

**НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНЫ
ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРИОБИОЛОГИИ И КРИОМЕДИЦИНЫ**

На правах рукописи

УДК: 611.013. 3/8 : 612.592 : 612.35 : 615.014.41

Черкашина Дарья Викторовна

**ДЕЙСТВИЕ ЦИТОЗОЛЬНЫХ ФРАКЦИЙ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ
ТКАНЕЙ НА СОСТОЯНИЕ ПЕЧЕНИ ПРИ ГИПОТЕРМИЧЕСКОМ
ХРАНЕНИИ И ТОКСИЧЕСКОМ ПОРАЖЕНИИ**

03.00.19 - криобиология

диссертация
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
Петренко Александр Юрьевич
доктор биологических наук, профессор

Харьков-2004

СОДЕРЖАНИЕ

	Стр.
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	5
Раздел 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	10
1.1. Действие повреждающих факторов на функциональное состояние печени.....	10
1.2. Гипотермическое хранение и последующая нормотермическая реперфузия печени – особенности развития повреждения.....	22
1.3. Особенности повреждения печени при острой интоксикации тетрахлорметаном.....	28
1.4. Пути коррекции повреждения печени.....	33
Раздел 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	39
2.1. Моделирование острого CCl ₄ -индуцированного гепатита.....	40
2.2. Условия гипотермического хранения и нормотермической реперфузии печени.....	40
2.3. Методы биохимического анализа.....	42
2.4. Методы статистического анализа.....	51
2.5. Использованные реактивы.....	51
Раздел 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	52
3.1. Влияние предварительного введения эмбриоспецифических факторов на прооксидантно-антиоксидантное состояние печени и течение острой интоксикации ТХМ у крыс.....	52
3.1.1. Динамика аминотрансферазной активности при коррекции ТХМ-индуцированного гепатита цитозолем эмбриональных тканей.....	53
3.1.2. Влияние предобработки цитозолем эмбриональных тканей на содержание ТБК-активных продуктов в сыворотке крови ТХМ- интоксицированных животных.....	56

3.1.3. Процессы перекисного окисления липидов при ТХМ-индуцированном гепатите.....	58
3.1.4. Влияние цитозоля эмбриональных тканей на состояние системы антиоксидантной защиты печени крыс после острой интоксикации ТХМ.....	61
3.1.5. Влияние термостабильной фракции цитозоля эмбриональных тканей на течение ТХМ-индуцированного гепатита.....	70
3.1.6. Прооксидантно-антиоксидантное состояние печени крыс под действием термостабильной фракции цитозоля эмбриональных тканей.....	76
3.2. Действие эмбриоспецифических факторов на состояние печени в ходе гипотермического хранения и последующей реперфузии.....	85
3.2.1. Влияние эмбриоспецифических факторов на степень элиминации аминотрансфераз при нормотермической реперфузии.....	85
3.2.2. Влияние предобработки эмбриоспецифическими факторами на процессы ПОЛ в печени при гипотермическом хранении и нормотермической реперфузии.....	88
3.2.3. Влияние эмбриоспецифических факторов на состояние системы антиоксидантной защиты в ходе гипотермического хранения и последующей реперфузии.....	93
3.2.4. Влияние предобработки эмбриоспецифическими факторами на уровень АТФ в печени.....	101
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	111
ВЫВОДЫ.....	120
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	122

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АТФ – аденозинтрифосфат
АЛТ – аланинаминотрансфераза
АСТ – аспартатаминотрансфераза
Г6ФДГ – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа
ГП – глутатионпероксидаза
ГР – глутатионредуктаза
ГХ – гипотермическое хранение
ИПФР – инсулиноподобный фактор роста
ИЛ – интерлейкин
КАТ – каталаза
МДА – малоновый диальдегид
НР – нормотермическая реперфузия
ПОЛ – перекисное окисление липидов
САОЗ – система антиоксидантной защиты
ТБК – тиобарбитуровая кислота
ТСФ – термостабильная фракция
ТФР – трансформирующий фактор роста
ТФРГ – термостабильный фактор роста гепатоцитов
ТХМ – тетрахлорметан
ФНО – фактор некроза опухоли
ФРГ – фактор роста гепатоцитов
ФРФ – фактор роста фибробластов
ЦЭТ – цитозоль эмбриональных тканей
ЭСФ – эмбриоспецифические факторы
ЭФР – эпидермальный фактор роста
CCl₄ – четыреххлористый углерод (тетрахлорметан)
GSH/GSSG – глутатион восстановленный / окисленный

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. В настоящее время наблюдается рост количества патологий, сопровождающихся печеночной недостаточностью, при которых необходима ортотопическая трансплантация печени [155, 221]. Гипотермия является основным способом сохранения печени до последующей трансплантации [181, 186]. Существенный прогресс в увеличении сроков гипотермического хранения печени был достигнут за счет разработки осмотически сбалансированных сред, снижающих отек ткани и аутолиз клеток [80]. Широкое применение получил раствор Университета Висконсин (UW), сочетающий проникающие и непроникающие компоненты, позволивший увеличить сроки безопасного хранения печени до 20 ч [181, 186]. Разработанный в ИПКиК НАНУ сахарозо-солевой раствор [35] мало отличается от UW, но является менее дорогостоящим. В настоящее время такой путь продления сроков безопасного хранения печени является тупиковым, ведется скрупулезный поиск новых биологически активных микродобавок [80, 155]. Тем не менее, после 24 ч гипотермического хранения в органе наблюдаются необратимые метаболические нарушения [181, 186]. Для качественного скачка необходим поиск принципиально новых подходов. В частности, это может быть направленная регуляция клеточного метаболизма, придающая устойчивость органу к последующему воздействию.

Перспективным направлением является предподготовка организма донора и собственно органа, осуществляемая путем введения различных биологически активных веществ *in vivo*, до изоляции печени и последующего гипотермического хранения [205, 139, 250, 251]. В данном направлении получены обнадеживающие результаты, однако, сроки сохранности функциональной активности органа остаются в указанных пределах.

В последние годы наблюдается высокий интерес к эмбриональным клеткам и тканям, экспериментальная и клиническая трансплантация которых при различных патологиях оказывает общее стимулирующее действие на многие системы организма реципиента и приводит к запуску репаративных процессов в

поврежденных органах [6, 34]. Эмбриональные ткани обладают высокой пластичностью и устойчивостью к действию повреждающих факторов. Эффекты трансплантации опосредуются биологически активными соединениями, продуцируемыми стволовыми и прогениторными клетками [16, 43, 233]. Литературные данные свидетельствуют, что ряд эмбриоспецифических факторов (ЭСФ) цитозольного происхождения, белковой и пептидной природы, оказывают превентивное действие на развитие некоторых экспериментальных патологий [36, 37, 111, 119]. Однако, существующие работы по применению эмбриональных экстрактов не систематизированы и носят случайный характер, практически не конкретизирована роль отдельных компонентов в реализации наблюдаемых эффектов. До сих пор не изучалось действие ЭСФ на состояние печени в ходе ее гипотермического хранения и последующей нормотермической реперфузии.

Каскад биохимических и иммунологических реакций, ведущих к гибели клеток печени, носит сходный характер при повреждениях различной этиологии [48, 136]. Важными звеньями патологической цепи являются активация свободнорадикальных процессов, изменение цитокинового профиля и нарушение энергетического состояния в печени. Для экспериментального обоснования перспективности использования ЭСФ для повышения степени сохранности органа представляет интерес оценить действие эмбриональных экстрактов в модельной системе *in vivo*. Традиционной моделью острого поражения печени является токсический гепатит, вызванный однократным введением тетрахлорметана (ТХМ). В данном случае существует возможность выбора оптимального срока предобработки, а также оценки вероятного вклада отдельных фракций ЭСФ в предупреждение развития повреждения печени.

Таким образом, представляется перспективным изучение возможности применения бесклеточных водорастворимых фракций, полученных из эмбриональных тканей, при экспериментальном повреждении печени, в частности при гипотермическом хранении и токсическом гепатите.

Связь работы с научными программами, планами, темами. Работа выполнена в отделе криобиохимии в рамках плановых тем НИР ИПКиК НАН

Украины: № 87 «Изучение механизма биологического действия криоконсервированных препаратов эмбриональной печени на метаболизм гепатоцитов в условиях функциональной недостаточности печени», № ГР 0202U000833; № 7 «Изучение морфофункциональных особенностей региональных стволовых клеток эмбрионов, их криочувствительности и механизмов реализации биологической активности в условиях культивирования и на моделях некоторых патологических состояний», № ГР 0102U002026. Работа выполнена при поддержке гранта “Welcome Trust” № 069472 (UK).

Цель и задачи исследования: Цель работы – оценить действие цитозольных фракций эмбриональных тканей на прооксидантно-антиоксидантное равновесие и степень повреждения печени в ходе ее гипотермического хранения и нормотермической реперфузии, а также при токсическом поражении.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. На модели острой интоксикации тетрахлорметаном экспериментально обосновать условия предобработки животных эмбриоспецифическими факторами (ЭСФ) для последующего гипотермического хранения печени:

а) определить оптимальные сроки предобработки животных цитозолем эмбриональных тканей;

б) оценить роль термостабильных эмбриоспецифических факторов в реализации эффектов предобработки.

2. Исследовать влияние цитозольных фракций эмбриональных тканей на степень повреждения и уровень АТФ в печени при гипотермическом хранении и нормотермической реперфузии.

3. Изучить действие цитозольных фракций эмбриональных тканей на интенсивность свободнорадикальных процессов и активность ферментов системы антиоксидантной защиты в ходе гипотермического хранения и последующей нормотермической реперфузии печени крыс.

Объект исследования. Прооксидантно-антиоксидантное состояние и развитие повреждения печени крыс после гипотермического хранения и острой интоксикации тетрахлорметаном.

Предмет исследования. Влияние предварительного введения цитозольных фракций эмбриональных тканей человека на печень крыс в условиях длительного гипотермического хранения и токсического поражения.

Методы исследования. Для решения поставленных задач потребовалось привлечение биохимических и статистических методов. В работе использовали следующие методы: поэтапного высокоскоростного ультрацентрифугирования и термической обработки для получения различных фракций эмбриональных тканей; спектрофотометрические для исследования биохимических показателей в сыворотке крови и гомогенатах печени; кинетические для определения активности ферментов в гомогенатах печени и бесклеточном перфузате.

Полученные результаты обрабатывали статистически на персональном компьютере, используя пакеты программ “Statistica v.5.5” и “Origin 6.0”.

Научная новизна полученных результатов. Впервые установлено, что предобработка крыс цитозолем эмбриональных тканей приводит к снижению свободнорадикального повреждения и нормализации работы системы антиоксидантной защиты в печени после длительного гипотермического хранения и последующей нормотермической реперфузии. Показано, что ЭСФ способствуют значительному повышению уровня АТФ в печени после 1 ч хранения, что сопровождается нормализацией пируваткиназной активности. Впервые, на модели острой интоксикации ТХМ установлено, что предварительное введение цитозоля эмбриональных тканей или его термостабильной фракции предупреждает гибель животных и приводит к снижению степени повреждения печени на фоне нормализации прооксидантно-антиоксидантного баланса. Впервые показано, что сокращение сроков между введением цитозоля эмбриональных тканей и инициацией токсического гепатита приводит к усилению защитного действия предобработки крыс. Установлено, что тотальный цитозоль эмбриональных тканей в сравнении с его термостабильной фракцией является более эффективным в предупреждении развития острой интоксикации ТХМ. Показана способность цитозольных фракций эмбриональных тканей, как при гипотермическом хранении,

так и при токсическом поражении способствовать снижению степени повреждения печени.

Практическая значимость полученных результатов. Полученные результаты способствуют выяснению механизмов повреждения печени при длительном гипотермическом хранении и последующей нормотермической реперфузии. Данные, описанные в работе, могут быть использованы для разработки новых методов гипотермического хранения печени, основанных на применении биологически активных соединений, полученных из эмбриональных тканей. Нормализующее действие цитозольных фракций эмбриональных тканей человека на прооксидантно-антиоксидантное и функциональное состояние печени, независимое от этиологии повреждения, может служить экспериментальным обоснованием их клинического применения при патологиях печени, в развитие которых участвуют свободнорадикальные и воспалительные процессы.

Личный вклад соискателя. Автором диссертационной работы самостоятельно проведен анализ литературных данных, определены цель и задачи работы, способы их решения, получены результаты экспериментальных исследований, проведена их статистическая обработка. Автором лично проведен первичный анализ данных и сделаны предварительные выводы. Автором совместно с научным руководителем были определены цели, задачи работы и способы их решения, интерпретированы полученные результаты и сделаны окончательные выводы.

Апробация результатов диссертации. Материалы диссертационной работы докладывались и обсуждались на: Пироговской студенческой научной конференции (г. Москва, 2003); 4-й Международной междисциплинарной научно-практической конференции «Современные проблемы науки и образования» (г. Ялта, 2003); 3-й Международной научно-практической конференции «Наука и социальные проблемы общества: медицина, фармация, биотехнология» (г. Харьков, 2003).

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликовано 4 статьи, 4 тезисов.

РАЗДЕЛ 1

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Действие повреждающих факторов на функциональное состояние печени

Печень является уникальным по своей структуре и свойствам органом. Многообразие выполняемых функций обеспечивает ей одно из центральных мест в поддержании организменного гомеостаза. Клетки печени представлены 4-мя основными типами:

- 1) паренхиматозные клетки – гепатоциты – выполняют ряд функций, в них происходит биосинтез и деградация различных соединений, необходимых для нормальной жизнедеятельности. Наблюдается четкая метаболическая зонация гепатоцитов, которая лежит в основе селективной чувствительности к повреждающим агентам [48];
- 2) клетки Купфера - резидентные макрофаги, обеспечивают быстрый ответ на экстремальное воздействие [60, 89];
- 3) клетки Ито (жирозапасающие клетки, ретинол-запасающие клетки, hepatic stellate cells) – в норме депо для ретинола, при активации трансформируются в фибробластоподобные клетки, секретирующие компоненты внеклеточного матрикса [102, 130];
- 4) эндотелиальные клетки печеночного синусоида (в дальнейшем «эндотелиальные клетки») – выполняют фильтрационную функцию, регулируют размер просвета сосудов, секретируют отдельные компоненты внеклеточного матрикса; повреждение этих клеток приводит к развитию ишемии и локального некроза [60].

Кроме того, в печени находятся другие резидентные представители иммунокомпетентных клеток, такие как нейтрофилы, лимфоциты, лейкоциты, натуральные клетки - киллеры [48, 135].

Все клетки печени находятся в тесном взаимодействии и секретируют различные регуляторные молекулы, позволяющие поддерживать эту связь. Именно благодаря кооперации, а также наличию реакций немедленного ответа и синтеза веществ протекторной природы, печень является органом, способным к регенерации после повреждений [31, 48].

Высокая функциональная активность печени делает ее мишенью для различных повреждающих агентов [2, 40]. Это приводит к нарушениям метаболических процессов, иммунного ответа, антимикробной защиты и системы детоксикации. Наиболее часто реализация повреждений и последующая регенерация осуществляются через биохимические и иммунологические механизмы [48, 136, 147, 188].

Можно выделить следующие основные механизмы, ведущие к гибели клеток при развитии повреждения печени: 1) повреждения плазматической мембраны и нарушения структуры цитоскелета; 2) дисфункция митохондрий; 3) нарушение внутриклеточного ионного гомеостаза; 4) активация ферментов деградации веществ; 5) оксидативный стресс в результате нарушения окислительно-восстановительного равновесия; 6) нарушение баланса регуляторных молекул, приводящее к изменению межклеточных взаимодействий и вне-и внутриклеточной сигнализации [48, 97, 136, 219].

Наибольший интерес при изучении механизмов развития повреждения печени, в особенности острого, представляют оксидативный стресс и нарушение баланса регуляторных молекул различной природы. Согласно современным представлениям, данные факторы тесно взаимосвязаны между собой и действуют синергично, усиливая действие друг друга. Особенно ярко такое взаимодействие выражено при развитии повреждения печени.

Развитие оксидативного стресса является ранним ответом организма на экстремальное воздействие. При этом в месте повреждения происходит сдвиг прооксидантно-антиоксидантного баланса, который впоследствии может приобретать генерализованную форму [18, 32, 140]. Во всех живых системах

существуют прооксидантные факторы и механизмы, сдерживание которых в физиологических условиях осуществляет система антиоксидантной защиты (САОЗ) [32, 123]. Существует несколько основных, наиболее уязвимых компонентов системы, поддерживающей окислительно-восстановительное равновесие [11, 18, 32]:

- 1) присутствие в структуре биологических мембран легкоокисляемых органических соединений, в частности, полиненасыщенных жирнокислотных остатков мембранных фосфолипидов;
- 2) наличие свободного кислорода в биосфере, биологических жидкостях и экстрацеллюлярном пространстве, использование его в жизнедеятельности делает неизбежным контакт кислорода с липидами мембран;
- 3) участие кислорода во внутриклеточных процессах (биологическое окисление и окислительное фосфорилирование, окислительная микросомальная деструкция ксенобиотиков, присутствие в органеллах электрон-транспортных цепей).
- 4) присутствие в организме ряда эссенциальных ионов металлов с переменной валентностью, обладающих мощным прооксидантным потенциалом;
- 5) цепной характер реакций перекисного окисления липидов (ПОЛ).

В ходе развития свободнорадикальных процессов образуются первичные ($O_2^{\bullet}$, $HO_2^{\bullet}$, $^{\bullet}OH$, перекиси, диеновые конъюгаты), вторичные (альдегиды, в частности малоновый диальдегид (МДА)), газообразные продукты окислительной деградации жирных кислот) и конечные (шиффовы основания) продукты ПОЛ [11, 32].

Одной из важных особенностей реакции ПОЛ является то, что даже в отсутствие специфических катализаторов (ферментов) процесс ПОЛ самоускоряется при благоприятных условиях (определенная температура, доступ кислорода, радикалы-инициаторы). В физиологических количествах свободные радикалы принимают участие в нормальных метаболических процессах и регуляции различных функций клеток, в том числе пролиферации [17, 18, 32].

При развитии свободнорадикальных процессов происходит разрушение молекул антиоксидантов, изменение фосфолипидного состава мембран, в результате

чего наблюдается нарушение их структурно-функциональной целостности. Изменение проницаемости мембран внутриклеточных органоидов приводит к высвобождению гидролитических ферментов, нарушению ионного гомеостаза, снижению мембранного потенциала, которое приводит к разобщению окислительного фосфорилирования в митохондриях, что является критическим фактором для энергетического состояния клетки [18, 32]. Эти события усугубляются тем, что разнообразные продукты ПОЛ способны ковалентно взаимодействовать с отдельными функциональными группами белков, что приводит к их полимеризации и повреждению аминокислотных остатков, в особенности содержащих SH-группы. Окислительная модификация белков приводит к изменению активности ферментов, в том числе участвующих в работе САОЗ [18, 25].

Продукты ПОЛ, связываясь с ДНК и белками ядерного хроматина, приводят к нарушениям их взаимодействий и возможности считывания генетической информации [17].

Наличие в печени большого числа гемсвязывающих белков, в том числе каталазы, глутатион-S-трансфераз, является причиной появления при стрессе большого количества свободного гема и ионов железа, которые активно участвуют в развитии свободнорадикального процесса [11, 32].

САОЗ контролирует все этапы ПОЛ. Эволюция антиоксидантной системы привела к ее высокой надежности и лабильности, что выражается в чрезмерности, дублировании и взаимозаменяемости компонентов. Включение отдельных элементов САОЗ происходит по принципу обратной связи при участии различных триггеров. Такой подход позволяет предупреждать возникновение нарушений и особенно важен при развитии различных патологических состояний или при помещении объекта в неблагоприятные условия [32].

Система включает в себя неферментативное и ферментативное звенья. К первому относятся эндогенные антиоксиданты прямого типа действия, способные непосредственно связываться с продуктами ПОЛ и нейтрализовать их. Сюда входят как гидрофобные (токоферолы, ретинолы, кальциферолы, стероидные гормоны и

т.д.), так и водорастворимые молекулы (аскорбат, цистеин, мелатонин, гормоны пептидной природы и т.д.) [18, 32].

Ферментативное звено представлено рядом антиоксидантных ферментов, таких как супероксиддисмутаза и каталаза, а также глутатион-зависимая система, состоящая из глутатионпероксидазы, редуктазы и семейства глутатион-S-трансфераз, работа которых предупреждает излишнее образование активных форм кислорода, принимает участие в нерадикальной деструкции перекисей липидов и нейтрализации ксенобиотиков.

Каталаза (КАТ) (КФ 1.11.1.6) является важным звеном САОЗ, работает в сопряженной системе с супероксиддисмутазой, нейтрализует H_2O_2 , превращая ее в H_2O . КАТ – гемсодержащий белок, локализованный в пероксисомах, представляет собой тетрамер с молекулярной массой 250 кДа. Надмолекулярная структура фермента стабилизируется 4 молекулами НАДФН, которые защищают нативную структуру белка от повреждающего действия H_2O_2 [143]. Сложная структура фермента является причиной ее высокой лабильности и подверженности различного рода воздействиям. В условиях гиперпродукции свободных радикалов и сопряженных с ней нарушений энергетического обмена наблюдается угнетение активности КАТ [185]. При этом нередко наблюдается повышение активности супероксиддисмутазы, что приводит к гиперпродукции H_2O_2 и развитию свободнорадикальных повреждений [243].

Физиологические концентрации SH-содержащих соединений проявляют мощный антиоксидантный эффект. Основным компонентом этой системы является восстановленный глутатион (GSH), который используется для инактивации H_2O_2 , ингибирует активные формы кислорода, нейтрализует гидроперекиси липидов, препятствует окислительной модификации тиоловых групп белков и участвует в нейтрализации ксенобиотиков [151, 160]. Глутатион является самым распространенным в организме животных соединением, содержащим сульфгидрильные группы, встречается во всех типах тканей, представляет собой трипептид, состоящий из γ -глутаминовой кислоты, цистеина и глицина [115]. Пул GSH в клетке поддерживается постоянным синтезом и имеет высокий уровень (0.5-

10 мМ), обновление аминокислотного состава происходит в течение нескольких часов. В норме лимитирующим фактором биосинтеза глутатиона является доступность аминокислот, главным образом – цистеина или метионина (предшественник цистеина) [58, 115]. Ингибирование синтеза GSH может осуществляться путем фосфорилирования γ -глутамилцистеинилсинтетазы, также наблюдается при гипоксии [160]. Уровень восстановленного глутатиона при действии различных стрессорных агентов, независимо от их природы, в большинстве случаев снижается в первое время после воздействия [151], причем причиной этого может быть, как непосредственное взаимодействие глутатиона со свободными радикалами, так и его участие в реакциях, катализируемых ферментами глутатионового цикла [58, 115]. В последнее время важная роль отводится митохондриальному пулу GSH, который является основной защитой митохондрий от активных форм кислорода, генерируемых в электрон-транспортной цепи. Снижение уровня GSH в этих органоидах приводит к развитию внутриклеточного оксидативного стресса и нарушению энергетического статуса клеток [94, 100].

Основными ферментами глутатионового цикла, участвующими в антиокислительных процессах являются глутатион-S-трансферазы и глутатионпероксидазы. Глутатион-S-трансферазы катализируют реакции конъюгации GSH с электрофильными метаболитами эндо- и экзогенного происхождения, полученные в результате этих реакций соединения не регенерируют и выводятся из клетки [151].

