  
д.м.н.

 В.А. Крутова  
« 15 » сентября 20 17 г.

**АКТ ВНЕДРЕНИЯ**

в учебный процесс кафедры хирургии № 2 ФПК и ППС ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России результатов диссертации Цымбалюка Игоря Юрьевича на тему «Коррекция патобиохимических изменений при васкулярной эксклюзии печени с использованием дихлорацетата натрия (экспериментальное исследование)»

Комиссия в составе профессора кафедры хирургии № 2 ФПК и ППС д.м.н. И.Б. Уварова (председатель), доцента кафедры хирургии № 2 ФПК и ППС к.м.н. А.Н. Пахилиной и заведующей учебной частью, доцента кафедры хирургии № 2 ФПК и ППС к.м.н. Ф.У. Хубиевой удостоверяет, что результаты диссертационного исследования «Коррекция патобиохимических изменений при васкулярной эксклюзии печени с использованием дихлорацетата натрия (экспериментальное исследование)» аспиранта кафедры хирургии № 2 ФПК и ППС Цымбалюка Игоря Юрьевича используются в учебном процессе при разработке курсов лекций по хирургии органов брюшной полости на темы: «Объемные образования печени», «Механическая желтуха».

В течение учебного года прочитано 4 лекции, включающих аспекты диссертационного исследования И.Ю. Цымбалюка, для ординаторов первого и второго года обучения.

Профессор кафедры хирургии № 2 ФПК и ППС  
ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России  
д.м.н.



И.Б. Уваров

Доцент кафедры хирургии № 2 ФПК и ППС  
ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России  
к.м.н.



А.Н. Пахилина

Доцент кафедры хирургии № 2 ФПК и ППС  
ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России  
к.м.н.



КОПИЯ ЗАВЕРЯЮ:  
специалист по кадрам  
ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России  
  
« 15 » сентября 20 17 г.



Ф.У. Хубиева



ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«КУБАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
(ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России)

350063, г. Краснодар, ул. Седина, 4 тел. (861)268-36-84 факс (861)268-32-84 e-mail: corpus@ksma.ru  
ИНН 2309023448 КПП 230901001 БИК 040349001

№ \_\_\_\_\_ от " \_\_\_\_\_ " \_\_\_\_\_ 2017 г.

на № \_\_\_\_\_ от « \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2017 г.



**УТВЕРЖДАЮ**

Проректор по учебной и воспитательной  
работе ФГБОУ ВО КубГМУ

Минздрава России д.м.н., профессор  
Т.В. Гайворонская  
« 13 » декабря 20 17 г.

**АКТ ВНЕДРЕНИЯ**

в учебный процесс кафедры фундаментальной и клинической биохимии ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России результатов диссертации Цымбалюка Игоря Юрьевича на тему «Коррекция патобиохимических изменений при васкулярной эксклюзии печени с использованием дихлорацетата натрия (экспериментальное исследование)»

Комиссия в составе заведующего кафедрой фундаментальной и клинической биохимии д.м.н., профессора И.М. Быкова (председатель), профессора кафедры фундаментальной и клинической биохимии д.б.н., доцента Е.Е. Есауленко и заведующей учебной частью, доцента кафедры фундаментальной и клинической биохимии к.м.н., доцента С.П. Корочанской удостоверяет, что результаты диссертационного исследования «Коррекция патобиохимических изменений при васкулярной эксклюзии печени с использованием дихлорацетата натрия (экспериментальное исследование)» аспиранта кафедры хирургии № 2 ФПК и ППС Цымбалюка Игоря Юрьевича используются в учебном процессе при разработке курсов лекций по клинической биохимии на темы: «Патобиохимия окислительного стресса, значение его диагностики в клинической практике», «Эндогенная интоксикация как типовой патологический процесс».

В течение учебного года прочитано 3 лекции, включающих аспекты диссертационного исследования И.Ю. Цымбалюка, для студентов 6-го курса лечебного факультета.

Заведующий кафедрой фундаментальной и  
клинической биохимии ФГБОУ ВО КубГМУ  
Минздрава России д.м.н., профессор

И.М. Быков

Профессор кафедры фундаментальной и  
клинической биохимии ФГБОУ ВО КубГМУ  
Минздрава России д.б.н., доцент

Е.Е. Есауленко

Доцент кафедры фундаментальной и  
клинической биохимии ФГБОУ ВО КубГМУ  
Минздрава России к.м.н., доцент

С.П. Корочанская

