

## ИЗМЕНЕНИЯ В СИСТЕМЕ ГЛУТАТИОНА ПРИ ИНТРАОПЕРАЦИОННОЙ ИШЕМИИ ПЕЧЕНИ У КРЫС

Цымбалюк И.Ю., Попов К.А., Мелконян К.И., Сторожук А.П.

*ГБОУ ВПО «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Краснодар, Россия (350063, Краснодар, ул. Седина, 4); e-mail: naftalin444@mail.ru*

В результате проведенных исследований было установлено, что при интраоперационной ишемии печени у крыс, вызванной пережатием печеночно-двенадцатиперстной связки, происходят выраженные нарушения обмена глутатиона. Состояние тиолового метаболизма было изучено в эритроцитах, плазме крови и в гомогенате печени и характеризовалось содержанием восстановленного глутатиона, активностями глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы. Во всех биологических компартментах происходили похожие изменения. Так, к 10-й минуте ишемии концентрация восстановленного глутатиона в печени и эритроцитах не изменялась, а в плазме крови повышалась, активность всех ферментов повышалась в печени и эритроцитах. В дальнейшем к 15–20-й минутам ишемии происходило неуклонное снижение концентрации глутатиона во всех компартментах и прогрессирующее снижение активностей ферментов до и ниже контрольных значений. В плазме крови, кроме того, установлено снижение содержания количества общих SH-групп начиная уже с 10 минут ишемии. Такие результаты исследований позволяют говорить о значительных нарушениях в системе глутатиона, позволяют хирургам более обоснованно ограничивать время интраоперационной ишемии печени и указывают на возможные пути коррекции выявленных нарушений.

Ключевые слова: ишемия печени, глутатион, глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза

## GLUTATHIONE SYSTEM CHANGES IN RAT WITH INTRAOPERATIVE HEPATIC ISCHEMIA

Tsybalyuk I.Y., Popov K.A., Melkonyan K.I., Storozhuk A.P.

*Kuban state medical university, Krasnodar, Russia (350063, Krasnodar, M. Sedina street, 4), e-mail: naftalin444@mail.ru*

Studies found that the intraperative hepatic ischemia in rats induced by clamping hepatoduodenal ligament causes expressed metabolic disorders of glutathione. We studied thiol metabolism condition in erythrocytes, plasma and liver homogenate and it was characterized by reduced of glutathione, glutathione peroxidase and glutathione reductase contents. In all biological compartments occurred related changes after 10-minute ischemia, concentration of reduced glutathione in liver and erythrocytes didn't change, but in blood plasma it increased, activity of all enzymes increased in liver and erythrocytes. In following 15–20 minutes of ischemia there were steady decrease of concentration of glutathione in all compartments and progressive decrease in activity of enzymes and besides lower than control values. In addition we found decrease in content of common-SH groups in blood plasma starting from the 10 minutes of ischemia. These research results suggest significant violations in the system of glutathione, allow surgeons limit the time intraoperative liver ischemia more reasonably and indicate possible ways of correction the revealed violations.

Keywords: hepatic ischemia, glutathione, glutathione peroxidase, glutathione reductase

В хирургии печени большую роль играет анатомическая резекция пораженного участка, что влечет за собой огромные кровопотери. При выполнении стандартных операций на очаговых заболеваниях печени общая интраоперационная кровопотеря составляет более 900 мл [5]. В связи с этим перспективными являются бескровные или малокровные оперативные вмешательства после пережатия печеночно-двенадцатиперстной связки (ПДС) или более селективные перевязки афферентных и эфферентных сосудов печени, что влечет за собой, однако, ишемические и реперфузионные повреждения органа, несмотря на современные методы их предупреждения и коррекции. Ишемическое и реперфузионное