Селеновая глутатионпероксидаза (ГП) (КФ.1.11.1.9.), локализована в цитоплазме, ядре и митохондриях, является гомотетрамером с молекулярной массой 74-105 кДа, содержит в активном центре 4 атома селена, связанных с цистеином, основная функция фермента – нейтрализация перекиси водорода и гидроперекисей липидов [30]. Несмотря на сходство действия с КАТ, и частичное замещение при недостаточности одного из ферментов, наблюдаются существенные различия в регуляции их активности [30], что обусловлено, например, более высоким неспецифическим сродством ГП к субстратам.

Многие конъюгаты GSH являются обратимыми и могут быть восстановлены. Глутатионредуктаза (ГР) (КФ 1.6.4.2.), гомодимер с молекулярной массой 104,8 кДа, катализирует обратимое окисление НАДФН глутатионом, помимо этого может восстанавливать дисульфидные связи белков. В активном центре фермента содержится ФАД и активный дисульфид. Локализуется глутатионредуктаза в основном в цитоплазме, также в митохондриях, ядре и микросомах [78, 106]. Пополнение пула GSH путем его восстановления, несомненно, является более энергетически выгодным путем по сравнению с его синтезом *de novo*. Для осуществления этого процесса требуется высокое содержание цитозольных окислительно-восстановительных эквивалентов, а именно НАДФН. Кроме восстановления GSH, НАДФН необходим для поддержания нативной конформации молекул КАТ [123, 143].

В норме до половины цитозольного НАДФН восстанавливается при участии дегидрогеназ пентозофосфатного пути, причем показано влияние окисленного глутатиона на активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, остальной НАДФН – за счет НАДФ-зависимых дегидрогеназ, прямо или косвенно связанных с циклом трикарбоновых кислот (малик-фермента, изоцитратдегидрогеназы и глутаматдегидрогеназы). Таким образом, не является случайным, что развитие свободнорадикальных процессов на ранних этапах приводит к активации в клетке не только САОЗ, но и пентозофосфатного шунта [182, 230].

Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (Г6ФДГ) (КФ.1.1.1.49) является ключевым ферментом пентозофосфатного пути, тетрамер с молекулярной массой 122 кДа, катализирует реакцию преобразования глюкозо-6-фосфата в 6-фосфоглюконат [54, 192]. В настоящее время, Г6ФДГ считается одним из важнейших ферментов, отвечающих за оксидорезистентность клетки [182, 230]. Активация данного метаболического пути является одним из наиболее ранних ответов клетки на стрессорное воздействие. Дальнейшее развитие оксидативного стресса приводит к угнетению работы адаптационной системы и нарушению механизмов поддержания прооксидантно-антиоксидантного равновесия [195].

Изучение механизмов регуляции работы САОЗ является актуальной проблемой современной науки. Классические работы описывают цАМФ-, Ca^{2+} - и фосфатидилинозитол - зависимую регуляцию при участии гормонов надпочечников, половых гормонов и других эндокринных соединений [23, 106]. Наиболее важным является цАМФ-зависимый механизм. Показано, что катехоламины и эстрогены временно повышают активность антиоксидантных ферментов, регуляция осуществляется через протеинкиназу А [23, 30]. Важную роль в реализации регуляторных эффектов играет изменение концентрации Ca^{2+} , которое опосредуется окислением тиоловых групп инозитол-3-фосфатных рецепторов, повышение содержания окисленного глутатиона приводит к высвобождению Ca^{2+} из внутриклеточных депо [18].

В настоящее время установлено, что САОЗ также тесно взаимосвязана с активацией факторов транскрипции, таких как NFkB, AP-1, p53, C/EBP, STAT3, 6 [18, 97]. Эти факторы, помимо ответа на изменение окислительно-восстановительного равновесия в клетке, являются основными посредниками передачи сигналов различных цитокинов и ростовых факторов в ядро. Существует ряд работ, свидетельствующих о регуляторном воздействии цитокинов на САОЗ [64, 99]. Так, показана активация ГП через p53 [227], угнетение активности КАТ, ГП в присутствии фактора некроза опухоли (ФНО) α при участии NFkB [109, 135, 249]. Снижение содержания GSH в гепатоцитах приводит к повышению ДНК-связывающей активности фактора AP-1, вследствие чего увеличивается вероятность апоптотической гибели клетки [91]. NFkB – основной провоспалительный фактор транскрипции, повышение его связывающей активности, в частности, при изменении отношения GSH/GSSG, приводит к усилению свободнорадикальных процессов и селективному изменению активности глутатион-зависимых ферментов [120, 144]. Факторы семейства STAT (STAT3, 6) являются участниками регенерационного ответа, передают сигналы от противовоспалительных интерлейкинов (ИЛ) 6, 4, 13 и позитивно влияют на активность ферментов САОЗ [88, 250, 251].

Наиболее ярко связь проксидантно-антиоксидантной и цитокиновой систем наблюдается при развитии кооперативного ответа клеток печени на стрессорное воздействие [48, 136].

Независимо от типа повреждения, мобилизация всех типов клеток печени для локализации и устранения дефекта происходит практически одновременно. Очередность включения различных этапов адаптационной реакции зависит от происхождения, степени и продолжительности воздействия. Регуляция ответа на повреждение осуществляется факторами, синтезируемыми всеми типами клеток печени. К этим факторам относятся белки острой фазы, цитокины, факторы роста, производные арахидоновой кислоты, молекулы адгезии, хемокины, а также их рецепторы и ингибиторы к ним. Разнонаправленное, синергичное и/или антагоничное взаимодействие вышеуказанных факторов приводит к развитию комплексного ответа на воздействие, которое нередко заканчивается регенерацией и полным восстановлением органа [1, 146, 178].

В настоящее время, в качестве одного из основных участников процессов реализации воспалительного ответа на повреждение называют клетки Купфера [226]. Их активация, опосредованная белками системы комплемента, синтезируемых в гепатоцитах, может быть вызвана различными факторами: 1) гипоксия, сопровождающая практически любое повреждение печени, в частности ишемию органа; 2) эндогенные активные формы кислорода, образованные в гепатоцитах при участии активных метаболитов различных ксенобиотиков; 3) эндотоксины [146, 169]. Независимо от природы активатора, в клетках Купфера начинают синтезироваться основные провоспалительные цитокины, такие как ФНО α и ИЛ-1 и 6, трансформирующий фактор роста β (ТФР β) [98, 188]. ФНО α играет важную роль в развитии повреждения печени [210]. Показана его способность снижать содержание GSH и активность глутатион-зависимых ферментов в гепатоцитах [52, 109]. ИЛ-1 и ИЛ-6 стимулируют супероксиддисмутазу, угнетая при этом КАТ, что приводит к накоплению свободных радикалов в клетках печени [138].

Аутокринная стимуляция клеток Купфера приводит к гиперпродукции ими H_2O_2 , которая, в свою очередь, оказывает экзогенное повреждающее действие на

мембраны гепатоцитов [99, 207]. Кроме того, H_2O_2 индуцирует синтез другого провоспалительного цитокина – ТФР β . При этом уровень внутриклеточного GSH определяет, является ли накопление H_2O_2 результатом развития оксидативного стресса, или вторичным мессенджером в сигнальном пути индукции экспрессии ТФР β [87]. Данный фактор оказывает выраженное ингибирующее действие на САОЗ и синтез протеинов в гепатоцитах [138, 218]. Также ТФР β является причиной фибротических изменений в печени, так как вызывает трансформацию клеток Ито в фибробластоподобные. В настоящее время клеткам Ито отдают центральную роль в развитии фибротических изменений при повреждении печени [102, 130]. Показана значительная зависимость степени их активации именно от интенсивности свободнорадикальных процессов, корреляция с уровнем провоспалительных цитокинов выражена в меньшей степени [142].

Активация клеток Купфера приводит к гиперпродукции хемоаттрактантов, производных арахидоновой кислоты и молекул адгезии, определяющих захват нейтрофилов и нарушение межклеточных взаимодействий в печени [48, 147]. На этом этапе продукция свободных радикалов усиливается, нейтрофилы связываются с мембранами гепатоцитов и эндотелиальных клеток, что является причиной нарушения микроциркуляции. Развитие локальной гипоксии приводит к образованию очагов некроза [2, 99].

Важным участником процессов клеточной кооперации и оксидативного стресса является оксид азота (NO) [53]. В настоящее время нет однозначного мнения по поводу его роли в усугублении или ослаблении степени повреждения печени. В небольших количествах он является медиатором роста и пролиферации, эффективным вазодилатором и скавенджером свободных радикалов [53]. Активация индуцибельной формы NO-синтазы и угнетение конститутивного изофермента провоспалительными цитокинами приводит к изменению статуса NO и его вовлечению в развитие воспалительного и иммунного ответа [22, 127, 196]. Нитрозилирование тиоловых групп мембранных белков приводит к повреждению мембран, кроме того, взаимодействие NO с транзиторными металлами гемопротеинов (цитохромы P-450, каталаза) нарушает их функционирование. Также

NO стимулирует АДФ-рибозилирование белков, которое может приводить к нарушению энергетического обмена и модификации цитоскелета клеток печени [48, 53]. Повышение концентрации NO является цитотоксичным. Образованные пероксинитриты, хотя и могут обрывать цепь перекисных реакций, сами по себе токсичны для клеток [18, 32]. Однако, выраженное угнетение активности NO-синтазы приводит к нарушению биосинтеза GSH [160]. Однозначно можно сказать только, что поддержание оптимальной концентрации NO необходимо для нормальной передачи цитокиновых сигналов [188]. Равновесие между концентрацией NO, как вазодилатора, и эндотелина-1 (провоспалительного вазоконстриктора) во многом определяет функциональное состояние эндотелиальных клеток [60, 72].

Баланс между количеством свободных радикалов и цитокинов является критическим фактором, определяющим тип гибели клеток [97, 136, 170]. Апоптоз и некроз вносят свой вклад в зависимости от вида повреждающего агента, который определяет приоритетность. Однако, довольно часто первичный некроз при повреждении сопровождается вторичным апоптозом и наоборот. Свободные радикалы повышают чувствительность гепатоцитов к действию проапоптотических сигналов цитокинов, в первую очередь ФНО α [136]. Активированные клетки Купфера индуцируют апоптоз в эндотелиальных клетках [60] и в клетках Ито для ограничения фиброгенеза в печени [101]. Важную роль в выборе типа гибели клетки играет как уровень GSH в клетке, так и количество активных форм кислорода [170]. Именно эти факторы определяют, каков будет эффект ФНО α на гепатоциты – пролиферативный или апоптотический [126]. Связь между цитокинами и свободными радикалами осуществляется через факторы транскрипции, упомянутые ранее, при участии NO. Выраженным антиапоптотическим эффектом обладают p53 и NFkB, активация которых при воспалении носит защитный характер [82, 136].

Изучение развития повреждения печени в системе *in vivo* демонстрирует, что следующей стадией кооперативного ответа клеток печени (при прекращении воздействия) является регенерация паренхимы органа [97, 178]. Продолжительный

стресс является причиной развития хронической патологии или полной декомпенсации, сопровождающейся летальным исходом.

Высокая способность печени к регенерации показана на многочисленных экспериментальных моделях [1, 8]. В основе этого процесса лежит уникальная способность гепатоцитов, полностью дифференцированных клеток, выходить из состояния покоя и восстанавливать поврежденные участки путем пролиферации, полиплоидизации и гипертрофии [1]. Регулируются эти процессы различными ростовыми факторами, синтезирующимися в печени. Во многих работах отмечается многократное повышение концентрации в печени и циркулирующей крови таких факторов как: фактор роста гепатоцитов (ФРГ), термостабильный фактор роста гепатоцитов (ТФРГ, *hepatic stimulatory substance*), эпидермальный фактор роста (ЭФР), фактор роста фибробластов (ФРФ), ТФР α [31, 97, 125, 163, 245]. Показано, что ТФР α является более специфическим маркером, свидетельствующим о степени регенерации печени, чем ФРГ [232]. ТФРГ не способен инициировать регенерацию печени, а только стимулирует ее [156], в частности, препятствуя интернализации рецепторов к ЭФР на поверхности гепатоцитов [56]. ЭФР, ТФР α , ФРГ стимулируют биосинтез ДНК в гепатоцитах [129, 157, 232, 253]. Кроме того, выделен ряд генов, экспрессия которых наблюдается в печени только в случае регенерационного процесса или при эмбриональном развитии, таких как *hepassocin*, *survivin*, α -фетопротеин [3, 90, 103, 121]. Реализация эффектов ростовых факторов, в частности на систему САОЗ, осуществляется через митоген-активируемые протеинкиназные каскады при участии вышеописанных факторов транскрипции [97, 136].

Интересным является факт, что активными участниками процесса восстановления печени являются провоспалительные ФНО α , ТФР β (ингибирует чрезмерную пролиферацию гепатоцитов), и ИЛ-6, которые при снижении количества свободных радикалов меняют тип сигналов на репарационные и пролиферативные [126, 188, 218]. ФНО α притормаживает клетки печени для полноценного ответа на ростовые факторы [97, 98, 210]. В частности, небольшие концентрации ФНО α и ИЛ-1 оказывают положительное влияние на активность ферментов, отвечающих за синтез GSH, что играет важную роль в реализации

сигналов митогенов [109, 166]. Существенную роль в изменении типа сигналов играет ИЛ-6, который является пограничным фактором в реализации воспалительного и репаративного ответа [219]. ФНО α и ИЛ-1 β индуцируют экспрессию ИЛ-6, присутствие которого необходимо для полноценного ответа клеток на ростовые факторы и обладающего выраженным антиапоптотическим действием [88, 196]. Показано, что ИЛ-6-дефицитные животные обладают повышенной чувствительностью к патогенам, применение экзогенного ИЛ-6 нормализует реакцию на воздействие [74, 171]. Печень мышей с «нокаутированными» генами ИЛ-6 и рецепторов к ФНО α теряет способность к регенерации после частичной гепатэктомии и трансплантации [198, 201, 247]. Регуляторное действие ИЛ-6 осуществляется путем активации факторов транскрипции STAT3 и C/EBP, которая способствует выходу гепатоцитов из состояния покоя [88, 219].

Таким образом, можно утверждать, что основные механизмы развития повреждения печени носят универсальный характер, независящий от вида повреждающего агента. К ним, в частности, относятся нарушения прооксидантно-антиоксидантного и цитокинового баланса, регуляция которых тесно взаимосвязана.

1.2. Гипотермическое хранение и последующая нормотермическая реперфузия печени – особенности развития повреждения

Изучение механизмов повреждения печени при хранении и последующей реперфузии, так называемых «ишемически-реперфузионных повреждений», является актуальной проблемой современной гепатологии, как с точки зрения способов хранения органа, так и его состояния после трансплантации [133, 181]. Существующие модели таких повреждений условно можно разделить на низкотемпературные и нормотермические. При нормотермической ишемии/реперфузии орган постоянно находится при физиологических температурах, что ускоряет развитие повреждения [66, 134]. Снижение до положительных субнулевых температур позволяет замедлить метаболические

процессы в хранящемся органе в 7-10 раз, однако, полной остановки метаболизма не происходит, а перемещение печени в искусственные условия приводит к развитию ее дисфункции [27, 186]. Разработка методов гипотермического хранения печени базируется на создании мультикомпонентных сред хранения и реперфузии, естественных, искусственных и комбинированных, содержащих биологически активные вещества и позволяющих предупредить повреждения, вызванные охлаждением, ишемией и последующим возвратом в физиологические условия [49, 80, 95].

Согласно современным криобиологическим представлениям субнулевые температуры являются критическим этапом при охлаждении различных типов клеток [133, 134]. Это явление носит название «температурно-осмотического шока». Основным фактором, приводящим к повреждению клеток, считают фазовые переходы мембранных липидов при субнулевых температурах, которые приводят к изменению физико-химических свойств мембран. Наиболее уязвимыми являются аннулярные липиды, составляющие микроокружение мембраносвязанных белков. Изменение структуры мембран приводит к образованию каналов утечки ионов, а впоследствии и более крупных молекул, следствием чего является нарушение ионного гомеостаза и коллоидно-осмотическое набухание, а в некоторых случаях и лизис клеток. Конформационные изменения липидов мембран приводят к нарушению их транспортной функции, также происходит изменение нативной структуры мембраносвязанных ферментных комплексов [7]. Кроме того, происходят повреждения в структуре цитоскелета клеток, что приводит к ослаблению сил, удерживающих форму и объем клеток, а также к угнетению биосинтеза белка в гепатоцитах, усиливающемуся при продлении сроков хранения [240].

Охлаждение целой печени, кроме собственно температурного повреждения клеток, приводит к нарушению межклеточных контактов, необходимых для поддержания жизнеспособности и функциональной активности органа при возвращении в физиологические условия [27, 49, 178].

Важным фактором развития повреждений при охлаждении печени является гипоксия, которая вынуждает клетки печени перейти к анаэробному гликолизу,

который не в состоянии поставлять достаточное для полноценного функционирования количество макроэргов [180, 193, 200]. Накопление лактата, продукта анаэробного гликолиза, приводит к развитию ацидоза в клетках печени. Изменение pH является адаптацией к стрессу (инактивация щелочных гидролитических ферментов), однако, при этом угнетается активность ферментов, имеющих нейтральный оптимум pH [48].

Нарушение ионного гомеостаза и мембранного транспорта при ишемии/реперфузии приводит к истощению пула митохондриального GSH в гепатоцитах. Генерация свободных радикалов является причиной повреждения собственной электрон-транспортной цепи митохондрий и ведет к развитию внутриклеточного оксидативного стресса, в том числе путем связывания активных форм кислорода с цитозольным GSH, особенно интенсивно этот процесс протекает при нормотермической реперфузии [28, 114, 243]. Помимо окисления GSH в реакциях нейтрализации свободных радикалов, показано, что при реперфузии осуществляется его активный транспорт через GSH-транспортер для защиты сосудов от активных форм кислорода из клеток Купфера [133]. Такой защитный механизм, приводящий к сенситизации гепатоцитов при потере GSH, подчеркивает важнейшую роль сохранности эндотелиальных клеток для поддержания жизнеспособности органа в ходе ишемии/реперфузии [60, 133, 134].

Внутриклеточная генерация свободных радикалов является критической на этапе холодового хранения печени [73, 108, 114, 153]. Само по себе охлаждение печени повышает чувствительность гепатоцитов и эндотелиальных клеток к действию индукторов перекисных процессов, причем этот процесс зависит от длительности охлаждения. Количество индуктора процессов ПОЛ, необходимого для гибели максимального числа гепатоцитов, уменьшается в 3 раза через 24 ч гипотермического хранения по сравнению с нативными клетками [241].

В первую очередь при охлаждении страдают эндотелиальные клетки, что обусловлено их высокой чувствительностью к микроокружению и гипоксии [60]. Нормотермическая реперфузия уже в первые минуты приводит к необратимым повреждениям этих клеток, нарушению микроциркуляции в печени и развитию

центролобулярного некроза [66]. Нарушение баланса между вазоконстрикторами и дилаторами, синтезируемыми эндотелиальными клетками, приводит к дальнейшему ухудшению состояния сосудов [127]. На начальных этапах нормотермической реперфузии индуцируется экспрессия эндотелиального фактора роста в гепатоцитах, который, как вазоконстриктор, усиливает повреждения клеток печеночного синусоида [59, 72]. Эти события являются причиной того, что эндотелиальные клетки становятся активными поставщиками свободных радикалов в реперфузируемом органе [165, 175, 191, 225].

Развитие перекисных процессов при нормотермической реперфузии носит угрожающий характер. При этом вклад вносят как низкомолекулярные компоненты, так и ферментативные системы образования активных форм кислорода [197, 200, 207]. При гипоксии, вследствие разложения макроэргов, происходит накопление субстратов (ксантина и гипоксантина) для цитозольной НАДН-зависимой супероксиданион-генерирующей системы, которые быстро утилизируются при реперфузии, являясь важным источником свободных радикалов [148, 149, 162]. Однако, существуют данные [81], что ксантиноксидазная реакция не вносит существенного вклада в накопление свободных радикалов при ишемии/реперфузии. Данное противоречие, вероятно, обусловлено исходным состоянием пула окислительно-восстановительных эквивалентов, необходимых для работы этой системы. Тем не менее, большинство авторов, исследовавших данную проблему, подчеркивает основную роль ксантиноксидазно-дегидрогеназной системы в накоплении свободнорадикальных продуктов при ишемии/реперфузии [148, 205, 235].

Нарушения в работе САОЗ наблюдаются уже на этапе холодового хранения печени. Наиболее чувствительна к нему КАТ, что обусловлено ее сложной надмолекулярной структурой [143]. Показано, что краткосрочная ишемия не влияла на активности супероксиддисмутазы и ГП, угнетая при этом активность КАТ путем образования неактивного комплекса без изменения количества фермента [117, 212]. Последующая реперфузия приводила к дальнейшему снижению активности КАТ, и угнетению активности других ферментов САОЗ, сопровождающемуся деградацией

их мРНК [212]. Реперфузионная инактивация КАТ может быть обусловлена как изменением ультраструктуры пероксисом, так и протеолизом существующих молекул фермента [117].

Важную роль в реализации механизмов антиоксидантной защиты при ишемии/реперфузии играет ГП [133, 135, 137]. Как эволюционно более молодой фермент, она обладает высокой устойчивостью к действию гипоксии [30]. Поэтому краткосрочная (60 мин) ишемия может привести даже к повышению ее активности, особенно в митохондриальной и микросомальной фракциях клетки [118]. Согласно данным других авторов, даже 40-минутная гипоксия снижает активность фермента [205]. Продление сроков хранения приводит к угнетению активности ГП и изменению ее локализации внутри клетки (выход из митохондрий вследствие нарушения проницаемости мембран) [137]. Снижение активности митохондриального изофермента ГП-1 является критическим для энергетического и дыхательного статуса этих органоидов, так как нарушается процесс утилизации супероксиданиона, образованного в митохондриях [94].

Значительное снижение содержания GSH и повышение концентрации GSSG при ишемии/реперфузии требует повышения ГР активности. Однако, угнетение ее активности наблюдается уже на ранних этапах повреждения, особенно выражено при реперфузии [68]. Также ишемия/реперфузия приводят к снижению активности ключевого фермента биосинтеза GSH – γ -глутамилцистеинсинтетазы [149]. Ее значительный вклад в поддержание пула трипептида при ишемии/реперфузии подтверждается тем фактом, что добавка аминокислот-предшественников GSH в среду хранения и реперфузии частично предупреждает развитие повреждений [93, 148, 237].

Также при ишемии/реперфузии наблюдается угнетение активности всех форм супероксиддисмутазы, в том числе митохондриальной [68, 118, 212]. Учитывая важность контроля генерации свободных радикалов митохондриями при ишемически-реперфузионных повреждениях, снижение активности этого фермента является критическим фактором в развитии внутриклеточного оксидативного стресса [204]. Показана эффективность экзогенного введения векторов производных

супероксиддисмутазы и КАТ для снижения ишемически-реперфузионных повреждений печени [137, 228, 243].

Активация клеток Купфера при ишемии/реперфузии приводит к повышению экспрессии основных провоспалительных цитокинов – ФНО α и ИЛ-1 [133, 154, 208, 223]. Стрессорное воздействие при реперфузии приводит к синтезу белков комплемента в гепатоцитах, которые, в свою очередь, влияют на экспрессию молекул адгезии и провоспалительных генов в клетках Купфера и эндотелиальных клетках [133, 246]. Регуляция этих процессов происходит при помощи редокс- и цитокин-чувствительных факторов транскрипции [133, 250, 251]. Медиатором, опосредующим взаимодействие между свободными радикалами и цитокинами при ишемически-реперфузионных повреждениях печени, во многих случаях является NO [53, 127, 175]. Критическая роль его оптимальной концентрации для снижения таких повреждений подчеркивается многими авторами [107, 127, 128, 172]. Показано защитное действие аргинина и других доноров NO на процессы ПОЛ, энергетическое состояние клеток печени при ишемии/реперфузии, экспрессию молекул адгезии [107, 164, 191]. Однако, сверхактивация индуцибельной формы NO-синтазы является одним из критических факторов развития реперфузионных повреждений [165, 172, 234].

Апоптозу отводят центральную роль в гибели клеток при ишемии/реперфузии [107, 134, 211, 209, 237]. Показано, что гипотермическое хранение печени инициирует апоптоз гепатоцитов и эндотелиальных клеток печеночного синусоида, критическим медиатором этого процесса является хелатируемое свободное железо, мощный прооксидант, накапливающийся в клетках при холодовом хранении [141]. Источником ионов железа является ряд гемсвязывающих белков печени, которые обладают выраженной чувствительностью к повреждающему действию холода и гипоксии. Ключевым проапоптотическим сигналом при нормотермической реперфузии является усиление экспрессии ФНО α , чувствительность к которому у гепатоцитов и эндотелиальных клеток опосредуется свободными радикалами [211, 207, 234]. Значительное снижение содержания GSH также является критическим

фактором в ФНО α -опосредованном апоптозе клеток печени при ишемии/реперфузии [91, 170, 184, 237].

Важная роль цитокинов в усилении повреждений при ишемии/реперфузии показана путем применения иммунодепрессантов, ингибиторов экспрессии, антисывороток и антагонистов к рецепторам ФНО α и ИЛ-1 β [122, 199, 223]. Снижение экспрессии этих цитокинов или чувствительности к ним при ишемии/реперфузии приводило к улучшению состояния печени, наблюдалось снижение содержания свободных радикалов и степени элиминации аминотрансфераз. Согласно данным [132] применение иммунодепрессантов снижало уровень экспрессии ФНО α , но не влияло на интенсивность свободнорадикальных процессов в печени в ходе ишемии/реперфузии. Обработка антителами к ФНО α вызывала уменьшение количества апоптотических клеток путем изменения активности каспаз 3 и 9 [69, 101]. Применение антагонистов к рецепторам ИЛ-1 позволяло повысить выживаемость реципиентов и приводило к снижению экспрессии ФНО α в органе в ходе реперфузии [208].

Кроме того, показано, что физиологическая смерть мозга донора приводит к запуску цитокинового каскада, являющегося причиной необратимых изменений в кадаверном органе [239].

Таким образом, ГХ/НР печени приводит к необратимым метаболическим нарушениям в органе и включает в себя все основные универсальные этапы развития повреждения. Существующие методы консервации лимитируются сроками безопасного хранения, позволяющего поддерживать функциональную полноценность печени. В связи с этим, требуется поиск новых, альтернативных методов, пролонгирующих сроки ГХ изолированного органа.

1.3. Особенности повреждения печени при острой интоксикации тетрахлорметаном

Тетрахлорметан (ТХМ, CCl_4) используется в производстве фреонов, для экстрагирования жиров и алкалоидов, что создает условия для возникновения

профессиональных интоксикаций. В последние годы ТХМ используется для синтеза, очистки и экстракции органических соединений. При острой интоксикации ТХМ развивается острый токсический гепатит, при длительном отравлении - хронический гепатит, вплоть до цирроза печени [2, 40].

CCl_4 относится к числу гепатотропных агентов, обладающих прямой цитотоксичностью, т.е. его метаболиты, связываясь с «критическими молекулами» в клетках печени, могут их повреждать [48, 136]. Внимание исследователей ТХМ привлекает благодаря своему разнонаправленному действию, обусловленному его физико-химическими свойствами: липофильностью и способностью быстро образовывать активные метаболиты, которые способны ковалентно связываться с макромолекулами [2, 20, 25, 40, 71].

Первой мишенью для ТХМ являются паренхиматозные клетки печени, в которых сосредоточен аппарат нейтрализации ксенобиотиков. Благодаря своей липофильности ТХМ легко проникает через плазматическую мембрану гепатоцитов. Образование активных метаболитов CCl_4 начинается уже на этапе взаимодействия с мембраной клеток, поэтому наблюдается быстрое развитие повреждения [8, 40, 46]. Разрушение гепатоцитов приводит к элиминации маркерных ферментов (аланин- (АЛТ) и аспартатаминотрансферазы (АСТ)). Уже через сутки после интоксикации наблюдается увеличение активности этих ферментов в несколько раз [34, 37, 40, 84, 176], продолжительность повышения зависит от степени интоксикации. Также в сыворотке крови повышается активность щелочной и кислой фосфатаз, γ -глутамилтранспептидазы, ацетилхолинэстеразы [2, 9, 10], происходит увеличение уровня общего билирубина, количества продуктов обмена белков; снижение содержания фосфолипидов, мочевины, суммарного белка [10, 21, 37, 40, 44].

Отравление CCl_4 характеризуется наличием в цитоплазме гепатоцитов вакуолей различных размеров. Уже в первые часы после отравления в паренхиматозных клетках печени происходит набухание митохондрий и рассеивание по цитоплазме гранулярных мембран эндоплазматического ретикулума [8, 46]. Проникновение ТХМ в эндоплазматический ретикулум приводит к активации системы микросомального окисления, в первую очередь, цитохрома Р-

450, который, работая в циклическом режиме, становится постоянным источником электронов, и, как следствие, свободных радикалов. Образованные при биотрансформации активные метаболиты CCl_4 ($\text{CCl}_3^\bullet$, $\text{CCl}_3\text{O}_2^\bullet$) обладают высокой реакционной способностью, и могут мигрировать далеко от места образования [25, 40]. Степень гепатотоксичности CCl_4 коррелирует с содержанием цитохрома P-450 в печени [20, 40]. Ковалентное связывание активных метаболитов с макромолекулами приводит к нарушению работы большинства систем в гепатоцитах, в том числе детоксицирующей, уже в первые часы после введения CCl_4 , и может быть основной причиной гибели организма при отравлении галогензамещенными углеводородами [2, 20, 21, 25].

При острой интоксикации ТХМ происходит нарушение углеводного обмена [2, 10, 169]. Наблюдается уменьшение уровня гликогена в печени, при этом особую роль играет развитие гипоксии, обусловленное центролобулярным некрозом, с преобладанием анаэробного гликолиза, угнетение синтеза АТФ, необходимого для образования гликогена [2, 169]. Нарушение углеводного обмена приводит к жировой инфильтрации печени. Наблюдается повышение концентрации фосфолипидов, триацилглицеридов, ненасыщенных жирных кислот [44, 71, 176]. При значительном ожирении клеток печени происходит нарушение печеночного кровотока, связанного с сужением синусоидов за счет увеличения в объеме гепатоцитов. Ухудшение кровоснабжения клеток печени служит причиной дальнейшего развития центролобулярного некроза [2, 40, 48]. Одним из ведущих звеньев в гепатотоксичности ТХМ является образование патологических липидов с сильно измененной геометрией ацильной цепи. Их включение в мембраны органелл гепатоцитов приводят к морфологическим нарушениям. При этом создаются условия для пассивного транспорта ионов и метаболитов, повреждаются мембраносвязанные белковые комплексы, понижается регуляторное влияние гормонов, медиаторов и т.д. При далеко зашедшем процессе это приводит к угнетению активности фосфолипаз, появлению лизофосфолипидов, альдегидов, кетонов, нарушающих структуру мембран, что ведет к увеличению их проницаемости и текучести [40, 71].

Изменение внутриклеточной концентрации ионов кальция приводит к нарушению степени проницаемости мембран, процессов биосинтеза и секреции в гепатоцитах, изменению активности ферментных систем, в том числе антиоксидантной [10, 14, 15, 26, 253]. Кроме того, повышение внутриклеточной концентрации ионов кальция приводит к активации Ca^{2+} -зависимых протеиназ, фосфолипаз и эндонуклеаз [9, 48]. Высокореактивные молекулы способны повреждать Ca^{2+} -зависимую АТФазу путем ковалентного связывания или окисления тиоловых групп белка, или за счет перекисного окисления окружающих фермент липидов. Повышение концентрации ионов кальция также вызывает повреждения цитоскелета [25, 40]. Высвобождение Ca^{2+} из митохондрий приводит к нарушению их дыхательной и энергетической функции, что проявляется в снижении интенсивности тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования, а также их разобщении [21, 40].

ТХМ вызывает повреждение как транскрипционного, так и трансляционного аппарата клеток. Уже через 15 мин после интоксикации наблюдается диссоциация полирибосом в гепатоцитах [25]. Активные метаболиты ТХМ способны, прямо связываясь с хроматином и ядерными белками, дестабилизировать нормальную работу ядерного аппарата [9, 17]. Применение антиоксидантов позволяет предупредить дестабилизирующее действие ТХМ на генетический аппарат гепатоцитов [17].

Повреждение плазматической мембраны гепатоцитов, активация системы микросомального окисления, накопление реакционно-способных метаболитов является причиной запуска свободнорадикальных процессов [10, 13-15, 17, 26]. Активация ПОЛ происходит в первые часы после интоксикации, при этом наблюдается накопление первичных и вторичных продуктов ПОЛ – диеновых конъюгатов и МДА [13-15, 26], резкое падение содержания GSH и других антиоксидантов, снижение активности ключевых ферментов САОЗ – супероксиддисмутаза, КАТ, ГП, ГР [14, 15, 26, 45, 173, 176, 252]. Угнетение активности обусловлено прямым взаимодействием активных метаболитов с ферментами [25], нарушением окислительно-восстановительного равновесия [14,

15], снижением стабильности мРНК и повреждением белоксинтезирующего и транскрипционного аппарата [17, 25, 244]. Так, например, нарушение синтеза и секреции альбумина [19, 62, 71], содержащего много SH-групп, при повреждении $CC1_4$ является важным фактором, влияющим на снижение содержания GSH в гепатоцитах [76, 79, 176].

$CC1_4$ индуцирует NO-синтазу, что приводит к накоплению оксида азота, чья важная роль в развитии токсического гепатита подчеркивается многими авторами [22, 48, 89, 136, 252]. Показано, что совместное введение ТХМ и аргинина (в качестве источника NO) приводит к усугублению степени повреждения печени [22], как путем воздействия на эндотелиальные клетки печеночного синусоида, так и на пути трансдукции цитокиновых сигналов [89, 146, 252]. Ингибирование NO-синтазы приводит к снижению экспрессии провоспалительных ФНО α и ИЛ-1 β [160].

Согласно современным представлениям, развитие воспалительного ответа при повреждении печени ТХМ происходит, как описано в разделе 1.1. Гипоксия клеток в зоне некроза, гиперпродукция активных форм кислорода гепатоцитами и появление эндотоксинов приводит к активации клеток Купфера. Запуск воспалительного ответа осуществляется на ранних этапах после отравления, так как активные метаболиты $CC1_4$ вызывают быстрое нарушение межклеточных взаимодействий в печени [46]. Клеточная кооперация является важнейшим фактором в реализации не только воспалительного, но и репарационного процесса [97, 146, 178, 226], раннее повреждение межклеточных контактов усугубляет степень повреждения печени.

Приоритетность некротической гибели клеток при ТХМ-индуцированном повреждении печени в последние годы ставится под сомнение многими авторами [48, 136, 220]. Даже в случае массивного некроза, вызванного дыхательным взрывом и атакой свободных радикалов, сенситизация клеток к действию цитокинов, является причиной вступления клеток печени в апоптоз [136, 210]. $CC1_4$ повышает чувствительность гепатоцитов к действию ФНО α , что приводит к активации в них проапоптотических генов [136, 210]. При этом показано, что применение антисыворотки или антагонистов к рецепторам ФНО α снижает

цитокин-опосредованное повреждение печени, но не влияет на прямую химическую токсичность ТХМ по отношению к гепатоцитам [210]. Кроме того, ФНО α и ИЛ-1 β индуцируют быстрое окисление глутатиона [52, 166, 190], что также является причиной повышения чувствительности клеток к апоптотическим сигналам [91, 170, 245] и вызывает нарушение синтеза макроэргов в гепатоцитах [52]. При вступлении клеток печени в фазу регенерации ФНО α вызывает апоптоз в клетках Ито для ограничения фиброгенеза [101, 102].

Несмотря на этиологические отличия между описанными ишемически-реперфузионными и токсическими повреждениями печени, основные механизмы развития патологии и последующей репарации в целом являются общими, разница заключается в последовательности включения отдельных этапов процесса. К общим моментам можно отнести развитие оксидативного стресса, включение механизмов, опосредуемых цитокинами и другими регуляторными молекулами, повреждение всех типов клеток печени и нарушение их основных функций, которые могут сопровождаться различными типами гибели клеток. Неудивительно, что при разработке методов коррекции этих повреждений, во многих случаях, ученые руководствуются общими принципами.

1.4. Пути коррекции повреждения печени

Разработка методов коррекции повреждений печени различной этиологии является актуальной проблемой современной гепатологии. В настоящее время существует несколько направлений, общей целью которых является восстановление или поддержание основных функций печени.

Не до конца разрешенной остается проблема длительного хранения органа перед трансплантацией, так как разработанные методы и среды хранения не позволяют сохранить полноценный орган дольше 20 ч [80, 181, 186]. При этом возможны варианты предварительной обработки животных *in vivo*, а также использование различных добавок на этапах холодового хранения органа или

последующей нормотермической реперфузии. В случае патологии *in vivo* коррекция может осуществляться на любом этапе.

Основные существующие методы направлены либо на снижение свободнорадикальных процессов, либо цитокин-опосредованного ответа на воздействие. Кроме того, существуют методы, направленные на коррекцию энергетического состояния.

Для снижения интенсивности ПОЛ часто применяют прямые антиоксиданты, такие как α -токоферол, аскорбат, различные синтетические аналоги низкомолекулярных антиоксидантных соединений. Показано ослабляющее действие α -токоферола на процессы ПОЛ при ишемии/реперфузии [108, 153] и отравлении CCl_4 [15, 17]. Кроме того, наблюдался антиоксидантный эффект мелатонина при таких повреждениях [83, 176, 205]. Эффективность применения антиоксидантов прямого типа действия повышается в условиях их предварительного введения, так как при этом изменяется антиоксидантный статус организма, который участвует в регуляции экспрессии стрессорных белков [183]. В случае гипотермического хранения подчеркивается важность присутствия антиоксидантов в среде нормотермической реперфузии, но не в среде хранения [191, 241].

Другим способом повысить антиокислительную активность является применение GSH или его предшественников (N-ацетилцистеина, цистеина, глицина, S-аденозилметионина). Добавка GSH в среду хранения частично предупреждает повреждение печени [114, 148, 241], при введении CCl_4 -интоксцированным животным глутатион также проявляет эффект, который является краткосрочным [63, 184]. Использование предшественников GSH, в частности N-ацетилцистеина и S-аденозилметионина, является более эффективным в обоих случаях [87, 93, 148, 184, 237]. Однако, показано, что если уровень эндогенного GSH на момент добавки предшественников уже понижен, то эти соединения проявляют мощный прооксидантный эффект, усиливая повреждение печени [79].

Показана эффективность экзогенного введения супероксиддисмутазы и КАТ, а также их производных, направленных на непаренхиматозные клетки печени, при ишемии/реперфузии [137, 228, 246] и токсическом гепатите [243].

Для сохранения энергетического статуса клеток при повреждении применяют различные пиридиновые производные, которые помимо поддержания содержания макроэргов препятствуют гиперпродукции провоспалительных цитокинов и развитию оксидативного стресса путем индукции противовоспалительных стрессорных белков [234]. Показано защитное действие аденозина и его синтетических аналогов при CCl₄-индуцированном повреждении печени [62, 126]. Инфузия с липосомами АТФ при ишемии/реперфузии вызывала снижение элиминации трансаминаз, количества апоптотических клеток и повышение содержания макроэргов в печени [172]. Также значительным протекторным действием при ишемии/реперфузии обладают субстраты и продукты ключевых реакций гликолиза: пируват [209, 213], фосфоенолпируват [193], глюкозо-1,6-бисфосфат [128], которые предупреждают активацию клеток Купфера и поддерживают энергетический статус клеток печени.

Для снижения интенсивности цитокин-опосредованного ответа печени на повреждение применяют антисыворотки, антагонисты рецепторов и иммунодепрессанты, позволяющие снизить чувствительность клеток или количество ИЛ-1 β и ФНО α . Все варианты являются эффективными для защиты клеток печени от действия ишемии/реперфузии [69, 122, 132, 199, 208, 223] или CCl₄ [84, 188]. Кроме того, блокада клеток Купфера хлоридом гадолиния приводит к снижению степени повреждения при ишемии/реперфузии [61, 154] и токсическом гепатите [169]. Эффективность применения ингибиторов воспалительного ответа носит спорный характер, так как для развития полноценного регенерационного ответа в печени необходимо наличие провоспалительных факторов, синтезируемых непаренхиматозными клетками, в частности клетками Купфера [97, 178, 247]. Также следует отметить, что использование блокаторов иммунного ответа при ТХМ-индуцированном гепатите не препятствует прямому химическому поражению гепатоцитов [210]. Наиболее эффективным при ишемии/реперфузии и токсическом поражении печени является совместное использование экзогенных антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутаза и КАТ) и антисывороток к провоспалительным цитокинам [199].

Интересным является факт, что предобработка животных провоспалительными цитокинами ФНО α и ИЛ-1 снижает последующее повреждение печени путем появления толерантности у клеток к действию эндогенных факторов [196, 198]. Эффекты обусловлены снижением количества рецепторов к провоспалительным цитокинам на поверхности гепатоцитов.

Другим вариантом коррекции патологии при ишемии/реперфузии и СС14-индуцированном гепатите является применение противовоспалительных цитокинов (ИЛ-4, 10, 13) [139, 250, 251], купирующих развитие иммунного ответа, и экзогенных ростовых факторов, таких как ФРГ, ЭФР, ФРФ, ТФРГ [74, 158, 194, 201, 225], стимулирующих регенерацию печени. Эти вещества по-разному реализуют свои эффекты. ЭФР не влияет на экспрессию провоспалительных цитокинов, но блокирует проапоптотические гены [86, 244]. ФРГ, ЭФР, ТФРГ стимулируют биосинтез ДНК и РНК в гепатоцитах [97, 157, 248], что приводит к нормализации морфо-функционального состояния клеток. Так, например, превентивное введение ФРГ предупреждает элиминацию трансаминаз и снижает степень повреждения эндотелиальных клеток при ишемии/реперфузии [194]. ФРГ повышает выживаемость животных и предупреждает гиперпродукцию провоспалительных цитокинов при ТХМ-индуцированном гепатите [125, 253] и ишемии/реперфузии [194].

Альтернативой многим методам традиционной терапии в последнее время является клеточная и тканевая трансплантация [16, 39, 43, 221]. Показана эффективность применения трансплантации гепатоцитов при ТХМ-индуцированном гепатите [34, 116]. При этом фетальные клетки имели более выраженный и пролонгированный эффект, чем зрелые гепатоциты [6, 34]. Согласно современным представлениям, эффекты клеточной терапии во многом опосредуются секретлируемыми биологически активными веществами [16, 43, 233]. Эмбриональные клетки характеризуются высоким содержанием различных цитокинов и ростовых факторов, контролирующих рост и дифференцировку. В настоящее время в эмбриональных тканях показано наличие следующих биологически активных компонентов, пептидной и белковой природы,

принимающих участие в регуляции процессов роста и дифференцировки: гормон роста, ФРГ, ТФРГ, ФРФ, ЭФР, ИЛ-1, 3, 4, 6, 10, 13, ТФР α и β , инсулин и инсулиноподобные факторы роста (ИПФР), ФНО α и др. [57, 124, 129, 131, 157, 167, 168, 179, 202, 214, 229]. Важным стадиоспецифическим белком является α -фетопротейн [3]. Кроме того, в ходе эмбрионального развития синтезируются стадиоспецифические факторы (survivin и др.), обладающие выраженным антиапоптотическим действием [103, 121].

Показано выраженное модулирующее NO-опосредованное действие овечьего фетального экстракта на цитокиновый профиль, измененный с возрастом [111]. Кроме того, фетальный экстракт стимулировал репарацию нуклеотидов в поврежденных гепатоцитах [77]. Применение экстракта из эмбриональных клеток позволяло восстановить чувствительность к митогенам у покоящихся фибробластов [55].

В нашей лаборатории показано, что превентивное введение экстракта эмбриональных тканей человека за трое суток до острой интоксикации ТХМ не влияло на элиминацию аминотрансфераз и приводило к снижению уровня ТБК-активных продуктов в первые сутки после отравления, в дальнейшем эффект нивелировался. Было выдвинуто предположение, что подобная динамика обусловлена краткосрочностью действия препарата [34, 37]. Введение данного экстракта эмбриональных тканей при экспериментальном циррозе демонстрировало положительное влияние на репаративные процессы в печени, хотя действие было менее выраженное, чем при трансплантации клеток эмбриональной печени [34]. Также показано, что введение различных фракций эмбриональных тканей, после отравления ТХМ или одновременно с ним, приводит к снижению степени повреждения печени, наиболее эффективным был тотальный эмбриональный препарат [36].

Таким образом, проблема эффективной защиты печени от повреждений, связанных с развитием оксидативного стресса и цитокин-опосредованного иммунного ответа, остается не до конца разрешенной. Существующие методы не позволяют полностью нейтрализовать губительное действие повреждающих

агентов, так как, в основном, затрагивают только некоторые звенья патологической цепи. Существует необходимость разработки комплексных подходов, для реализации разнонаправленных и всеобъемлющих эффектов. Актуален поиск универсальных методов коррекции токсического гепатита и продления сроков гипотермического хранения печени с минимальными повреждениями при возвращении в физиологические условия.

Состояние САОЗ и уровень свободнорадикальных процессов при повреждении печени является ярким показателем как дисфункции, так и последующей регенерации органа. При этом прооксидантно-антиоксидантное равновесие тесно взаимосвязано с балансом регуляторных молекул в печени. В нашей работе сделана попытка оценить влияние предварительного введения бесклеточных эмбриоспецифических факторов на степень повреждения и состояние САОЗ печени крыс при гипотермическом хранении и остром повреждении печени ТХМ.

РАЗДЕЛ 2

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для выполнения работы использовали белых беспородных крыс. Для модели токсического гепатита — крыс-самцов массой 150-200 г (n=60). Для моделирования гипотермического хранения печени использовали самок массой 200-250 г (n=35). Животные содержались в стандартных условиях вивария ИПКиК НАНУ. Эксперименты на животных осуществляли в соответствии с правилами «Европейской конвенции защиты позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях». Все манипуляции с животными проводили под поверхностным эфирным наркозом.

В качестве источника эмбриоспецифических факторов (ЭСФ) использовали цитозоль эмбриональных тканей человека (ЦЭТ) и его термостабильную фракцию (ТСФ).

Эмбрионы были получены после письменного разрешения донора в результате планового прерывания беременности. Для получения ЦЭТ 40%-ный гомогенат мягких тканей плодов человека 9-12 недель гестации центрифугировали в течение 40 мин при 8000 g [33]. Полученный супернатант подвергали высокоскоростному ультрацентрифугированию (105 000 g, 90 мин) для получения постмикросомальной фракции, содержащей водорастворимые компоненты.