поражение печени со снижением ее функции является в свою очередь основой вторичных метаболических нарушений в других органах и системах. Чувствительность животных к гипоксии определяется в первую очередь состоянием баланса прооксиданты/антиоксиданты [4]. Дисбаланс в прооксидантно-антиоксидантной системе организма с явным перевесом в сторону окислительного компонента ведет к интенсификации свободнорадикального окисления биомолекул, развитию окислительного стресса [1, 11, 12]. Одной из важнейших антиоксидантных систем является система глутатиона и основных ферментов его метаболизма, таких как глутатионпероксидаза (ГПО), глутатионредуктаза (ГР) и глутатионтрансфераза. Очень низкий окислительно-восстановительный потенциал тиолдисульфидной пары от  $-300$  мВ до  $-200$  мВ, так потенциал глутатиона в растворе равен  $-240$  мВ, позволяет как низко- так и высокомолекулярным тиолсодержащим соединениям выполнять функцию мощных антиоксидантов организма, которые не только самостоятельно обрывают свободнорадикальные процессы, но и регенерируют другие компоненты антиоксидантной системы [6, 9, 13, 14].

Целью настоящей работы явилось изучение основных параметров тиолового метаболизма при острой интраоперационной ишемии печени у крыс при пережатии ПДС.

#### **Материалы и методы**

Эксперименты выполнены на 40 половозрелых нелинейных белых крысах-самцах массой 150–170 г, содержащихся в виварии ГБОУ ВПО КубГМУ Минздрава России на стандартном рационе и со свободным доступом к воде. Экспериментальную работу осуществляли в соответствии с «Правилами, принятыми в Европейской конвенции по защите позвоночных животных» (Страсбург, 1986). Под общей анестезией Золетилом 100 по схеме 15 мг/кг внутримышечно («Virbac», Франция) осуществлялась лапаротомия, выделялась ПДС и пережималась на 10 мин (группа 1,  $n=10$ ), 15 мин (группа 2,  $n=10$ ) и 20 мин (группа 3,  $n=10$ ). Контрольную группу составили 10 псевдооперированных крыс, которым по тем же принципам производились анестезия и лапаротомия, но без пережатия ПДС. После окончания моделирования острой ишемии печени на 15-й минуте реперфузии забирался материал для исследований. Кровь отбирали из каудальной полой вены, в качестве антикоагулянта использовался гепарин, а также забирали печень.

Кровь подвергалась центрифугированию в течение 10 мин при 3000 об/мин, после чего отбиралась плазма крови, а эритроцитарная масса трижды отмывалась физиологическим раствором. Печень подвергалась гомогенизации, центрифугированию гомогената при 3000 об/мин в течение 10 мин, для дальнейших исследований использовался супернатант.

Концентрацию белка в плазме крови определяли по поглощению света образцом биожидкости в ультрафиолетовой области при 280 нм [7].

В эритроцитарной взвеси после лизиса холодной водой и гомогенате печени определяли активность ГПО и ГР, концентрацию восстановленного глутатиона (GSH) [8], в плазме крови определялись содержание восстановленного глутатиона [8] и общие SH-группы в расчете на 1 г белка [3].

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили в соответствии с принятыми методами вариационной статистики, с использованием программного обеспечения, находящегося в свободном доступе. Различия считали достоверными, если вероятность ошибки составляла  $p < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

В системе глутатиона эритроцитов наблюдаются похожие изменения содержания и активности всех изученных компонентов. Концентрация восстановленного глутатиона сохраняется неизменной до 10 мин ишемии, затем значительно снижается. Активность ГПО и ГР синхронно возрастает до 10 мин ишемии, затем резко снижается, но активность ГПО к 15-й минуте падает ниже контрольных цифр, а ГР — до контрольных значений; к 20-й минуте активность обоих ферментов падает значительно ниже нормы (табл. 1).

**Таблица 1**

Система глутатиона в эритроцитах при интраоперационной ишемии печени

Длительность ишемии	GSH, мкмоль/мл	ГПО, мкмоль/мин на 1 мг белка	ГР, мкмоль/мин на 1 мг белка
Контрольная группа	2,76±0,12	55,69±2,46	692,75±33,12
10 мин	2,75±0,13	96,85±3,79*	854,75±36,40*
15 мин	1,96±0,12*	41,24±2,01*	690,38±30,80
20 мин	1,84±0,11*	36,67±1,75*	381,88±14,39*

Примечание: \* —  $p < 0,05$  в сравнении с контрольной группой

В системе глутатиона печени происходят схожие с эритроцитами изменения. Концентрация GSH в первые 10 мин ишемии печени крыс в самих гепатоцитах сохраняется в пределах нормальных значений, затем довольно резко снижается. Активность ГПО в печени при ишемии быстро повышается и остается высокой как минимум до 20-й минуты ишемии. Активность ГР к 10-й минуте эксперимента возрастает, затем быстро падает значительно ниже значений контрольной группы (табл. 2).