Для получения термостабильной фракции ЦЭТ выдерживали на водяной бане при температуре 65 °C в течение 20 мин, охлаждали и центрифугировали 10 мин при 3000 об/мин. Для экспериментов использовали полученный супернатант [12].

Все работы по получению ЭСФ проводили в стерильных условиях на холоду. ЭСФ хранили при температуре –18 °C (в условиях морозильной камеры). Эмбриоспецифические факторы крысам вводили в бедренную вену, в дозе 0,3 мл/100 г массы. Контрольным группам вводили равный объем физиологического раствора.

2.1. Моделирование острого СС1₄-индуцированного гепатита

Экспериментальный токсический гепатит моделировали путем однократного внутрибрюшинного введения 40%-ного масляного раствора СС1₄ в дозе 0.3 мл/100 г массы. В зависимости от условий предобработки ЭСФ животные были разделены на следующие группы:

Интактная группа – животные не подвергались какому-либо воздействию.

Контрольная – животным за 24 или 4 ч до интоксикации внутривенно вводили физиологический раствор.

1-я группа – животным за 4 ч до инициации гепатита вводили ЦЭТ.

2-я группа – животным за 24 ч до интоксикации вводили ЦЭТ.

3-я группа – животным за 4 ч до отравления вводили ТСФ.

Через 24, 48 и 72 ч после инициации токсического гепатита производили забор образцов крови из хвостовой вены для исследования сывороточных показателей. Крыс выводили из эксперимента через 3 или 7 суток после отравления.

2.2. Условия гипотермического хранения и нормотермической реперфузии печени

После анестезии эфирным наркозом брюшную полость животных вскрывали, в *v. cava* вводили гепарин (100 Ед), после чего подводили лигатуру под *v. porta* и вводили в вену иглу. Сразу же после начала перфузии надсекали *v. cava inf.* и пережимали пинцетом *v. cava sup.*, чтобы обеспечить отток перфузата из печени. Орган отмывался от крови небольшой порцией (25-40 мл) охлажденного раствора Хэнкса. Свидетельством правильного хода отмывания печени от крови служило быстрое и равномерное просветление с отсутствием мозаичных пятен. Затем консервирующий раствор (сахарозо-содержащий раствор (ССР), разработанный в Институте проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (табл. 2.1) [35]), охлажденный до 0 °С, прокачивали с помощью перистальтического насоса с перфузионным потоком 20-30 мл/мин. Объем консервирующего раствора составлял

130 или 150 мл. После окончания перфузии портальную вену надсекали и вставляли катетер, который фиксировался лигатурой. Печень аккуратно извлекали и переносили в пластиковые бьюксы, наполненные консервирующим раствором (0 °С) и хранили в бытовом холодильнике при 4 °С в течение 1 или 24 ч.

После холодной экспозиции печень реперфузировали в течение 60 мин при 37 °С в среде Кребса-Рингера (бикарбонатный буфер, pH 7,4) (Таблица 2.1). Перед началом перфузии в буфер добавляли глюкозу (1 мг/мл) и насыщали его карбогеном в течение 5 мин. Скорость потока регулировали в диапазоне 3-4,5 мл/мг ткани /мин при гидростатическом давлении 30-40 мм вод.ст.

Через 10, 30 и 60 мин реперфузии отбирали аликвоты перфузата для оценки его ферментативной активности. Кроме того, перед началом и по окончании реперфузии брали навеску (0,5 г) ткани печени для биохимических исследований.

Таблица 2.1

Состав растворов для гипотермического хранения и нормотермической реперфузии

Сахарозо-содержащий раствор

Компоненты раствора	Концентрация mM
Сахароза	250
KCl	5
Na ₂ HPO ₄	0,5
KH ₂ PO ₄	0,45
MgSO ₄	0,5
CaCl ₂	0,8
pH	7,4

Кребс – Рингер бикарбонатный буфер

NaCl	120
KCl	4,8
NaHCO ₃	25
KH ₂ PO ₄	1,2
MgSO ₄ x 7H ₂ O	1,2
CaCl ₂	2,6
HEPES	10
Глюкоза	4,5

2.3. Методы биохимического анализа

Биохимические показатели исследовались в сыворотке крови, гомогенатах печени и бесклеточном перфузате.

Кровь собирали из хвостовой вены в пробирки, охлаждали при 0–4 °С в течение 20 мин и центрифугировали 20 мин при 3000 об/мин. Полученную сыворотку хранили на льду до изучения показателей.

Гомогенаты печени. При моделировании СС14-индуцированного гепатита, печень животных сразу после декапитации перфузировали *in situ* охлажденным физиологическим раствором, извлекали и помещали в охлажденную среду. 1 г печени гомогенизировали в 3 мл 50 mM *tris*-HCl буфера (pH 7,4), содержащего 50 mM NaCl. Гомогенат хранили на льду до биохимического анализа.

В случае гипотермического хранения печени перед проведением реперфузии на дополнительную долю накладывали лигатуру, отделяли 0,5 г печени. По окончании реперфузии проводилась аналогичная операция. 20%-ный гомогенат готовили на 50 mM *tris* -HCl буфера (pH 7,4), содержащем 50 mM NaCl. Гомогенат хранили на льду до изучения показателей. Непосредственно после приготовления 0,5 мл гомогената смешивали с 0,5 мл 12% трихлоруксусной кислоты, выдерживали 5 мин на льду и центрифугировали 5 мин при 3000 об/мин. Супернатант использовали для определения содержания АТФ в ткани печени [51].

Для исследования содержания восстановленного глутатиона 1 г печени помещали в 9 мл 5% метафосфорной кислоты. Готовили гомогенат, который центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин. Для проведения реакции использовали надосадочную жидкость [38].

2.3.1. Определение аминотрансферазной активности

Аминотрансферазную активность сыворотки крови определяли ферментативным методом при помощи экспресс-наборов («Биокон», Россия). Принцип метода основан на измерении интенсивности поглощения НАДН при 340 нм, количество которого снижается пропорционально активности трансаминаз.

Активность АСТ определяли по методу Bergmeyer H.U. et al. [70]. АСТ катализирует реакцию переноса аминогруппы от аспартата на кетоглутарат, с образованием глутамата и оксалоацетата. Оксалоацетат восстанавливается под воздействием малатдегидрогеназы с образованием малата, при этом происходит окисление НАДН.

В состав набора входят: *реагент 1* – аспартат (2,5 mM); НАДН (2,5 μM), этилендиаминтетраацетат (ЭДТА) (0,063 mM); лактатдегидрогеназа (ЛДГ) (7,0 E); малатдегидрогеназа (3,75 E); азид натрия (0,046 mM); сахароза (0,146 mM); *tris* -HCl буфер (0,8 mM). *Реагент 2* – раствор кетоглутарата в 0,08 M *tris* -HCl буфере (pH 7,8).

Активность АЛТ исследовали по методу Вроблевского в модификации Bergmeyer H.U. et al. [70]. АЛТ катализирует реакцию переноса аминогруппы от аланина на кетоглутарат с образованием глутамата и пирувата. В присутствии ЛДГ пируват восстанавливается до лактата, при этом происходит окисление НАДН.

В состав набора входят: *реагент 1* – аланин (6,25 mM); НАДН (2,5 μM), ЭДТА (0,063 mM); ЛДГ (25 E); азид натрия (0,046 mM); сахароза (0,146 mM); *tris* -HCl буфер (0,8 mM). *Реагент 2* – раствор кетоглутарата в 0,08 M *tris* -HCl буфере (pH 7,6).

Измерение проводилось в термостатируемых микрокуветах (T=37 °C) при постоянном перемешивании. В пробу вносили 1 мл реагента 1; 0,15 мл образца сыворотки и 0,1 мл реагента 2. Пробы спектрофотометрировали на “Cary-50” при 340 нм, снимая показания каждую минуту в течение 3 мин. При необходимости сыворотку разводили в 10 раз.

Аминотрансферазную активность рассчитывали согласно формуле:

$$A = \Delta \cdot V_1 \cdot 1000 / 6,22 \cdot V_2 \cdot 1,0$$

Где:

Δ – изменение интенсивности поглощения за 1 мин;

V_1 – общий объем пробы, мл;

1000 – коэффициент пересчета активности из Е/мл в Е/л;

6,22 – миллимолярный коэффициент экстинкции НАДН при 340 нм;

V_2 – объем исследуемого образца, мл;

1,0 – длина оптического пути, см.

Аминотрансферазную активность выражали в Е/л сыворотки (мкмоль НАДН/л сыворотки за 1 мин).

Трансаминазную активность в перфузате исследовали также как в сыворотке. Объем исследуемого образца составлял 0,1 мл. Активность рассчитывали на использованный для реперфузии общий объем раствора Кребс - Рингера (130 или 150 мл). Активность выражали в Е/V перфузата.

2.3.2. Определение содержания альбумина в сыворотке

Содержание альбумина в сыворотке крови интоксцированных животных определяли при помощи экспресс-наборов (“Sigma”, USA). Метод основан на измерении интенсивности поглощения комплекса альбумина с бромкрезоловым зеленым при 628 нм [242]. Содержание альбумина определяли на спектрофотометре “Cary-50” в 10 мкл сыворотки крови против холостой пробы. Рассчитывали по калибровочной кривой, построенной при помощи стандартного раствора бычьего сывороточного альбумина (“Sigma”, USA). Содержание альбумина выражали в г/л сыворотки.

2.3.3. Определение базального уровня ТБК-активных продуктов

Уровень ТБК-активных продуктов **в сыворотке крови** определяли по методу [4]. Метод основан на колориметрическом измерении интенсивности поглощения комплекса МДА с тиобарбитуровой кислотой (ТБК).

0,3 мл сыворотки крови разводили в 3 мл 1,4% ортофосфорной кислоты, затем приливали 1 мл 0,6% ТБК. Пробы кипятили на водяной бане в пробирках с притертыми пробками в течение 45 мин. После охлаждения к пробам приливали 4 мл бутанола, тщательно перемешивали и центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин. Бутанольную фракцию отбирали и спектрофотометрировали на

“Cary-50” против холостой пробы при 535 и 580 нм. Содержание ТБК-активных продуктов рассчитывали по следующей формуле:

$$C = (D_{535} - D_{580}) \cdot 13,3 / 0,156 \cdot 1,0;$$

Где:

D_{535} и D_{580} – интенсивности поглощения проб при соответствующих длинах волн;

13,3 – коэффициент разведения сыворотки;

0,156 – коэффициент молярной экстинкции, $\text{мкмоль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$;

1,0 – длина оптического пути, см.

Содержание ТБК-активных продуктов выражали в мкмоль МДА/л сыворотки.

Базальный уровень ТБК-активных продуктов в гомогенате печени исследовали аналогично методу [4], в модификации Арутюняна А.В. и др. [5]. В пробу вносили 0.1 мл гомогената. Расчет содержания производили по следующей формуле:

$$C = (D_{535} - D_{580}) \cdot V / 0,156 \cdot P \cdot 1,0;$$

Где:

D_{535} и D_{580} – интенсивности поглощения проб при соответствующих длинах волн;

0,156 – коэффициент молярной экстинкции, $\text{мкмоль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$;

V – общий объем пробы, л;

P – содержание белка в пробе, мг;

1,0 – длина оптического пути, см.

Базальный уровень ТБК-активных продуктов в гомогенате печени выражали в $\text{пмоль МДА/мг белка}$.

2.3.4. Определение содержания АТФ

Содержание АТФ в безбелковом центрифугате определяли при помощи экспресс-наборов (“Sigma”, USA) по методу Adams Н. [51]. Метод основан на двух сопряженных ферментативных реакциях: в первой (фосфолипидкиназной (ФЛК)) происходит расщепление 1 молекулы АТФ, в следующей, глицеральдегидфосфатдегидрогеназной (ГАФДГ), – окисление эквивалентного количества НАДН, по убыли которого оценивали уровень АТФ. Для этого

смешивали 0,3 мг НАДН, добавляли 1 мл фосфоглицеральдегид-буферного раствора, 1,5 мл H_2O и 0,5 мл исследуемого образца. Затем определяли начальную интенсивность поглощения при 340 нм на “Cary-50”. Для инициации реакции в кювету приливали 0,04 мл ФГК/ГАФДГ– ферментной смеси, пробу перемешивали, конечную экстинцию определяли через 10 мин.

Содержание АТФ рассчитывали, используя коэффициент миллимолярной экстинции для НАДН, равный $6,22 \text{ ммоль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$. Выражали в мкмоль/г сырой ткани, или на 1г белка.

2.3.5. Определение интенсивности индуцированного ПОЛ

Интенсивность индуцированного ПОЛ в печени определяли по методу [11]. Для этого 0,6 мл гомогената инкубировали 10 мин в среде, содержащей 50 mM *tris*-HCl, 50mM NaCl, 0,25 mM аскорбата и 12 μM FeSO_4 при 37 °C. Отбор аликвот суспензии (0,5 мл) осуществляли в начале и в конце инкубации. К суспензии добавляли на льду 1 мл 30% трихлоруксусной кислоты и 0,5 мл дистиллированной воды, затем пробы центрифугировали в течение 10 мин при 3000 об/мин. К надосадочной жидкости приливали 0,1 мл 5 N HCl и 1 мл 0,6% ТБК и помещали на кипящую водяную баню на 15 мин. После охлаждения, пробы спектрофотометрировали против буфера при 535 и 580 нм. Расчет скорости накопления ТБК-активных продуктов осуществляли по следующей формуле:

$$C = ((D_{535}-D_{580})_{10} - (D_{535}-D_{580})_0) \cdot V / 0,156 \cdot P \cdot T \cdot 1,0;$$

Где:

D_{535} и D_{580} – интенсивности поглощения проб при соответствующих длинах волн,
0 – в начале инкубации, 10 – в конце;

0,156 – коэффициент молярной экстинции, $\text{мкмоль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$;

V – общий объем пробы, л;

P – содержание белка в пробе, мг;

T – время инкубации, мин;

1,0 – длина оптического пути, см.

Интенсивность индуцированного ПОЛ выражали в пмоль МДА/мг белка за 1 мин.

2.3.6. Определение содержания восстановленного глутатиона

Принцип метода заключается в том, что восстановленный глутатион образует комплекс с аллоксаном. Этот комплекс имеет максимум поглощения при длине волны 305 нм. Содержание этого соединения прямо пропорционально содержанию восстановленного глутатиона в пробе [38].

Для определения содержания GSH в пробирку помещают 0,1–0,2 мл безбелкового центрифугата, к которому приливают 1 мл 0,1 N аллоксана, 1 мл K^+ - Na^+ -фосфатного буфера и 1 мл 0,5 N NaOH для инициации реакции. Точно через 6 мин реакцию останавливают добавлением 1 мл 1 N NaOH. Пробы колориметрируют против холостой пробы, содержащей безбелковый центрифугат и 1 мл дистиллированной воды вместо аллоксана.

Расчет количества глутатиона в пробе производят при помощи калибровочной кривой, построенной по стандартным растворам глутатиона. 1 мл стандартного раствора содержит 100 мкг глутатиона. Содержание глутатиона в ткани рассчитывают по формуле:

$$C = (m \cdot V_1 / V_2 \cdot P) / 307,33;$$

Где:

m – содержание глутатиона в пробе, рассчитанное по калибровочной кривой, мкг;

V_1 – общий объем безбелкового центрифугата, мл;

V_2 – объем центрифугата, взятого на определение, мл;

P – навеска ткани, г;

307,33 – молекулярная масса глутатиона.

Содержание глутатиона выражали в мкмоль / г сырой ткани.

2.3.7. Определение каталазной активности

Каталазную активность в гомогенате печени исследовали спектрофотометрически по убыли H_2O_2 при длине волны 240 нм [24]. Среда

инкубации содержала 0,01 М K^+ -фосфатный буфер, 0,5 mM ЭДТА и 15 mM H_2O_2 . Пробы инкубировали в термостатируемой кювете при 37 °С в течение 3 мин. Добавка гомогената осуществлялась из расчета 0,01–0,02 мг белка на пробу.

Активность каталазы рассчитывали по следующей формуле:

$$A = \Delta \cdot V / 1,0 \cdot 0,0394 \cdot P$$

Где:

Δ – среднее изменение интенсивности поглощения пробы за 1 мин;

V – общий объем пробы, мл;

1,0 – длина оптического пути, см;

0,0394 – коэффициент молярной экстинкции H_2O_2 , $мкмоль^{-1} \cdot см^{-1}$;

P – содержание белка в пробе, мг.

Каталазную активность выражали в $мкмоль H_2O_2/мг$ белка за 1 мин.

2.3.8. Определение глутатионпероксидазной активности

Глутатионпероксидазная активность определялась спектрофотометрически на “Cary-50” по приросту содержания окисленного глутатиона, имеющего максимум поглощения при длине волны 260 нм [45]. Пробы инкубировали в термостатируемой кювете (23 °С) в течение 3 мин. Реакционная смесь постоянно перемешивалась.

Инкубационная среда содержала 0,3 М KH_2PO_4 (pH 7,0), 3 mM ЭДТА, 1,5 mM азид натрия (для ингибирования каталазной активности). В инкубационную среду вносили гомогенат (1–3 мг белка), затем добавляли 32,5 mM GSH. Реакцию инициировали внесением 7,5 mM H_2O_2 .

Глутатионпероксидазную активность рассчитывали по следующей формуле:

$$A = \Delta \cdot V / 1,0 \cdot 0,28 \cdot P$$

Где:

Δ – среднее изменение интенсивности поглощения пробы за 1 мин;

V – общий объем пробы, мл;

1,0 – длина оптического пути, см;

0,28 – коэффициент молярной экстинкции GSSG, $мкмоль^{-1} \cdot см^{-1}$;

P – содержание белка в пробе, мг.

Активность глутатионпероксидазы выражали в мкмоль GSSG/мг белка за 1 мин.

2.3.9. Определение глутатионредуктазной активности

Активность глутатионредуктазы определялась спектрофотометрически на “Cary-50” в термостатируемых кюветах (37 °C) при 340 нм по убыли НАДФН относительно буфера. Реакционная смесь постоянно перемешивалась при помощи магнитной мешалки. Инкубационная среда 0.1 М KH_2PO_4 / K_2HPO_4 , pH 7.4, содержала 0.1 mM НАДФН и 0.5 mM ЭДТА, 1 mM GSSG [47]. В кювету с буферным раствором добавлялся гомогенат (1-3 мг белка), затем – НАДФН, реакция инициировалась добавлением окисленного глутатиона. Проба инкубировалась в течение 3 мин.

Активность глутатионредуктазы рассчитывали по следующей формуле:

$$A = \Delta \cdot V / 1,0 \cdot 0,00622 \cdot P;$$

Где:

Δ – среднее изменение интенсивности поглощения пробы за 1 мин инкубации;

V – объем опытной пробы взятой для измерения, мл;

1,0 – длина оптического пути, см;

0,00622 – микромолярный коэффициент экстинкции, $\text{nm}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$;

P – количество белка в пробе, мг.

Активность фермента выражали в нмоль НАДФН / мг белка за 1 мин.

2.3.10. Определение глюкозо-6-фосфатдегидрогеназной активности

Активность фермента определялась спектрофотометрически на “Cary-50” в термостатируемых кюветах (37 °C) при 340 нм по приросту содержания НАДФН относительно буферного раствора. Реакционная смесь постоянно перемешивалась. Инкубационная среда содержала 0,13 M *tris*-HCl, 80 mM MgCl_2 , 3,5 mM НАДФ⁺, 7,5

mM глюкозо-6-фосфата. Добавка гомогената производилась из расчета 4–6 мг белка на пробу [192].

Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназную активность рассчитывали согласно формуле:

$$A = \Delta \cdot V / 1,0 \cdot 0,00622 \cdot P;$$

Где:

Δ – среднее изменение интенсивности поглощения пробы за 1 мин инкубации;

V – объем опытной пробы взятой для измерения, мл;

1,0 – длина оптического пути, см;

0,00622 – микромолярный коэффициент экстинции, $\text{nm}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$;

P – количество белка в пробе, мг.

Активность фермента выражали в нмоль НАДФН / мг белка за 1 мин.

2.3.11. Определение пируваткиназной активности

Активность фермента определялась спектрофотометрически на “Cary-50” в термостатируемых кюветах (25 °C) при 340 нм по убыли содержания НАДН [231]. Метод основан на том, что убыль содержания НАДН в лактатдегидрогеназной реакции пропорциональна образованию АТФ в пируваткиназной реакции. Реакционная смесь постоянно перемешивалась. Инкубационная среда содержала 0,06 М трис-НСl (рН 7,5), 0,12 М MgCl_2 , 2,25 М КСl, 6 mM АДФ, 0,043 М ФЭП, 0,006 М НАДН, 4 Е ЛДГ. Реакция инициировалась добавкой гомогената из расчета 1-3 мг белка в пробе.

Пируваткиназную активность рассчитывали согласно формуле:

$$A = \Delta \cdot V / 1,0 \cdot 0,00622 \cdot P;$$

Где:

Δ – среднее изменение интенсивности поглощения пробы за 1 мин инкубации;

V – объем опытной пробы взятой для измерения, мл;

1,0 – длина оптического пути, см;

0,00622 – микромолярный коэффициент экстинции, $\text{nm}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$;

P – количество белка в пробе, мг.

Активность фермента выражали в нмоль АТФ / мг белка за 1 мин.

2.3.12. Определение содержания белка

Содержание белка определяли биуретовым методом [112]. Расчет концентрации осуществляли при помощи калибровочной кривой, используя стандартный раствор бычьего сывороточного альбумина (“Sigma”, USA).

2.4. Методы статистического анализа

Полученные результаты обрабатывали статистически при помощи пакета программ “Statistica v.5.5” и “Origin 6.0”. Данные оценивали, используя непараметрический критерий Манна-Уитни, выражали в виде $M \pm m$. Достоверно отличными считали результаты при $p < 0,05$.

2.5. Используемые реактивы

В работе использовались следующие реактивы: *tris*, GSH, НАДФ⁺, НАДН, НАДФН, ФЭП, АДФ, (“Serva”, Германия), бычий сывороточный альбумин (фракция 5), ЛДГ (“Sigma”, США). Все остальные использованные в работе реактивы были отечественного производства, марки «хч» и «чда».

РАЗДЕЛ 3

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Влияние предварительного введения эмбриоспецифических факторов на прооксидантно-антиоксидантное состояние печени и течение острой интоксикации ТХМ у крыс

Длительное изучение патологий печени различного генеза позволило исследователям выделить ряд экспресс-методов, позволяющих оценить в системе *in vivo* степень повреждения органа. Для оценки динамики течения ТХМ-индуцированного гепатита были выбраны следующие показатели в сыворотке крови: активность маркерных ферментов – аминотрансфераз и содержание ТБК-активных продуктов.

Кроме того, учитывая важность состояния САОЗ при патологии печени, на конечном этапе эксперимента мы оценивали прооксидантно-антиоксидантный баланс непосредственно в поврежденном органе.

Возможность применения бесклеточных препаратов эмбрионального происхождения в качестве гепатопротекторов при повреждении печени остается неизученной, поэтому возникла необходимость провести ряд экспериментов по оценке влияния ЭСФ на течение ТХМ-индуцированного гепатита.

В качестве ЭСФ мы использовали бесклеточный цитозоль эмбриональных тканей (ЦЭТ) (содержащий водорастворимые компоненты). Для сравнительного изучения длительности действия ЭСФ было выбрано 2 срока предварительного введения – 24 и 4 ч.

3.1.1. Динамика аминотрансферазной активности при коррекции ТХМ-индуцированного гепатита цитозолем эмбриональных тканей

В норме в сыворотке наблюдались следовые количества трансаминаз, их активность составила для АСТ $142,4 \pm 42,7$ и для АЛТ $93,3 \pm 43,1$ Е/л сыворотки.

Острая интоксикация крыс ТХМ вызывала значительное повышение аминотрансферазной активности в сыворотке крови. Через сутки после введения ТХМ активность АСТ в контрольной группе повысилась в 15 раз (Рис. 3.1), а АЛТ – в 21 раз ($p < 0,001$) (рис. 3.2) по сравнению с интактной группой, такое изменение сохранялось в течение 2-х суток. Через 3-е суток после индукции гепатита наблюдалась тенденция к снижению активности АСТ и достоверное по отношению ко вторым суткам уменьшение активности АЛТ в 1,5 раза ($p < 0,05$) (рис. 3.1, 3.2).

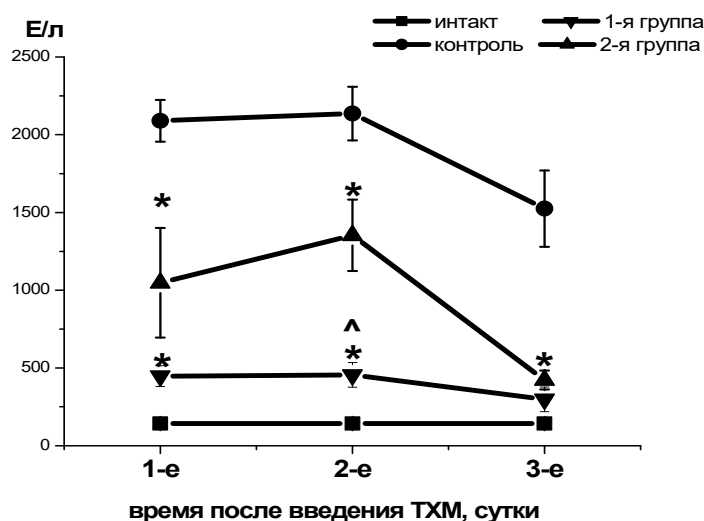


Рис. 3.1. Динамика активности АСТ при коррекции ТХМ-индуцированного гепатита ЦЭТ.

Примечания: * — достоверные отличия относительно контрольной группы;

^ — достоверные отличия между опытными группами; $p < 0,05$.

Полученные результаты свидетельствуют, что однократное введение ТХМ приводит к значительному повреждению клеток печени и, как следствие, к массовой элиминации маркерных ферментов. Эти данные полностью

согласуются с литературными, демонстрирующими многократное повышение аминотрансферазной активности в при остром отравлении и хроническом поражении печени ТХМ [2, 6, 34, 37, 40].

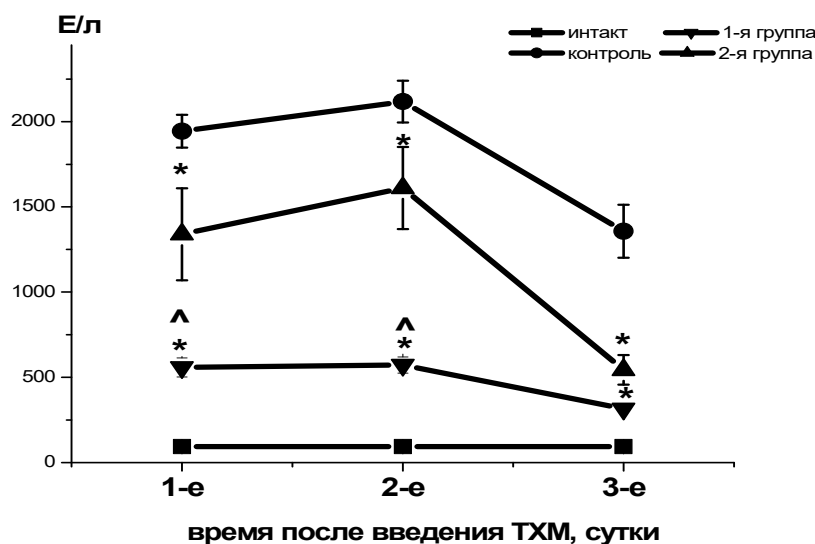


Рис. 3.2. Динамика активности АЛТ при коррекции ТХМ-индуцированного гепатита ЦЭТ.

Примечания: * — достоверные отличия относительно контрольной группы;

^ — достоверные отличия между опытными группами; $p < 0,05$.

Предварительное введение ЦЭТ оказывало положительное влияние на динамику активности сывороточных трансаминаз. Через сутки после интоксикации уровень активности АСТ и АЛТ в группе с 24-часовой обработкой ЦЭТ (2-я группа) снижался относительно контрольной группы в 2 и 1,5 раза соответственно ($p < 0,05$). В это же время, введение ЦЭТ за 4 ч (1-я группа) приводило к снижению активности АСТ и АЛТ в 4,7 и 3,5 раза соответственно ($p < 0,02$). Через 48 ч после введения CCl_4 наблюдались аналогичные изменения. На третьи сутки эффект предобработки ЭСФ сохранялся: во 2-й группе активность АСТ была ниже в 3,5 и АЛТ в 2,5 раза ($p < 0,05$); в 1-й группе – в 5 и 4,3 раза соответственно ($p < 0,02$) (рис. 3.1, 3.2). Полной нормализации аминотрансферазной активности не наблюдалось.

При сравнительном анализе влияния предобработки животных ЦЭТ были установлены достоверные различия между опытными группами. Так, для АСТ отличия между опытными группами наблюдались только на вторые сутки после

интоксикации, а активности АЛТ достоверно отличались как в первые, так и во вторые сутки эксперимента.

Обнаруженная зависимость эффективности от сроков предварительного введения может быть обусловлена несколькими факторами. В частности, максимальное влияние 4-часовой предобработки ЦЭТ может быть обусловлено быстро реализующимися эффектами ЭСФ на физико-химические или рецепторные свойства мембран, которые исчезают при увеличении срока между предобработкой и интоксикацией.

Наблюдаемые отличия в динамике АСТ и АЛТ, могут быть связаны с различиями в их внутриклеточной локализации. Как известно, АЛТ является сугубо цитозольным ферментом и легко покидает клетку при любых экзогенных повреждениях [50], в то время как 40% клеточной АСТ локализуется в митохондриях, и для ее выхода из клетки требуются более сильные повреждения плазматической мембраны. Описанные результаты могут быть обусловлены тем, что на ранних этапах интоксикации ТХМ вызывает, в основном, некротическую гибель клеток, т.е., в первую очередь, нарушения целостности клеток и межклеточных взаимодействий [46], а повреждения мембран органоидов вторичны. В дальнейшем, развитие внутриклеточного оксидативного стресса приводит к нарушению проницаемости митохондриальной мембраны и выходу ферментов. Таким образом, наблюдаемая зависимость от сроков введения эффективности предобработки на активности аминотрансфераз, вероятно, связана с различиями в молекулярных механизмах реализации эффектов ЭСФ и степени их участия в подготовке клеток печени и их органоидов к экстремальному воздействию.

Полученные результаты убедительно свидетельствуют о выраженном корректирующем действии ЭСФ на динамику сывороточных аминотрансфераз при СС1₄-индуцированном отравлении. При этом наблюдается зависимость от сроков предобработки. Наиболее эффективной в отношении активности трансаминаз оказалась предобработка ЦЭТ за 4 ч до интоксикации.

3.1.2. Влияние предобработки цитозолем эмбриональных тканей на содержание ТБК-активных продуктов в сыворотке крови ТХМ-интоксцированных животных

Развитие ТХМ-индуцированного гепатита сопровождается активацией свободнорадикальных процессов. Динамика накопления ТБК-активных продуктов в сыворотке крови после интоксикации является маркером развития оксидативного стресса в поврежденном органе и в организме в целом [15, 220].

У интактных животных уровень МДА составлял $5,51 \pm 1,1$ мкмоль/л сыворотки (рис. 3.3).

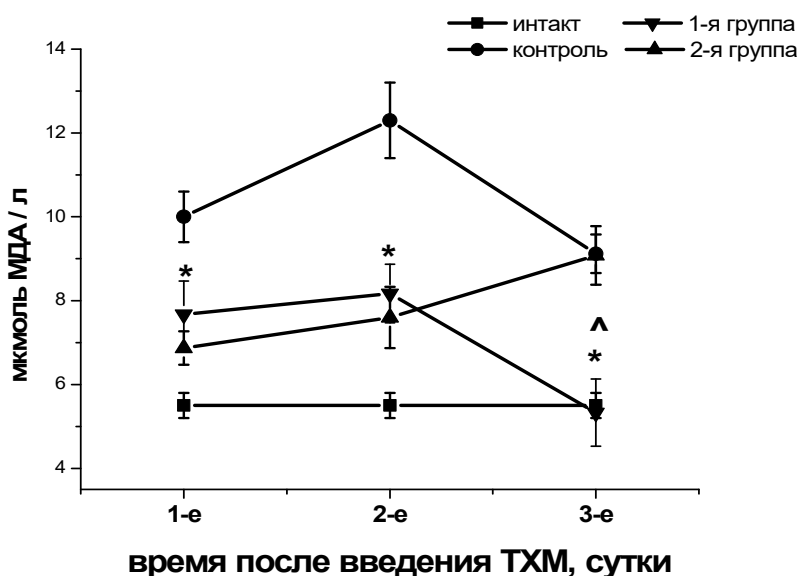


Рис. 3.3. Влияние предобработки ЦЭТ на уровень ТБК-активных продуктов в сыворотке ТХМ-интоксцированных крыс.

Примечания: * — достоверные отличия относительно контрольной группы;

^ — достоверные отличия между опытными группами; $p < 0,05$.

Острая интоксикация CCl_4 приводила к повышению содержания ТБК-активных продуктов в сыворотке животных. Через сутки после отравления уровень МДА превышал исходный в 1,8, через 48 ч — в 2,2 и через 3-е суток в 1,7 раза ($p < 0,05$) (рис. 3.3). При этом наблюдались достоверные отличия между 1 и 2-ми, а также 2-ми и 3-ми сутками эксперимента ($p < 0,05$).

Полученные результаты согласуются с литературными данными [15, 34, 37]. Показано повышение уровня как первичных, так и вторичных продуктов ПОЛ в сыворотке уже через 2 ч после интоксикации ТХМ [21], такие изменения сохранялись на протяжении нескольких суток после интоксикации.

Предварительное введение ЦЭТ как за 24, так и за 4 ч до интоксикации приводило к достоверному снижению содержания ТБК-активных продуктов в сыворотке. Как через сутки, так и через двое после введения CCl_4 , уровень ТБК-активных продуктов был ниже в 1,4 раза и в 1,6 раз соответственно по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$). Через 3-е суток после интоксикации во 2-й группе эффект предобработки нивелировался, уровень МДА не отличался от контроля, в 1-й группе наблюдалась полная нормализация содержания ТБК-активных продуктов в сыворотке крови (рис. 3.3).

Как известно, некротическая гибель клеток печени, наблюдаемая на ранних этапах после интоксикации ТХМ, сопровождается нарушением целостности плазматических мембран, что приводит к потере внутриклеточных аминотрансфераз и активации свободнорадикальных процессов, появлению продуктов ПОЛ в сыворотке [252].

Полученные результаты свидетельствуют о влиянии сроков предобработки ЭСФ на динамику накопления сывороточных ТБК-активных продуктов. Нивелирование эффекта введения ЭСФ за 24 ч до отравления на последнем этапе эксперимента, по-видимому, обусловлено краткосрочностью действия биологически активных компонентов. В пользу данного предположения служат результаты работы, ранее проведенной в нашей лаборатории. Было показано, что введение ЭСФ за трое суток до острой интоксикации ТХМ приводило к снижению содержания МДА в сыворотке только через 24 ч после отравления, в дальнейшем эффект предобработки отсутствовал [34].

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о выраженном превентивном действии ЭСФ на течение острого CCl_4 -индуцированного гепатита. При этом наблюдается зависимость эффективности воздействия от сроков предобработки животных. По совокупности изученных сывороточных показателей

степени повреждения печени наиболее эффективным оказалось введение ЦЭТ за 4 ч до интоксикации. Данный факт может быть обусловлен оптимальным составом препарата, а также возможностью реализовать ранние защитные эффекты, которые при увеличении сроков предобработки могут нейтрализоваться.

Выраженное снижение трансаминазной активности и содержания ТБК-активных продуктов в сыворотке крови интоксигированных животных, как показателей степени повреждения печени, наблюдаемое при предобработке ЭСФ, может являться свидетельством уменьшения количества погибших клеток или их быстрой замены на вновь образовавшиеся.

Учитывая важность прооксидантно-антиоксидантного равновесия в развитии патологии и последующей регенерации, была предпринята попытка оценить влияние ЭСФ на состояние САОЗ в печени при ТХМ-индуцированном гепатите.

3.1.3. Процессы перекисного окисления липидов при ТХМ-индуцированном гепатите

Прооксидантно-антиоксидантное состояние клеток является важным критерием при оценке степени повреждения органа. Анализ литературных данных показал, что существуют значительные различия в продолжительности экспериментального гепатита у крыс после однократного введения CCl_4 [2, 9, 25, 26, 40, 45]. В связи с этим, наши исследования проводились через 3 суток, а некоторые показатели изучались на 7-е сутки после острой интоксикации ТХМ.

Был изучен один из основных динамических показателей неферментативного звена прооксидантной системы - интенсивность индуцированного ПОЛ, которая демонстрирует реактивность и степень активации свободнорадикальных процессов в ответ на введение дополнительных прооксидантов. Изучение уровня первичных продуктов ПОЛ на выбранных этапах эксперимента не имело смысла, так как нормализация их уровня в печени, согласно литературным данным, наблюдается уже через сутки после отравления CCl_4 [14, 15].

В норме скорость накопления ТБК-активных продуктов составляла $27,2 \pm 0,9$ пмоль МДА/мг белка за 1 мин. Через 3-е суток после интоксикации ТХМ наблюдалось повышение в 1,3 раза интенсивности индуцированного ПОЛ в печени ($p < 0,05$). К 7-м суткам этот показатель приходил в норму (рис. 3.4).

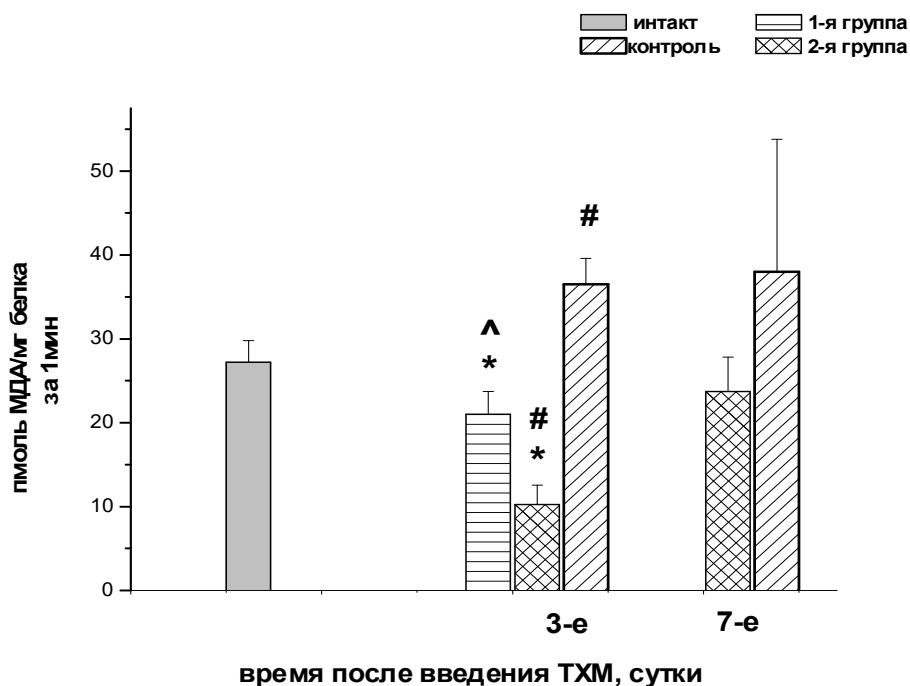


Рис. 3.4. Влияние предобработки ЦЭТ на интенсивность индуцированного ПОЛ в печени через 3 и 7 суток после интоксикации ТХМ.

Примечания: * — достоверные отличия относительно контрольной группы;

^ — достоверные отличия между опытными группами;

— достоверно относительно интактной группы; $p < 0,05$

Предварительное введение ЦЭТ приводило к различным изменениям скорости накопления МДА, которые проявляли зависимость от сроков предобработки. Так, в 1-й группе наблюдалось снижение данного показателя в 1,7 раза относительно контрольной группы и восстановление до исходных значений через 3-е суток после отравления ($p < 0,05$). Увеличение срока предобработки до 24 ч приводило к значительному снижению интенсивности ПОЛ — в 3,6 раза относительно контроля и в 2,6 раза относительно интактной группы ($p < 0,01$ и $0,02$ соответственно). Все изменения были достоверными. К 7-м суткам показатель возвращался к нормальным значениям (рис. 3.4).

Увеличение содержания продуктов ПОЛ при ТХМ-интоксикации – факт, описанный в многочисленных работах [14, 15, 17, 21, 45]. В некоторых работах показано, что к 7-м, и даже 10-м суткам после однократного введения CCl_4 свободнорадикальные процессы остаются выше интактных значений [45]. В настоящей работе среднее значение в контрольной группе на 7-е сутки после интоксикации превышает показатель нормы в 1,4 раза. Отсутствие достоверных отличий может быть обусловлено большим разбросом значений в контрольной группе, в частности зависящим от индивидуальной чувствительности животных к действию повреждающих факторов.

Полученные результаты демонстрируют однонаправленность действия ЦЭТ с показанным ранее эффектом трансплантации клеток эмбриональной печени [34].

Обнаруженное парадоксальное снижение скорости накопления ТБК-активных продуктов в группе с 24-часовой предобработкой, вероятно, можно объяснить выходом клеток печени из состояния покоя. Известно, что свободные радикалы принимают участие в регуляции процессов пролиферации и репарации [18]. Показано, что после частичной гепатэктомии, общепринятой модели стимуляции регенерационных процессов в печени, в момент максимального биосинтеза ДНК наблюдается наиболее выраженное снижение интенсивности процессов ПОЛ [104]. Вполне вероятно, что полученные результаты являются свидетельством следующего этапа реализации действия ЭСФ на генетический аппарат клеток печени.

Наблюдаемое превентивное действие ЭСФ на интенсивность ПОЛ в печени частично может быть обусловлено как прямым антиоксидантным или скавенджерным эффектом, так и путем воздействия на различные метаболические процессы, которое может реализоваться различными способами, в частности, через положительную регуляцию активностей ферментов системы антиоксидантной защиты.

Для оценки наших предположений в отношении регуляторного действия ЦЭТ на прооксидантно-антиоксидантный статус клеток печени целесообразно было исследовать его другое звено – САОЗ.

3.1.4. Влияние цитозоля эмбриональных тканей на состояние системы антиоксидантной защиты печени крыс после острой интоксикации ТХМ

Защита клеток печени от свободнорадикального повреждения при интоксикации ТХМ происходит путем поэтапного включения различных компонентов САОЗ. Первым защитным барьером является неферментативная антиоксидантная активность, поэтому при CCl_4 -интоксикации уже в первые часы наблюдается быстрое снижение содержания низкомолекулярных антиоксидантов (токоферола, ретинола и т.д.) [14, 15, 17, 21]. Следующее звено – ферментативное, главными его участниками являются супероксиддисмутаза, каталаза и глутатионпероксидаза, которое подвергается как прямому действию метаболитов CCl_4 , так и опосредованному – цитокинов.

В настоящей работе для оценки антиоксидантного статуса клеток печени были изучены:

- содержание восстановленного глутатиона (GSH), важнейшего антиоксиданта, как пограничного фактора, участвующего как в неферментативной, так и ферментативной инаktivации свободнорадикальных продуктов;
- активность глутатионпероксидазы (ГП) и глутатионредуктазы (ГР), компонентов глутатион-зависимой системы, отвечающих за утилизацию и восстановление GSH;
- активность каталазы (КАТ), отличающейся высокой чувствительностью к повреждающему действию ТХМ и провоспалительных цитокинов;
- активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ), в качестве фермента, ответственного за оксидорезистентность клеток печени и поставляющего восстановительные эквиваленты для поддержки КАТ и ГР.

Как показано на рис. 3.5, через 3-е суток и через неделю после отравления ТХМ, содержание GSH практически не отличалось от интактных значений и составляло $4,78 \pm 1,7$ мкмоль/г сырого веса.

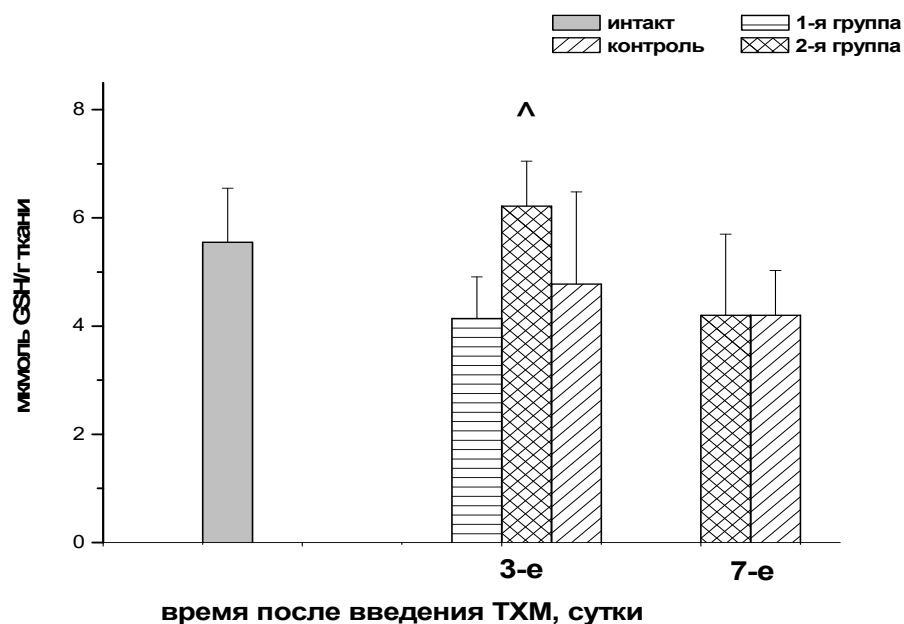


Рис. 3.5. Действие ЦЭТ на содержание GSH в ткани печени через 3 и 7 суток после ТХМ-интоксикации.

Примечание: ^ – достоверные отличия между опытными группами; $p < 0,05$

Предобработка ЦЭТ за 4 ч до интоксикации не влияла на уровень GSH через 3-е суток после интоксикации. Во 2-й группе на 3 сутки наблюдалось достоверное повышение, в 1,5 раза, содержания GSH относительно 1-й ($p < 0,05$), к 7-м суткам показатель принимал интактные значения (рис. 3.5).

Восстановленный глутатион участвует в нейтрализации активных метаболитов CCl_4 и препятствует их ковалентному связыванию с функциональными группами белков [58, 151]. Именно поэтому при интоксикации ТХМ наблюдается резкое снижение содержания GSH уже в первые часы после отравления. Различные авторы расходятся в своих данных об изменении его уровня в более поздние сроки. Есть сведения [21], что содержание GSH через сутки после интоксикации восстанавливается и даже превышает исходные значения. Другие авторы [45] утверждают, что уровень GSH не восстанавливается даже через неделю после интоксикации. Отмеченные разногласия могут объясняться развитием адапционного ответа на ранних этапах после интоксикации, который при пролонгировании патологического процесса угнетается.