**Таблица 2**

Система глутатиона в гомогенате печени при интраоперационной ишемии печени

Длительность ишемии	GSH, мкмоль/мл	ГПО, мкмоль/мин на 1 мг белка	ГР, мкмоль/мин на 1 мг белка
Контрольная группа	3,29±0,15	16,81±0,99	4122,83±186,15

10 минут	3,18±0,14	20,53±0,82*	5172,08±213,55*
15 минут	2,38±0,11*	19,44±0,85*	3238,54±119,41*
20 минут	2,63±0,11*	19,75±0,78*	3398,16±198,01*

Примечание: \* —  $p < 0,05$  по отношению к контрольной группе

В плазме крови за первые 10 мин ишемии наблюдается значительное повышение содержания GSH, что, вероятно, связано с гепатоцитоллизом и выходом его из клеток печени в системный кровоток. Затем к 15-й и 20-й минутам ишемии и в плазме отмечается снижение концентрации восстановленного глутатиона ниже контрольных цифр. Общие же SH-группы, в первую очередь характеризующие состояние тиоловых групп белков плазмы крови, неуклонно снижаются, что может характеризовать быстрое развитие системного поражения организма (табл. 3). Активность ферментов в плазме крови не изучалась в связи с тем, что изменения в плазме отражают сдвиги в пораженных клетках (в нашем случае активность ферментов в самих гепатоцитах изучена) и, как правило, проявляются гиперферментемией, обусловленной прежде всего цитолизом [10].

**Таблица 3**

Тиолсодержащие компоненты плазмы крови при интраоперационной ишемии печени

Длительность ишемии	GSH, нмоль/мл	Общие SH-группы, (е.о.п./ 1 г белка)* $10^3$
Контрольная группа	78,25±3,20	4,49±0,21
10 минут	90,06±4,02*	3,21±0,14*
15 минут	59,34±2,50*	3,11±0,11*
20 минут	34,10±1,32*	2,19±0,08*

Примечание: \* —  $p < 0,05$  по отношению к контрольной группе; е.о.п. – единицы оптической плотности

Наблюдаемые повышения активностей ГР и ГПО в эритроцитах и печени к 10-й минуте относятся к напряжению компенсаторных возможностей организма крысы и позволяют в определенной мере поддерживать функционирование пораженного органа и организма в целом, что подтверждается нормальными концентрациями восстановленного глутатиона в этот период ишемии. Развивающийся за первые 10 мин ишемии цитолиз подтверждается выходом GSH в плазму крови из гепатоцитов, но цитолизу подвергаются лишь уже ослабленные, наименее устойчивые к повреждению клетки, тогда как большая часть органа вполне удовлетворительно справляется с повреждающим фактором. Более длительное пережатие ПДС ведет к прогрессирующему поражению печени, клетки более не способны поддерживать гомеостаз на должном уровне, что подтверждается падением активностей ГР и ГПО, значительным снижением концентрации восстановленного глутатиона. Также результаты проведенных исследований указывают на возможности предупреждения ишемических и коррекции постишемических нарушений средствами с

антиоксидантной направленностью [2], влияющими на метаболизм глутатиона.

### **Выводы**

Таким образом, изменения тиолового метаболизма при острой ишемии печени происходят во всех изученных биологических жидкостях и гомогенате печени крыс. В динамике ишемического повреждения печени развиваются закономерные сдвиги в системе обмена глутатиона, отражающие роль тиоловых соединений в патогенезе подобного рода нарушений и расширяющие наше понимание происходящих процессов в организме на различном уровне. Некоторая синхронность изменений показателей метаболизма глутатиона в различных объектах исследований у крыс при ишемии в течение 10–20 мин позволяет предположить, что в течение 10–15 мин эксперимента происходят изменения компенсаторного характера, затем происходит срыв компенсации и прогрессирующее повреждение органа и организма в целом. Полученные данные наглядно показывают временные границы компенсаторных возможностей организма, так как система глутатиона является одной из наиболее чувствительных систем регуляции гомеостаза организма. Кроме того, данные результаты исследований говорят о перспективе коррекции гипоксических и реперфузионных нарушений препаратами, содержащими тиоловые соединения или влияющими на метаболизм глутатиона.