Существует корреляция между выраженным ингибированием процессов ПОЛ и повышением уровня GSH в группе с 24-часовой предобработкой, что является еще одним подтверждением нашего предположения о вступлении клеток в пролиферативную фазу. Многие авторы подчеркивают важную роль высокого уровня GSH в регуляции роста и деления клеток [18, 76, 104]. Показано, что снижение содержания GSH приводит к угнетению митотической активности культур клеток различного происхождения [76, 206]. В особенности это касается ядерного пула GSH, который обеспечивает защиту генетического материала. При вступлении клеток в пролиферативную фазу деконденсированный хроматин становится легкодоступным для действия активных форм кислорода, снижение уровня антиоксидантов при интоксикации может приводить к необратимым повреждениям ядерного аппарата клеток печени [17].

Необходимо отметить, что пополнение пула глутатиона в клетках печени может происходить двумя путями: биосинтеза *de novo* или восстановления GSSG в глутатионредуктазной реакции. Последняя реакция, как энергетически более выгодная, несомненно, является предпочтительней. Однако, известно, что при утилизации GSH может образовываться два основных типа метаболитов, обратимых (GSSG) и необратимых, не являющихся субстратами для ГР и элиминирующихся из клетки в виде различных конъюгатов [151]. В этом случае пополнение пула восстановленного глутатиона возможно только за счет биосинтеза *de novo* при участии γ -глутамилцистеинилсинтетазы [58]. Для оценки возможного распределения между способами поддержания уровня GSH и влияния на него ЦЭТ мы исследовали активность ГР.

У интактных животных активность ГР составляла $18,9 \pm 6,0$ нмоль НАДФН/мг белка за 1 мин. Острая интоксикация ТХМ приводила к снижению ГР активности в 2,4 раза через 3-е суток после интоксикации ($p < 0,02$). К 7-м суткам активность восстанавливалась (рис. 3.6).

Введение ЦЭТ за 4 ч до острой интоксикации ТХМ приводило к достоверному повышению активности ГР относительно контрольной группы в 1,7 раза, значения достигали исходных ($p < 0,05$). Во 2-й группе наблюдалось менее выраженное, в 1,4

раза, но достоверное относительно контроля повышение активности ГР ($p<0,05$), однако, уровня нормы эти значения не достигали. Наблюдалась выраженная тенденция к снижению активности ГР в группе с 24-часовой предобработкой ($p=0,057$) по сравнению с 4-часовой. К 7-м суткам активность ГР нормализовалась (рис. 3.6).

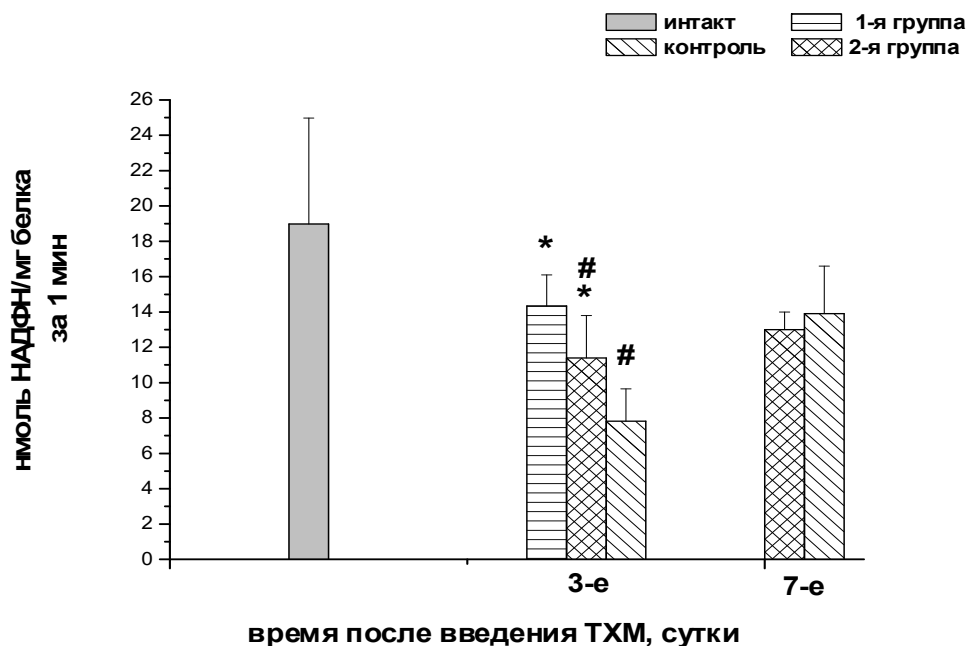


Рис. 3.6. Влияние ЦЭТ на активность ГР через 3 и 7 суток после интоксикации ТХМ.

Примечания: * — достоверные отличия относительно контрольной группы;

— достоверно относительно интактной группы; $p<0,05$.

Неполное восстановление ГР активности на фоне повышения содержания GSH в группе с 24-часовой предобработкой может свидетельствовать в пользу активации γ -глутамилцистеинилсинтетазы для пополнения пула глутатиона. Такое переключение может быть обусловлено тем, что ключевой фермент биосинтеза глутатиона является более подверженным регуляторному действию различных факторов, появляющихся на этапе активных репаративных процессов [58, 160]. Например, ИЛ-1 индуцирует быстрое окисление GSH [138], а ФНО α , вызывает массивный выход из гепатоцитов GSH и GSSG, что является причиной нарушения редокс-цикла GSH и угнетения активности ГР, обусловленного недостатком субстрата [52]. При этом, ФНО α , в небольших количествах,

индуцирует в гепатоцитах экспрессию гена γ -глутамилцистеинилсинтетазы – ключевого фермента биосинтеза GSH путем активации фактора транскрипции AP-1 [166].

Нейтрализация цепных реакций свободнорадикальных процессов во многом зависит от двух типов ферментов, способных утилизировать H_2O_2 – ГП и КАТ. Распределение их активности определяется степенью развития оксидативного стресса, а, например, защита митохондрий от собственных активных форм кислорода осуществляется только при помощи ГП [94].

В норме активность ГП находилась на уровне $0,301 \pm 0,08$ мкмоль GSSG/мг белка за 1 мин (рис. 3.7). Через трое суток после интоксикации ТХМ наблюдалось достоверное снижение активности ГП в 2 раза ($p < 0,05$). Полученные данные согласуются с литературными, в которых демонстрируется угнетение активности ГП под действием ТХМ [15, 21, 45], что может быть обусловлено как прямым действием активных метаболитов CCl_4 , так и недостатком субстрата – GSH.

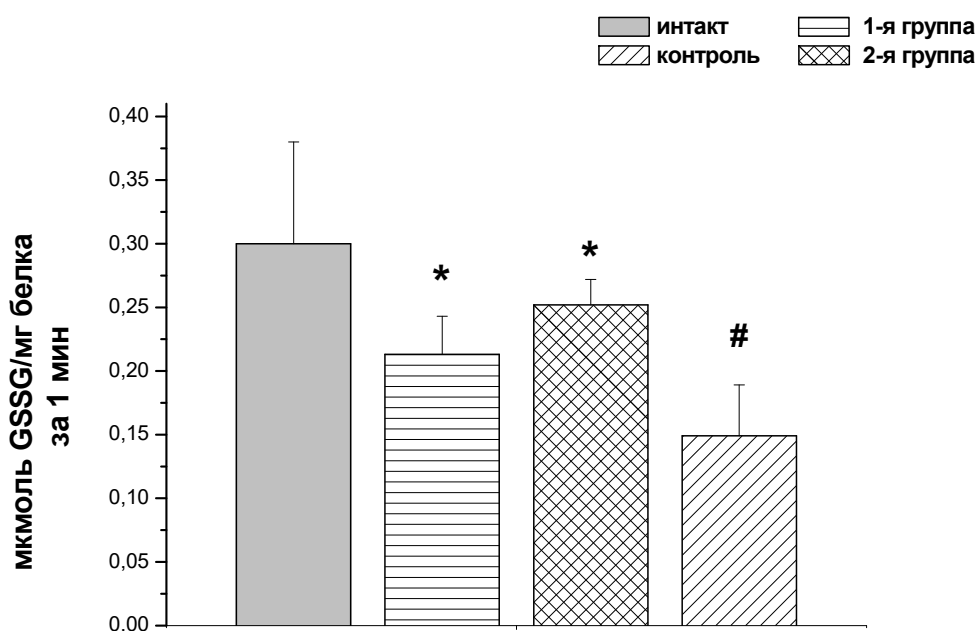


Рис. 3.7. Влияние ЦЭТ на ГП активность через 3-е суток после ТХМ-интоксикации.

Примечания: * – достоверные отличия относительно контрольной группы;

– достоверно относительно интактной группы; $p < 0,05$.

Предобработка животных ЦЭТ, независимо от сроков, приводила к достоверному повышению активности ГП относительно контроля до исходных значений ($p < 0,05$). Эти результаты коррелируют с восстановлением содержания GSH и ГР активности и свидетельствуют о нормализации GSH-редокс-цикла.

У интактных животных КАТ активность составляла $121,0 \pm 14,7$ мкмоль H_2O_2 /мг белка за 1 мин. Через трое суток после ТХМ-интоксикации наблюдалось значительное, в 2 раза, угнетение активности КАТ относительно интактного уровня ($p < 0,02$). К 7-м суткам показатель полностью восстанавливался (рис. 3.8).

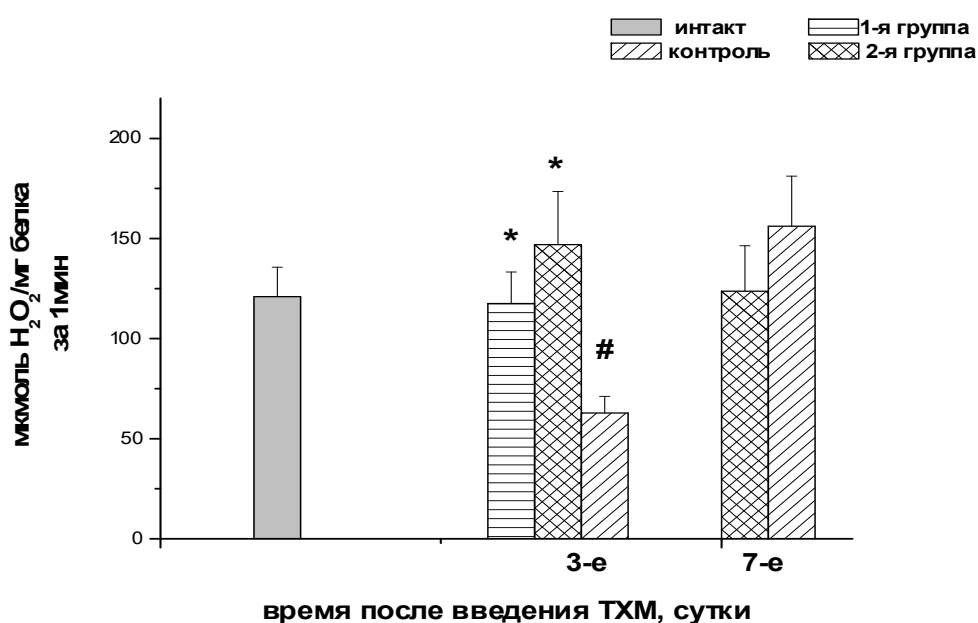


Рис. 3.8. Влияние ЦЭТ на активность КАТ через 3 и 7 суток после ТХМ-интоксикации.

Примечания: * — достоверные отличия относительно контрольной группы;

— достоверно относительно интактной группы; $p < 0,05$

Предобработка ЭСФ приводила к достоверному повышению активности КАТ через 3-е суток после интоксикации. При этом наблюдалась картина, аналогичная изменениям ГП: введение ЦЭТ независимо от сроков приводило к полной нормализации КАТ активности ($p < 0,02$). Кроме того, наблюдалась тенденция к повышению активности КАТ в группе с 24-часовой предобработкой относительно интактного уровня, что частично коррелирует с выраженным ингибированием индуцированного ПОЛ при таком воздействии. К 7-м суткам показатель находился на уровне интактной группы (рис. 3.8).

Таким образом, мы наблюдаем высокую чувствительность как ГП, так и КАТ к действию повреждающих факторов при острой интоксикации ТХМ. Нарушение работы этих ферментов может быть обусловлено прямым ингибированием большими концентрациями субстрата – H_2O_2 , а также недостатком стабилизаторов нативной конформации ГП – GSH и КАТ – НАДФН. Дополнительным фактором для повреждения КАТ является ее структурный компонент – гем, содержащий функционально активные ионы железа, легко вступающие в реакции ПОЛ.

Вполне вероятно, что реализация эффектов предобработки в отношении КАТ и ГП осуществляется различными путями, что обусловлено их структурно-функциональными особенностями. Известна высокая чувствительность КАТ к действию провоспалительных цитокинов, таких как ИЛ-1, ФНО α [99, 138, 185, 210, 249]. Кроме того, основной модулятор фибротических изменений при действии CCl_4 – ТФР β проявляет выраженное ингибирующее действие на активность ферментов САОЗ [138].

Согласно современным представлениям, важная роль в устойчивости клеток к оксидативному стрессу отводится окислительно-восстановительным эквивалентам. Поддержание баланса между окисленными и восстановленными их формами считается более важным, чем собственно энергетический статус клеток (содержание макроэргов) [140]. Ключевую роль в повышении оксидорезистентности клеток при стрессе, в настоящее время, отводят Г6ФДГ, при этом подчеркивается ее эссенциальность даже при средней силы свободнорадикальном подтверждении [182]. Для нас особый интерес данная реакция представляет в связи с тем, что генерируемый в ней НАДФН необходим как для нормальной работы ГР [58, 160], так и для поддержания нативной структуры КАТ при действии ТХМ [143].

В норме активность Г6ФДГ была на уровне $19,8 \pm 3,7$ нмоль НАДФН/мг белка за 1 мин. Через 3-е суток после введения CCl_4 наблюдалось достоверное снижение (в 2 раза) активности Г6ФДГ относительно интактной группы (рис. 3.9) ($p < 0,02$). Данное снижение полностью коррелирует с изменениями активности ГР и КАТ.

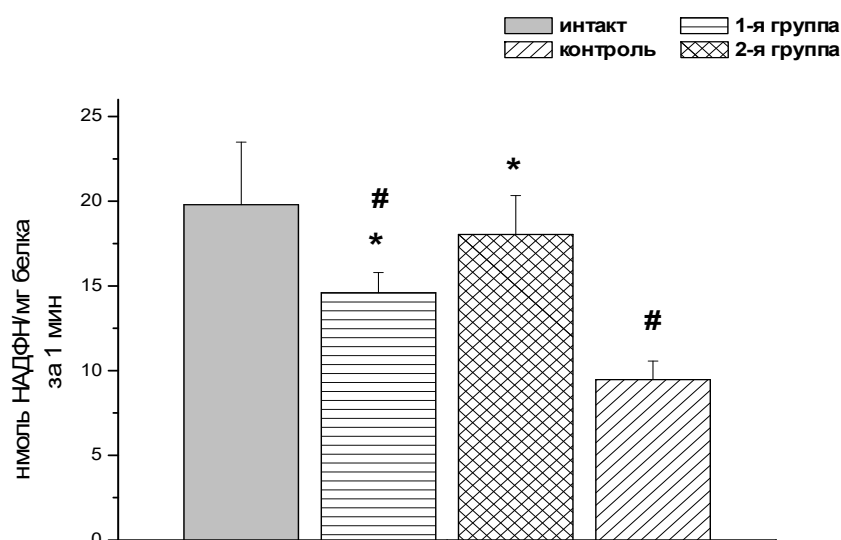


Рис. 3.9. Влияние ЦЭТ на активность Г6ФДГ через трое суток после ТХМ-интоксикации.

Примечания: * — достоверные отличия относительно контрольной группы;

— достоверно относительно интактной группы; $p < 0,05$

Как видно из рис. 3.9, в 1-й группе наблюдалось достоверное повышение активности Г6ФДГ относительно контрольной группы, исходных значений показатель не достигал (рис. 3.9). Неполное повышение активности Г6ФДГ на фоне исходных активностей КАТ и ГР в группе с 4-часовой предобработкой может быть обусловлено тем, что в клетках печени нехватку НАДФН частично могут компенсировать другие НАДФН-генерирующие системы [182].

Во 2-й группе происходила полная нормализация Г6ФДГ активности уже через 3-е суток после интоксикации ($p < 0,05$) (рис. 3.9), что коррелирует с показателями КАТ, ГР, GSH. Достоверных различий между опытными группами не наблюдалось. Неполное восстановление ГР активности в группе с 24-часовой предобработкой на фоне нормализации Г6ФДГ и повышенного уровня GSH может служить в поддержку нашего предположения об изменении состояния клеток печени, при котором пул НАДФН перераспределяется в связи с измененными потребностями клетки в окислительно-восстановительных эквивалентах.

Угнетение активности Г6ФДГ при действии ТХМ обусловлено развитием оксидативного стресса [230]. На ранних этапах CCl_4 -интоксикации наблюдается повышение активности фермента, что является ранним адаптационным ответом

клеток печени на повреждение [195, 215, 236]. В дальнейшем накопление продуктов ПОЛ приводит к их прямому связыванию с Г6ФДГ и ее инактивации. Показано, что МДА, неэнзиматически взаимодействуя с молекулой фермента, вызывает ее денатурацию [105]. Снижение содержания НАДФН сенситизирует клетки печени к свободнорадикальному повреждению [187, 230]. При этом фермент не подвергается действию основных провоспалительных цитокинов при развитии повреждения печени [159]. Таким образом, превентивное действие ЭСФ в отношении активности Г6ФДГ может быть, в частности, обусловлено общим ингибирующим действием на свободнорадикальные процессы.

Полученные результаты свидетельствуют, что предварительное введение ЦЭТ позволяет нормализовать состояние антиоксидантной системы печени уже через 3-е суток после СС1₄-интоксикации. При этом наблюдается зависимость эффективности воздействия от сроков введения. Введение ЦЭТ за 4 ч до интоксикации значительно снижает степень повреждения печени и полностью нормализует прооксидантно-антиоксидантный статус клеток печени. Увеличение сроков предобработки животных ЦЭТ до 24 ч демонстрирует менее выраженное действие на степень повреждения органа, вызывая при этом значительное ингибирование процессов индуцированного ПОЛ на фоне повышенного содержания восстановленного глутатиона, а также тенденции к повышению КАТ, Г6ФДГ и снижению ГР активности через трое суток после ТХМ-интоксикации.

Сложность в объяснении реализации наблюдаемых эффектов на степень повреждения печени и прооксидантно-антиоксидантное равновесие обусловлена большим количеством биологически активных соединений, содержащихся в ЦЭТ. При этом нельзя исключать возможности их взаимной нейтрализации или антагонизма. Метод получения ЦЭТ предполагает наличие в нем низкомолекулярных соединений, пептидных, белковых и других фракций, имеющих гидрофильную природу. Наиболее вероятными кандидатами являются регуляторные белки (цитокины, ростовые факторы) и пептиды (цитомедины, тетины и т.д.). Нами

была предпринята попытка выделить «активное начало» в нашем препарате. Для исключения возможного действия широкого спектра белков, в большинстве своем являющихся термолабильными, был выбран метод их тепловой денатурации. Согласно литературным данным, оптимальным считается метод [12], при помощи которого, обычно, производят частичную очистку ТФРГ. Этот пептид обладает выраженным гепатотропным действием, участвует в процессах регенерации печени [1, 12, 156] и обнаруживается в эмбриональных тканях [124].

Полученную термостабильную фракцию (ТСФ) в объеме, эквивалентном дозе ЦЭТ, вводили за 4 ч до острой интоксикации ТХМ (3-я группа) для определения зависимости от состава эффективности предобработки. Выбор срока был обусловлен результатами, полученными ранее, так как при такой постановке эксперимента наблюдалось минимальное повреждение печени и полная нормализация прооксидантно-антиоксидантного равновесия. Были введены 2 дополнительных показателя: динамика содержания альбумина в сыворотке крови, для оценки секреторной и синтетической функции печени, а также базальный уровень ТБК-активных продуктов в печени, как статический показатель процессов ПОЛ, отражающий количество накопленных к моменту исследования свободнорадикальных продуктов. Содержание восстановленного глутатиона не оценивалось, так как этот показатель на момент исследования нормализовался в даже в контрольной группе животных.

3.1.5. Влияние термостабильной фракции цитозоля эмбриональных тканей на течение ТХМ-индуцированного гепатита

Как видно из таблицы 3.1, предобработка ТСФ через сутки после интоксикации приводила к снижению аминотрансферазной активности в 2 раза относительно контрольной группы. Через 2-е суток активность АСТ была ниже в 2,7, а АЛТ – в 2 раза. По окончании эксперимента эффект предобработки

сохранялся, трансаминазная активность уменьшалась в 2,4 раза по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$).

Таблица 3.1

Действие ЭСФ на аминотрансферазную активность сыворотки крови ТХМ-интоксцированных животных ($M \pm m$; $n = 7-10$)

Время после воздействия, сутки	контроль	1-я группа	3-я группа
АСТ активность, Е/л			
1-е	$2090,15 \pm 134,5$	$447,7 \pm 66,5 *$	$1031,03 \pm 229,1 * ^\wedge$
2-е	$2136,9 \pm 172,3$	$455,02 \pm 79,3 *$	$778,15 \pm 123,5 * ^\wedge$
3-е	$1525,1 \pm 245,9$	$298,4 \pm 79,4 *$	$634,4 \pm 142,6 * ^\wedge$
АЛТ активность, Е/л			
1-е	$1943,9 \pm 371,3$	$558,04 \pm 124,3 *$	$925,32 \pm 269,9 * ^\wedge$
2-е	$2117,6 \pm 425,1$	$572,2 \pm 106 *$	$1045,48 \pm 261,0 * ^\wedge$
3-е	$1356,8 \pm 155,1$	$314,8 \pm 38,8 *$	$556,08 \pm 242,8 *$

Примечания: * — достоверные отличия относительно контрольной группы;

$^\wedge$ — достоверно между опытными группами; $p < 0,05$

При сравнительном анализе между группами с различной предобработкой были установлены достоверные различия активности АСТ на всех этапах исследования, АЛТ отличалась через 1 и 2-е суток после интоксикации ($p < 0,05$). Предобработка ЦЭТ была более эффективной, чем ТСФ, что, вероятно, свидетельствует о наличии термолабильных факторов, препятствующих нарушению целостности мембран и элиминации ферментов из гепатоцитов при интоксикации ТХМ.

Развитие патологии печени приводит к нарушению ее многочисленных функций, в том числе белоксинтезирующей и секреторной. Альбумин, важнейший сывороточный протеин, образуется в гепатоцитах, при повреждении которых происходит нарушение его синтеза и секреции [19].

У интактных животных содержание альбумина в сыворотке составляет 40-50 г/л (рис. 3.10). Острая интоксикация ТХМ приводила к выраженному снижению его уровня. Так, через 24 ч после введения CCl_4 содержание альбумина составляло 28% ($p<0,01$), а через 48 ч – 55% ($p<0,02$) относительно интактного уровня, к третьим суткам показатель нормализовался.

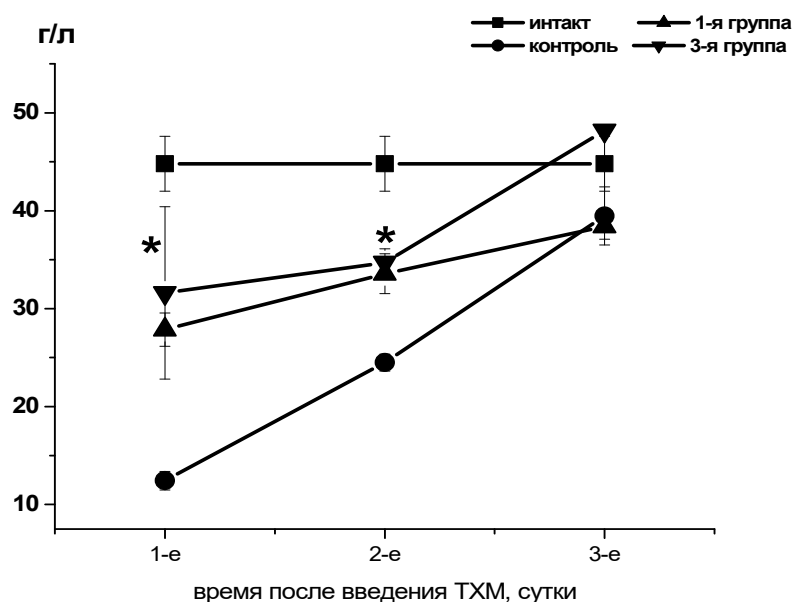


Рис. 3.10. Содержание альбумина в сыворотке при коррекции ТХМ-индуцированного гепатита ЭСФ.

Примечание: * – достоверные отличия относительно контрольной группы; $p<0,05$

Предобработка животных за 4 ч до интоксикации как ЦЭТ, так и ТСФ приводила к достоверному повышению содержания альбумина в сыворотке крови как в первые (62%), так и во вторые сутки (75%) после введения CCl_4 ($p<0,05$). Через 72 ч показатель полностью нормализовался независимо от вида предобработки (рис. 3.10).

Многими авторами показано изменение глобулинового профиля сыворотки при ТХМ-индуцированном гепатите [19, 40, 71]. При этом наблюдается снижение содержания альбумина и преальбумина, хотя общее содержание белка может не изменяться [19]. Уменьшение количества альбумина является причиной изменения онкотического давления плазмы, что усугубляет повреждающее действие ТХМ, в частности, на клетки печеночного синусоида. Это является дополнительным

фактором развития некроза в печени и появления новых источников активных форм кислорода. Такие нарушения могут быть связаны, в первую очередь, с нарушением секреторной функции печени. Показан сильный ингибирующий эффект CCl_4 на экзоцитоз альбумина из гепатоцитов [71]. Угнетение биосинтеза белка при ТХМ-интоксикации и увеличение скорости деградации мРНК альбумина также может служить причиной снижения содержания альбумина при отравлении CCl_4 [25].

Особенности нативной структуры молекулы альбумина (большое число функционально активных SH-групп) являются причиной того, что он служит мишенью для активных метаболитов CCl_4 . Многократное повышение содержания NO при ТХМ-индуцированном гепатите приводит к образованию нитрозоальбумина [19, 48]. Нарушение нативной конформации молекул альбумина является причиной снижения его функциональной активности и быстрой деградации. Наблюдаемый положительный эффект предобработки ЭСФ на уровень сывороточного альбумина может быть обусловлен уменьшением количества токсических продуктов, необратимо связывающихся с альбумином и нарушающих его конформацию [19].

Отсутствие отличий между действием ЦЭТ и ТСФ на содержание альбумина в сыворотке интоксигированных животных, может быть обусловлено наличием термостабильных модулирующих факторов либо тем, что реализация эффектов ЦЭТ и ТСФ происходит разными путями. Кроме того, существует вероятность того, что выделение термостабильных субстанций позволяет наблюдать эффекты, которые не реализуются при комплексном воздействии ЦЭТ.

Несмотря на то, что содержание сывороточного альбумина восстанавливается к концу эксперимента даже без действия экзогенных факторов, повышение его уровня на первых этапах эксперимента под действием ЭСФ может свидетельствовать о меньшей степени повреждения гепатоцитов, по крайней мере, об улучшении их секреторной функции. Наличие в эмбриональных тканях факторов, регулирующих синтез и секрецию альбумина на различных этапах, описано в литературе. Например, ФРГ вызывает повышение уровня сывороточного альбумина путем посттрансляционной регуляции, не влияя на количество мРНК

[248]. Гормон роста и ИЛ-6 положительно влияют на процессы биосинтеза альбумина в гепатоцитах, усиливая экспрессию мРНК [67, 171].

Повышение уровня альбумина на ранних этапах интоксикации, после предобработки ЭСФ, может положительно сказываться на состоянии САОЗ печени, так как известно, что альбумин принимает активное участие в регуляции содержания восстановленного глутатиона, защищающего клетки печени от повреждающего действия ТХМ [76].

Таким образом, предобработка животных ЦЭТ и ТСФ является эффективным способом предупреждения катастрофического снижения содержания альбумина на начальных этапах повреждения печени после ТХМ-интоксикации.

Как показано на рис. 3.11, предобработка ТСФ через сутки после интоксикации приводила к снижению уровня ТБК-активных продуктов в сыворотке в 1,2 раза относительно контрольной группы. Через 2-е суток показатель был ниже в 1,4 раза. На момент окончания эксперимента содержание ТБК-активных продуктов было достоверно выше исходного уровня ($p < 0,05$).

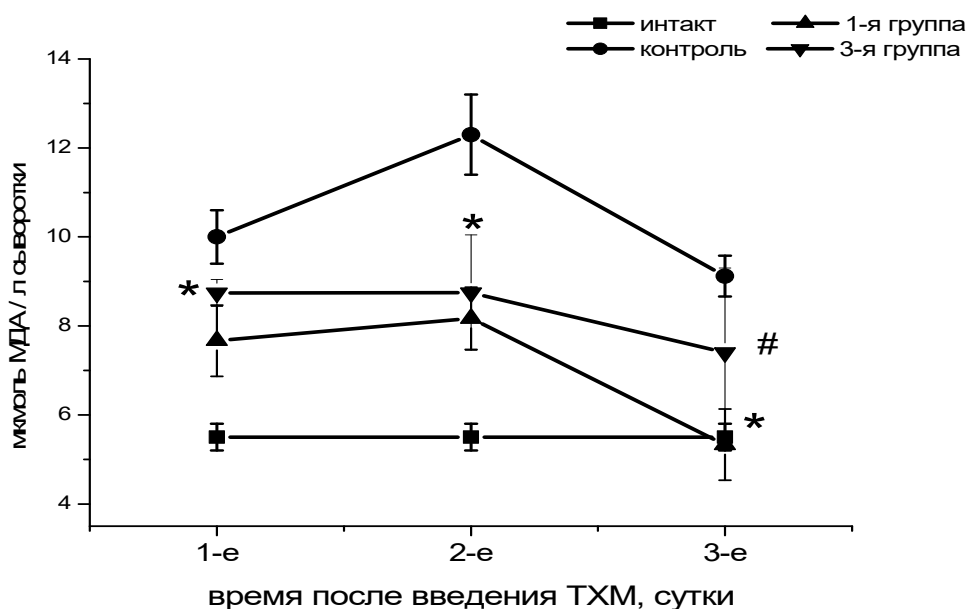


Рис. 3.11. Влияние ЭСФ на содержание сывороточных ТБК-активных продуктов после интоксикации ТХМ.

Примечания: * — достоверные отличия относительно контрольной группы;

— достоверно относительно интактной группы; $p < 0,05$

В течение 1 и 2-х суток статистически достоверной разницы между значениями в опытных группах не наблюдалось, к 3-м суткам ЦЭТ, в отличие от ТСФ, полностью нормализовал показатель.

Снижение эффективности предобработки ТСФ по сравнению с ЦЭТ может быть обусловлено менее выраженной способностью к подавлению свободнорадикальных процессов. Другим вариантом может являться недостаточное количество вводимых факторов, содержащихся в ТСФ, для максимального действия, т.е. эффект является дозозависимым. Учитывая степень элиминации аминотрансфераз, можно предположить снижение степени воздействия компонентов ТСФ, по сравнению с ЦЭТ, на развитие экстрацеллюлярного оксидативного стресса в печени, который приводит к повреждениям плазматических мембран. ЦЭТ может содержать термолабильные факторы, позволяющие регулировать активацию как собственных иммунокомпетентных клеток печени, так и инфильтрующихся нейтрофилов, которые являются основными источниками свободных радикалов при повреждении печени СС1₄.

Предобработка ТСФ оказывала положительное влияние на течение ТХМ-индуцированного гепатита, что выражалось в снижении активности сывороточных аминотрансфераз, уровня ТБК-активных продуктов и повышении содержания альбумина. По сравнению с ЦЭТ, действие ТСФ было менее выражено, исключая увеличение уровня альбумина, которое было аналогичным в обеих группах.

Нивелирование действия предобработки ТСФ на уровень ТБК-активных продуктов на последнем этапе эксперимента не исключало нормализации состояния САОЗ в печени (как наблюдалось при 24-часовой обработке ЦЭТ). В связи с этим было исследовано прооксидантно-антиоксидантное равновесие в печени через трое суток после интоксикации ТХМ. Продление сроков изучения было нецелесообразным, так как через 7 суток после отравления все исследуемые показатели в контрольной группе находились на исходном уровне.

3.1.6. Прооксидантно-антиоксидантное состояние печени крыс под действием термостабильной фракции цитозоля эмбриональных тканей

Изучение базального уровня ТБК-активных продуктов проводилось в связи с тем, что данный показатель позволяет оценить общее содержание вторичных продуктов ПОЛ, вклад в которое вносят не только цепные неэнзиматические реакции, но и ферментативные системы, генерирующие активные формы кислорода (НАДФН-оксидазная, ксантинооксидазная и т.д.).

Таблица 3.2

Влияние ЭСФ на интенсивность перекисных процессов в печени через 3-е суток после интоксикации ТХМ ($M \pm m$, $n = 5-7$)

Показатели	интакт	контроль	1-я группа	3-я группа
Базальный уровень ТБК-активных продуктов пмоль МДА/мг белка	$315,4 \pm 48,4$	$470,1 \pm 56,6$ #	$337,3 \pm 39,5$ *	$287,8 \pm 64,9$ *
Интенсивность индуцированного ПОЛ пмоль МДА/мг белка за 1 мин	$27,2 \pm 2,6$	$36,9 \pm 3,1$ #	$21,01 \pm 2,7$ *	$24,6 \pm 3,7$ *

Примечания: * — достоверные отличия по сравнению с контрольной группой;

— достоверно относительно интактной группы; $p < 0,05$

У интактных животных базальный уровень МДА в печени составлял $315,4 \pm 48,4$ пмоль/мг белка. Острая интоксикация ТХМ приводила к значительному, в 1,5 раза, повышению уровня ТБК-активных продуктов в гомогенате печени через трое суток после отравления ($p < 0,05$) (табл. 3.2).

Введение ЦЭТ или ТСФ приводило к полной нормализации базального уровня ТБК-активных продуктов. В условиях предобработки ТСФ интенсивность индуцированного ПОЛ через 3-е суток после отравления снижалась в 1,5 раза относительно контрольной группы, что приводило к полной нормализации показателя и возвращало его на исходный уровень ($p < 0,05$) (табл. 3.2). Полученные

результаты демонстрируют отсутствие различий между действием ЭСФ как на статический, так и динамический показатель перекисных процессов в поврежденном органе, что позволяет предполагать, что регуляторное действие ТСФ и ЦЭТ может осуществляться как путем угнетения работы прооксидантной системы, так и воздействуя на различные звенья САОЗ.

Таблица 3.3

Влияние предобработки ЭСФ на состояние САОЗ через 3-е суток после острой интоксикации ТХМ ($M \pm m$, $n = 5-7$)

Активность ферментов	интакт	контроль	1-я группа	3-я группа
КАТ активность мкмоль H_2O_2 /мг белка за 1 мин	$121,04 \pm 14,7$	$62,78 \pm 8,4$ #	$117,5 \pm 15,7$ *	$98,7 \pm 6,9$ * #
ГП активность мкмоль GSSG/мг белка за 1 мин	$0,3 \pm 0,08$	$0,149 \pm 0,04$ #	$0,213 \pm 0,03$ *	$0,194 \pm 0,01$ * #
ГР активность нмоль НАДФН/мг белка за 1 мин	$18,98 \pm 6,0$	$7,82 \pm 1,8$ #	$14,35 \pm 1,75$ *	$13,43 \pm 2,3$ *
Г6ФДГ активность нмоль НАДФН/мг белка за 1 мин	$19,8 \pm 3,7$	$9,47 \pm 3,5$ #	$14,6 \pm 1,2$ * #	$15,63 \pm 2,4$ *

Примечания: * — достоверные отличия по сравнению с контрольной группой;

— достоверно относительно интактной группы; $p < 0,05$

Как видно из табл. 3.3, предобработка ТСФ приводит к достоверному повышению активности КАТ в 1,6 раза относительно контрольного уровня ($p < 0,05$), однако, исходных значений данный показатель не достигал, в отличие от группы, обработанной ЦЭТ.

Аналогичные изменения наблюдались при сравнительном анализе ГП активности, ТСФ повышал активность фермента в 1,3 раза, но значения достоверно отличались от интактных ($p < 0,05$). ГР активность нормализовалась независимо от вида предобработки. Интересные результаты были получены в отношении Г6ФДГ

активности: ТСФ полностью нормализовал этот показатель, в то время как ЦЭТ достоверно его повышал, но значения при этом не достигали исходного уровня (табл. 3.3). Во всех случаях достоверных различий между опытными группами не наблюдалось.

Различия в динамике активности ферментов САОЗ, зависящие от вида предобработки, могут быть обусловлены предполагаемыми различиями в механизмах реализации эффектов ЦЭТ и ТСФ. Неполная нормализация ГП и КАТ на фоне интактного уровня процессов ПОЛ после введения ТСФ может говорить о снижении активности систем, генерирующих свободные радикалы, или переключении на поддержку неферментативного звена САОЗ. В отношении ГП необходимо отметить, что ее активация может осуществляться при помощи факторов (фактор транскрипции p53), мало участвующих в регуляции остальных участников системы САОЗ [82, 227]. Возможно, что индукторы этих механизмов не являются термостабильными.

Таким образом, предобработка животных ТСФ за 4 ч до интоксикации ТХМ не приводит к полному восстановлению работы ферментативной САОЗ, но полностью нормализует интенсивность процессов ПОЛ.

Описанные в данном разделе результаты согласуются с многочисленными литературными данными [2, 8, 14, 15] и демонстрируют, что однократное введение ТХМ вызывает значительное повреждение печени, наблюдаемое на всех этапах исследования. Многократное увеличение аминотрансферазной активности, повышение уровня ТБК-активных продуктов и значительное снижение содержания альбумина в сыворотке крови уже через сутки после отравления свидетельствует о гепатотропности CCl_4 и значительном поражении паренхимы печени. Через 3-е суток после отравления наблюдается значительное нарушение прооксидантно-антиоксидантного равновесия в клетках печени. К 7-м суткам все исследованные показатели возвращаются к интактным значениям.

Выживаемость реципиентов является яркой характеристикой эффективности исследуемого способа коррекции патологического состояния. В ходе экспериментов

смертность в группе ТХМ-интоксцированных животных составила 40%; в опытных группах, независимо от вида и сроков предобработки, летальных исходов не наблюдалось.

Предварительное введение ЭСФ оказывает значительное положительное действие на все изученные показатели, при этом эффективность, в некоторой степени, зависит от сроков и вида предобработки.

Согласно современным представлениям, эффекты клеточной терапии во многом обусловлены биологически активными веществами, продуцируемыми трансплантатами [16, 43, 233]. Полученные в данной работе результаты демонстрируют позитивное действие ЭСФ на прооксидантно-антиоксидантное состояние печени при экспериментальном гепатите, однонаправленное с эффектами трансплантации эмбриональных клеток [6, 34]. Сходное действие на свободнорадикальные процессы оказывали трансплантация гепатоцитов и цитозоль из регенерирующей печени, в которой экспрессируются различные регуляторные молекулы [34, 116, 119], не обнаруживаемые в зрелом органе при физиологических условиях, но присутствующие в больших количествах в эмбриональных тканях. Показано, что гепатопротекторное действие цитозоля усиливается при уменьшении возраста животных – доноров регенерирующей печени [224].

Изучение механизмов действия, в норме и при патологии, описанных в разделе 1.4 биологически активных соединений, выделяемых из эмбриональных тканей, показало, что реализация их эффектов и направленность действия зависит от типа клеток и их исходного состояния, а также от вводимой дозы и сроков введения. Основной характеристикой таких веществ является выраженное стимулирующее действие на анаболические процессы. Способы регуляторного воздействия имеют значительные отличия и могут реализовываться на любом этапе, начиная от индукции экспрессии генов и заканчивая посттрансляционной модуляцией уже существующих молекул. Сигнальная трансдукция, в основном, является рецептор-опосредованной и осуществляется при участии семейства протеинкиназ (митоген-активируемых) и ряда транскрипционных факторов, в частности NFkB, AP-1, STAT-семейство [97, 136]. Эти факторы проявляют высокую чувствительность к

прооксидантно-антиоксидантному статусу клеток, их ДНК-связывающая активность может регулироваться при помощи активных форм кислорода [18].

Широкий спектр потенциальных компонентов ЦЭТ позволяет предположить их активное участие в предупреждении развития повреждения печени при острой интоксикации ТХМ. Однако, в таких условиях сложно определить, является ли действие ЭСФ сугубо опосредованным или существуют прямые антиоксидантные эффекты предобработки. Например, мелатонин, синтезирующийся на ранних этапах эмбрионального развития [85], обладает выраженным сквенджерным действием, хотя также он опосредованно позитивно влияет на активности ферментов САОЗ при ТХМ-индуцированном гепатите и других патологиях [176, 177, 205]. Альфафетопротейн, выполняющий функции альбумина в эмбриональных тканях и демонстрирующий высокую гомологию к нему, носитель большого числа функционально активных тиоловых групп, может принимать участие как в нейтрализации свободных радикалов, так и поддерживать уровень GSH в клетках печени. Показано участие α -фетопротейна в регуляции регенерационного процесса при поражении печени ТХМ [3].

Базируясь, в частности, на данных о том, что блокада клеток Купфера хлоридом гадолиния и иммуносупрессия предупреждают развитие воспалительного ответа в ТХМ-поврежденной печени, но не препятствуют прямому повреждающему действию CCl_4 на гепатоциты [169, 210], нами было выдвинуто предположение, что в большей степени действие ЭСФ направлено на изменение цитокинового профиля и чувствительности рецепторов к провоспалительным факторам в поврежденном органе. В пользу такого предположения свидетельствует отсутствие полной нормализации трансаминазной активности на всех этапах эксперимента, уровня ТБК-активных продуктов и содержания альбумина в сыворотке в 1 и 2-е сутки, в группе с максимальным эффектом (4-часовая предобработка ЦЭТ).

Существует вероятность стабилизирующего действия ЭСФ на мембраны клеток печени, которое может приводить к снижению степени повреждения гепатоцитов ТХМ. Например, показано, что предварительное введение ЭФР повышает устойчивость мембран гепатоцитов к действию повреждающих факторов

[244]. В дальнейшем, развитие гепатита во многом обусловлено не самим повреждающим агентом, а запускаемыми им реакциями организма на экзогенное вмешательство. Здесь важным фактором может являться появление у клеток печени рецептор-опосредованной толерантности к действию провоспалительных цитокинов. Показано, что преинкубация гепатоцитов или предобработка животных провоспалительными цитокинами ФНО α и ИЛ-1 в небольших концентрациях приводит к интернализации рецепторов к ним, т. е. понижению чувствительности к последующему действию эндогенно экспрессируемых факторов при ТХМ-интоксикации [196, 198]. Кроме того, такая предобработка оказывает положительное действие на активность ферментов САОЗ, в частности в непаренхиматозных клетках печени, ответственных за развитие воспалительного ответа при индукции острого гепатита. Применение небольших концентраций ФНО α приводит к кратковременному повышению экспрессии мРНК и активности Г6ФДГ в непаренхиматозных клетках печени уже через 7 ч после введения, также повышается активность КАТ и супероксиддисмутазы в клетках Купфера, γ -глутамилцистеинилсинтетазы в гепатоцитах [166, 210, 215, 216]. Такое повышение оксидорезистентности всех типов клеток печени может вносить существенный вклад в предупреждение развития цитокин-опосредованного повреждения при действии СС14.

Наличие провоспалительных цитокинов, в частности ФНО α , является необходимым критерием для полноценного ответа клеток печени на митогенные сигналы ростовых факторов, содержащихся в эмбриональных тканях [92, 97].

Трансплантация клеток эмбриональной печени приводит к запуску регенерационных процессов в печени при экспериментальном циррозе, вызывая значительные морфологические улучшения [6, 34]. Присутствие на этапах предподготовки и после инициации гепатита компонентов ЦЭТ, способных примировать и стимулировать пролиферацию гепатоцитов, позволяет предположить инициацию регенерации в печени сразу после введения повреждающего агента.

Важным фактором развития регенерационного ответа после введения ТХМ является прооксидантно-антиоксидантный баланс клеток печени. Особенно

необходимо подчеркнуть роль НАДФН и основного его источника - Г6ФДГ реакции. Угнетение активности Г6ФДГ при острой интоксикации ТХМ снижает митоген-активируемый пролиферативный потенциал гепатоцитов [230]. Нормализация активности фермента в печени, на фоне снижения количества свободнорадикальных продуктов под действием ЭСФ, может являться достаточной предпосылкой для раннего пролиферативного ответа гепатоцитов после интоксикации ТХМ. Показано, что ростовые факторы, вызывают повышение активности Г6ФДГ [96]. Этот процесс происходит очень быстро, в первую очередь, за счет высвобождения существующих молекул фермента из структурных элементов клетки [217].

Согласно литературным данным, активные формы кислорода играют важную роль в регуляции пролиферации, в частности при передаче митогенных сигналов ростовых факторов [18]. Интригующее изменение прооксидантно-антиоксидантного состояния при высокой активности Г6ФДГ в печени ТХМ-интоксигированных животных после 24-часовой предобработки ЦЭТ, может являться косвенным свидетельством массивного выхода гепатоцитов из состояния покоя (пролиферативная фаза либо ее окончание), и, вероятно, демонстрирует следующий этап действия ЭСФ (по сравнению с 4-часовой предобработкой) на поврежденный орган.

Нормализация процессов ПОЛ при ТХМ-интоксикации под действием ЭСФ может происходить путем положительной регуляции активности ферментов САОЗ, повышение которой мы наблюдаем во всех видах экспериментов. По всей вероятности, эффекты реализуются через описанные ранее транскрипционные факторы, которые чувствительны к сигналам митогенов, цитокинов и прооксидантно-антиоксидантному состоянию клеток. Зависимость исследованных в настоящей работе показателей САОЗ от ингибирующего действия провоспалительных цитокинов, служит подтверждением данному предположению. Главным кандидатом в посредники является NO (показано NO-опосредованное изменение нарушенного цитокинового профиля под действием экстракта из эмбрионов овец [111]). Реализация эффектов предобработки может осуществляться

на любом этапе биосинтеза *de novo* или активации ферментов. Несмотря на то, что регуляция процессов регенерации осуществляется в основном на этапе посттранскрипционной регуляции [150], необходимо отметить, что компоненты фетальных экстрактов (ФРГ, ЭФР, ТФР α) обладают мощным стимулирующим эффектом на биосинтез ДНК [97, 131]. Поэтому нельзя исключить действие ЭСФ на генетический аппарат клетки. Показано положительное действие фетальных экстрактов на репарацию поврежденных нуклеотидов в гепатоцитах [77]. ТХМ же является фактором, вызывающим значительные повреждения структуры ДНК в ядрах гепатоцитов и угнетающим биосинтетические процессы [17].