*Работа выполнена при поддержке государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации (от 28.01.2015 г. ч. 1, раздел 1) «Осуществление прикладных научных исследований, в том числе проведение доклинических исследований лекарственных средств и клинических исследований лекарственных препаратов».*

### **Список литературы**

1. Басов А.А., Джимаков С.С., Быкова Н.И. Мониторинг и коррекция свободнорадикальных процессов в экспериментальной и клинической практике. – Краснодар: Изд-во Кубан. гос. ун-та, 2013. – 169 с.
2. Быков И.М., Басов А.А., Быков М.И., Ханферьян Р.А. Сравнительная оценка антиокислительной активности и содержания прооксидантных факторов у различных групп пищевых продуктов // Вопросы питания. – 2014. – Т. 83, № 4. – С. 75–81.
3. Веревкина И.В., Точилкин А.И., Попова Н.А. Колориметрический метод определения SH-групп и SS-связей в белках при помощи 5,5-дителиобис(2-нитробензойной) кислоты // В сб.: Современные методы в биохимии / Под ред. В.Н. Ореховича. – М.: Медицина, 1977. – С. 223–231.

4. Жукова А.Г., Сазонтова Т.Г., Заржецкий Ю.В., Волков А.В., Мороз В.В. Тканеспецифичность ответа системы про- и антиоксидантов после реанимации // *Общ. реаниматол.* – 2005. – Т. 1, № 6. – С. 46–53.
5. Завенян З.С., Багмет Н.Н., Скипенко О.Г. Тактические подходы к хирургическому лечению очаговых заболеваний печени // *Хирургия.* – 2004. – № 6. – С. 54–57.
6. Калинина Е.В., Чернов Н.Н., Новичкова М.Д. Роль глутатиона, глутатионтрансферазы и глутаредоксина в регуляции редокс-зависимых процессов // *Успехи биологической химии.* – 2014. – Т. 54. – С. 299–348.
7. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике. – М.: МЕДпресс-информ, 2004. – 920 с.
8. Карпищенко А.И. Медицинские лабораторные технологии. Справочник. – СПб.: Интермедика, 2002. – 600 с.
9. Кулинский В.И., Колесниченко Л.С. Система глутатиона I. Синтез, транспорт, глутатионтрансферазы, глутатионпероксидазы // *Биомедицинская химия.* – 2009. – Т. 55, № 3. – С. 255–277.
10. Кулинский В.И., Леонова З.А., Колесниченко Л.С., Малов И.В., Данилов Ю.А. Система глутатиона в эритроцитах и плазме крови при вирусных гепатитах / *Биомедицинская химия.* – 2007. – Т. 53, № 1. – С. 91–98.
11. Павлюченко И.И., Быков М.И., Федосов С.Р., Басов А.А., Быков И.М., Моргоев А.Э., Гайворонская Т.В. Комплексная оценка состояния системы про-антиоксиданты в различных биологических средах у хирургических больных с гнойно-септическими осложнениями // *Успехи современного естествознания.* – 2006. – № 6. – С. 82–83.
12. Павлюченко И.И., Дынько Ю.В., Басов А.А., Федосов С.Р. Интегральные показатели эндогенной интоксикации и окислительного стресса у больных с почечной недостаточностью // *Нефрология и диализ.* – 2003. – Т. 5, № S1. – С. 28–32.
13. Deponte M. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes // *Biochimica et Biophysica Acta.* – 2013. – Vol. 1830. – P. 3217–3266.
14. Nagy P. Kinetics and mechanisms of thiol-disulfide exchange covering direct substitution and thiol oxidation-mediated pathways // *Antioxidants & Redox Signaling.* – 2013. – Vol. 18. – P. 1623–1641.

**Рецензенты:**

Каде А.Х., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой общей и клинической патофизиологии, государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального

образования «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Краснодар;

Павлюченко И.И., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики факультета повышения квалификации и профессиональной переподготовки специалистов, государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Краснодар.