Также необходимо отметить, что важными участниками процесса эмбрионального развития является ряд факторов, обладающих выраженным противовоспалительным действием, такие как ИЛ-3, 4, 10, 13, действие которых осуществляется путем угнетения активности NF κ B, что приводит к улучшению антиоксидантного статуса клеток, снижению экспрессии ФНО α и количества мембранных рецепторов к провоспалительным цитокинам [139, 250, 251].

Выраженный эффект предобработки в отношении прооксидантно-антиоксидантного равновесия в клетках печени, по-видимому, обусловлен комплексным воздействием различных компонентов ЦЭТ. В случае предобработки ТСФ наблюдаются некоторые особенности, которые, вероятно, связаны с отсутствием ряда необходимых термолабильных компонентов. Существует вероятность, что действие ТСФ на САОЗ, в основном направлено на поддержание ее неэнзиматического звена с менее выраженным воздействием на ферментативную часть. Для пополнения пула низкомолекулярных сквенджеров свободных радикалов, в частности GSH, необходим НАДФН, генерируемый в Г6ФДГ реакции [187]. Возможно, что в зависимости от вида предобработки происходит переключение различных уровней САОЗ, что является причиной различного вклада ее составляющих (ферментативного и неферментативного звена). Одним из потенциальных компонентов ТСФ может быть ингибитор миграции макрофагов, обладающий высокой устойчивостью к действию высоких температур [174]. Возможно, что его наличие позволяет частично предупредить активацию

резидентных макрофагов печени – клеток Купфера, а также последующую инфильтрацию иммунокомпетентных клеток, вносящих существенный вклад в развитие свободнорадикального и цитокинового повреждения печени.

Еще одним кандидатом в активные компоненты ТСФ является ТФРГ. Показано его превентивное действие на развитие свободнорадикальных процессов при ТХМ-индуцированном гепатите [1, 163]. Необходимо отметить, что ТФРГ является мощным стимулятором регенерационных процессов в печени при повреждении, но не их инициатором [156]. Таким образом, реализация митогенного действия ТФРГ может осуществляться только после примирования гепатоцитов эндогенными провоспалительными факторами в ходе развития ТХМ-индуцированного повреждения печени, а не на этапе предподготовки к стрессорному воздействию. Возможно, что наблюдается эффект «запаздывания» регенерационного ответа клеток печени по сравнению с действием ЦЭТ. Данный факт может объяснять менее выраженную эффективность предобработки ТСФ на течение СС14-индуцированного гепатита и состояние САОЗ после интоксикации.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о значительном превентивном действии ЭСФ на развитие ТХМ-индуцированного гепатита у крыс, что проявляется в снижении степени повреждения печени и нормализации окислительно-восстановительного равновесия, и, вероятно, стимуляции процессов регенерации в поврежденном органе. Комплексное воздействие ЦЭТ, по сравнению с ТСФ, позволяет увеличить эффективность предобработки, что, по-видимому, обусловлено синергичным действием активных компонентов ЦЭТ, которые являются термолабильными.

Наблюдаемое превентивное действие ЭСФ на функциональное состояние, степень повреждения печени и состояние САОЗ, реализующееся на ранних этапах после острой интоксикации ТХМ, позволило предположить перспективность применения бесклеточных ЭСФ для повышения сохранности органа при холодовом хранении. Наиболее приемлемым по срокам и эффективности воздействия представляется введение ЦЭТ за 4 ч до начала эксперимента.

3.2. Действие эмбриоспецифических факторов на состояние печени в ходе гипотермического хранения и последующей реперфузии

Проблема длительного хранения печени с сохранением функциональной активности перед трансплантацией остается не до конца разрешенной. Разработанный в Институте проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины сахарозо-содержащий раствор [35] по своей эффективности в отношении хранящегося органа не уступает UW (общепринятый для гипотермического хранения в клинических условиях) [27, 29, 49], поэтому в нашей работе мы использовали именно его.

Исходное состояние органа во многом определяет его устойчивость к повреждающему действию гипотермического хранения и нормотермической реперфузии [200]. В связи с этим фактом и, опираясь на результаты, описанные в предыдущем разделе, мы предположили, что введение ЭСФ *in vivo*, при жизни донора, позволит провести своеобразную предподготовку организма в целом и, в частности печени, к экстремальному воздействию – гипотермическому хранению и последующей нормотермической реперфузии (ГХ/НР). В качестве источника ЭСФ при данной экспериментальной модели был выбран ЦЭТ, который вводили за 4 ч до ГХ. Животным контрольной группы вводили изотоничный физиологический раствор.

3.2.1. Влияние эмбриоспецифических факторов на степень элиминации аминотрансфераз при нормотермической реперфузии

Оценка аминотрансферазной активности перфузата является удобным экспресс-методом для исследования степени повреждения органа в ходе ГХ/НР.

После 1 ч ГХ/10 мин НР в контрольной группе, активность АСТ составила $2,03 \pm 0,6$, и АЛТ – $1,32 \pm 0,4$ Е/В перфузата. В ходе последующей реперфузии в течение 60 мин трансаминазная активность незначительно повышалась. Вместе с

тем, к моменту окончания НР активность ферментов увеличивалась достоверно, по сравнению с исходными значениями, независимо от группы животных (рис. 3.12, 3.13).

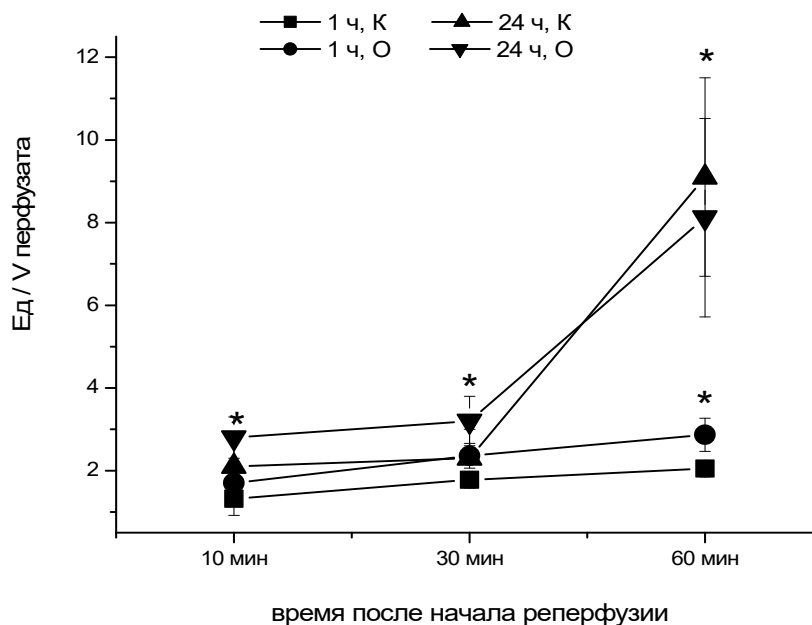


Рис. 3.12. Влияние предобработки ЭСФ на активность АЛТ в перфузате.

Примечания: * – достоверные отличия относительно 1 ч ГХ/10 мин НР; $p < 0,05$

На этом рис. и в дальнейшем:

К – контрольная группа (предобработка физиологическим раствором;

О – опытная группа (предобработка ЦЭТ).

Продление сроков хранения до 24 ч не влияло на аминотрансферазную активность в начале реперфузии. Через 30 мин в контрольной группе наблюдалось достоверное повышение активности АСТ на 36%. В опытной группе изменений в активности АСТ не наблюдалось, в то время как АЛТ увеличивалась на 60%. В течение последних 30 мин реперфузии происходило резкое усиление элиминации аминотрансфераз. Предобработка ЭСФ снижала активность АСТ в 1,4 раза и не влияла на уровень АЛТ по сравнению с контрольной группой. Следует отметить, что на последнем этапе НР наблюдался значительный разброс между экспериментальными данными, как в контрольной, так и в опытной группе (рис. 3.12, 3.13).

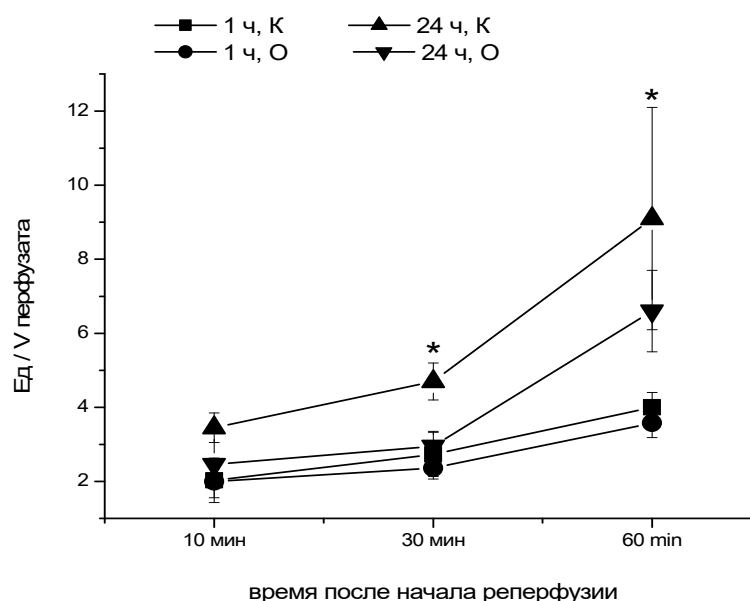


Рис. 3.13. Влияние предобработки ЭСФ на активность АСТ в перфузате.

* — достоверные отличия относительно 1ч ГХ/10 мин НР; $p < 0,05$

Нет единого мнения о взаимосвязи между жизнеспособностью органа после хранения и степенью элиминации АЛТ, АСТ и ЛДГ при НР [228]. Полученные в настоящей работе результаты согласуются с литературными данными о существующей корреляции между уровнем маркерных ферментов в перфузате и длительностью ГХ/НР [49, 200, 222]. Низкий уровень аминотрансферазной активности в начале НР практически не зависит от длительности хранения, что подтверждает мнение о необходимости проведения НР для оценки степени повреждения органа в ходе гипотермического хранения.

Несмотря на то, что активность маркерных ферментов, покинувших орган, считается показателем, демонстрирующим степень сохранности печени, он является лишь свидетельством развития локального некроза вследствие нарушения микроциркуляции [137]. Основным типом клеточной смерти при ишемии/реперфузии является апоптоз [134], при котором не происходит нарушения целостности клеток печени, следовательно, макромолекулы не выходят из клеток. В пользу этого свидетельствуют данные о том, что применение некоторых гепатопротекторов при ишемии/реперфузии не влияет на степень элиминации

аминотрансфераз, оказывая при этом значительное действие на другие показатели и увеличивая выживаемость реципиентов после трансплантации [228]. Кроме того, в последнее время, некоторые авторы ставят под сомнение тесную корреляцию между экстрацеллюлярной трансаминазной активностью и степенью повреждения органа, что может быть обусловлено неустановленными механизмами регуляции активности этих ферментов [50].

Полученные данные показывают, что на модели ГХ/НР не выявляется столь выраженное действие ЭСФ, как в случае ТХМ-индуцированного гепатита. Возможно, что несоответствие сроков исследования аминотрансферазной активности при токсическом гепатите и ГХ/НР, также является причиной снижения эффекта предобработки в последнем случае. Вероятно, что замедление метаболизма при охлаждении не позволяет полностью реализоваться эффектам ЭСФ, которые наблюдаются *in vivo* уже в первые сутки после отравления ТХМ.

Известно, что реализация проапоптотических сигналов тесно связана с митохондриями [134, 136, 141]. Многие исследователи подчеркивают, что развитие повреждений при ГХ/НР начинается именно в митохондриях, дисфункция которых является причиной внутриклеточного оксидативного стресса [68, 183, 197]. В нашей работе наблюдалось достоверное снижение активности АСТ под действием ЭСФ. Этот фермент, в отличие от АЛТ, частично локализован в митохондриях. Можно предположить, что действие ЭСФ реализуется на уровне модуляции проапоптотических сигналов и предупреждения дисфункции митохондрий.

3.2.2. Влияние предобработки эмбриоспецифическими факторами на процессы ПОЛ в печени при гипотермическом хранении и нормотермической реперфузии

Свободнорадикальные процессы являются важнейшим фактором развития повреждений при ГХ/НР. Для оценки прооксидантного статуса печени в ходе

экспериментов мы исследовали базальный уровень ТБК-активных продуктов и интенсивность индуцированного ПОЛ в печени сразу после ГХ и по окончании НР.

В интактной группе базальный уровень МДА составлял $406,1 \pm 58,9$ пмоль/мг белка. Было показано, что уже через 1 ч хранения в контрольной группе происходило значительное, в 1,6 раза ($p < 0,05$), повышение базального уровня МДА, которое сохранялось после реперфузии печени на том же уровне (рис. 3.14).

Предобработка ЭСФ приводила к достоверному снижению уровня ТБК-активных продуктов в печени после 1 ч ГХ ($p < 0,05$). После НР содержание МДА продолжало снижаться и достигало уровня интактной группы.

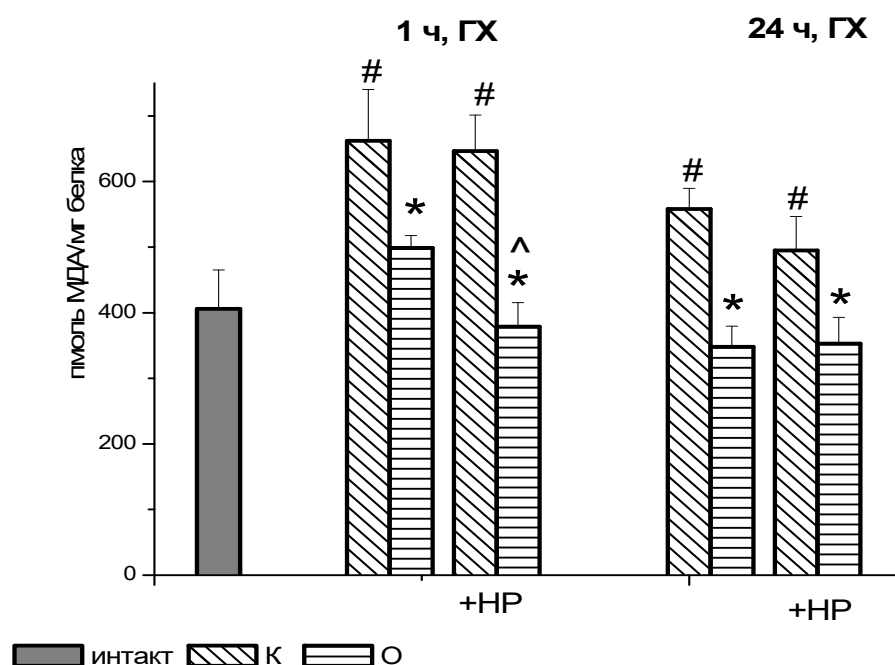


Рис. 3.14. Влияние ЭСФ на базальный уровень ТБК-активных продуктов в гомогенате печени в ходе гипотермического хранения и последующей реперфузии.

Примечания: * — достоверные отличия относительно контрольной группы;

^ — достоверные отличия между опытными группами;

— достоверные отличия относительно интактной группы; $p < 0,05$

Базальный уровень ТБК-активных продуктов в контрольной группе после 24 ч хранения оставался на высоком уровне, реперфузия слабо влияла на этот показатель. Предобработка ЭСФ вызывала устойчивое снижение содержания МДА, как сразу после хранения, так и через 60 мин реперфузии (рис. 3.14) ($p < 0,05$).

Скорость накопления ТБК-активных продуктов в контрольной группе оставалась неизменной через 1 ч хранения и при последующей реперфузии и находилась на уровне интактной группы ($35,4 \pm 8,8$ пмоль МДА/мг белка за 1 мин) (рис. 3.15). 24-часовое ГХ печени не влияло на интенсивность индуцированного ПОЛ в печени, последующая реперфузия приводила к повышению показателя в 1,5 раза ($p < 0,05$).

Скорость накопления ТБК-активных продуктов после предобработки ЭСФ достоверно снижалась, не только относительно контрольной, но и интактной группы в 1,5-2 раза, через 1 ч ГХ/НР, а также через 24 ч хранения. После НР показатель повышался до нормальных значений (рис. 3.15).

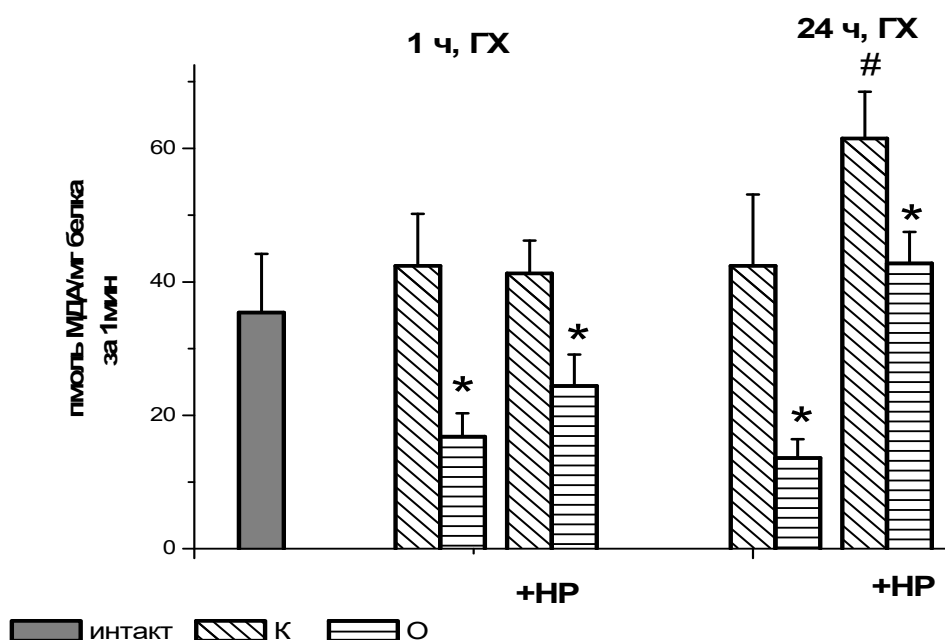


Рис. 3.15. Влияние ЭСФ на интенсивность индуцированного ПОЛ в гомогенате печени в ходе гипотермического хранения и нормотермической реперфузии.

Примечания: * — достоверные отличия относительно контрольной группы;

— достоверные отличия относительно интактной группы; $p < 0,05$

Повышение базального уровня ТБК-активных продуктов уже через 1 ч ГХ свидетельствует о развитии свободнорадикальных процессов в органе. Вероятно, что этот факт обусловлен развитием внутриклеточного оксидативного стресса [197], который усугубляется гипоксической активацией клеток Купфера, которые

продуцируют большое количество H_2O_2 [154]. Полученные результаты согласуются с литературными данными, свидетельствующими о повышении содержания продуктов ПОЛ при различных сроках ГХ/НР. Показано увеличение количества первичных (диеновых конъюгатов), вторичных (ТБК-активных) продуктов и органических гидроперекисей [49, 204, 205, 222, 237]. Наблюдаемое при ишемии/реперфузии накопление супероксиданиона, H_2O_2 , также вносит существенный вклад в общее содержание свободных радикалов [197, 207].

В настоящее время не вызывает сомнения важнейшая роль свободнорадикальных процессов в развитии ишемически-реперфузионных повреждений печени. Показано, что экзогенное применение ряда прямых антиоксидантов [148, 153, 205, 237], ферментов САОЗ [137, 199, 243] оказывает выраженное защитное действие на печень, подвергнутую ишемии/реперфузии различной длительности.

Отсутствие повышения интенсивности индуцированного ПОЛ при ГХ и НР может быть обусловлено низкой реактивностью системы неферментативного ПОЛ, накопление ТБК-активных продуктов, вероятно, происходит, в основном, ферментативным путем при участии системы микросомального окисления и ксантиноксидазы, накопление субстратов которой (ксантина и гипоксантина) показано на этапе холодовой ишемии [95, 148, 149]. В пользу такого предположения свидетельствует эффективность применения аллопуринола, ингибитора ксантиноксидазы, для ослабления повреждения печени при ГХ [152].

Увеличение скорости накопления ТБК-активных продуктов в группе с максимальным временем воздействия (24 ч ГХ/60 мин НР) может свидетельствовать о массивном повреждении клеток печени и появлении дополнительных механизмов генерации свободных радикалов. Показано, что увеличение продолжительности холодового хранения коррелирует с повышением чувствительности гепатоцитов к действию оксидативного стресса [241]. Также существуют данные о том, что активация клеток Купфера, продуцирующих H_2O_2 , происходит только в случае длительной холодовой ишемии (12 ч), при уменьшении

срока хранения основными источниками свободных радикалов являются эндотелиальные клетки и гепатоциты [73, 207].

Превентивное действие ЭСФ может быть обусловлено как снижением количества субстратов для цепных реакций ПОЛ, так и ингибированием активности систем, генерирующих активные формы кислорода.

Основным фактором ограниченности срока хранения органа является именно кооперативный ответ клеток печени на повреждение. В первую очередь, при этом страдают перипортальные гепатоциты, которые в связи с нарушением микроциркуляции образуют зону некроза [66]. Межклеточная сигнализация приводит к массивному выходу GSH из гепатоцитов для защиты эндотелиальных клеток, сенситизируя клетки к действию свободных радикалов [133]. Повреждение гепатоцитов в случае ГХ/НР носит вторичный характер, показано, что изолированные паренхиматозные клетки могут быть подвергнуты длительному ГХ (72 ч) без существенных изменений в прооксидантно-антиоксидантном статусе [49]. Последовательность событий, наблюдаемая при развитии ишемически-реперфузионного повреждения печени, ГХ/НР демонстрирует значительное расхождение с моделью ТХМ-индуцированного гепатита, при котором гепатоциты являются основной мишенью для действия повреждающего агента и страдают в первую очередь [48, 210]. Активация непаренхиматозных клеток печени под действием ТХМ происходит опосредованно, при помощи сигналов, поступающих из поврежденных гепатоцитов [133, 134, 136].

Наблюдаемое снижение интенсивности индуцированного ПОЛ ниже интактного уровня под действием ЭСФ может быть обусловлено гиперэкспрессией антиоксидантных ферментов. Учитывая существенную роль САОЗ в реализации эффектов ЭСФ было целесообразно оценить ее состояние при повреждении печени в ходе ГХ/НР.

3.2.3. Влияние эмбриоспецифических факторов на состояние системы антиоксидантной защиты в ходе гипотермического хранения и последующей реперфузии

Состояние САОЗ оценивали по активности основных антиоксидантных ферментов – КАТ и ГП, а также систем, поддерживающих их работу – ГР, Г6ФДГ.

В норме активность КАТ составляла $114,5 \pm 26,4$ мкмоль H_2O_2 /мг белка за 1 мин. 1 ч ГХ приводил к выраженному, в 2 раза, снижению КАТ активности ($p < 0,01$). После НР активность находилась на таком же уровне. Продление срока хранения до 24 ч и последующая НР слабо повлияли на КАТ активность, она была ниже исходного уровня (рис. 3.16).

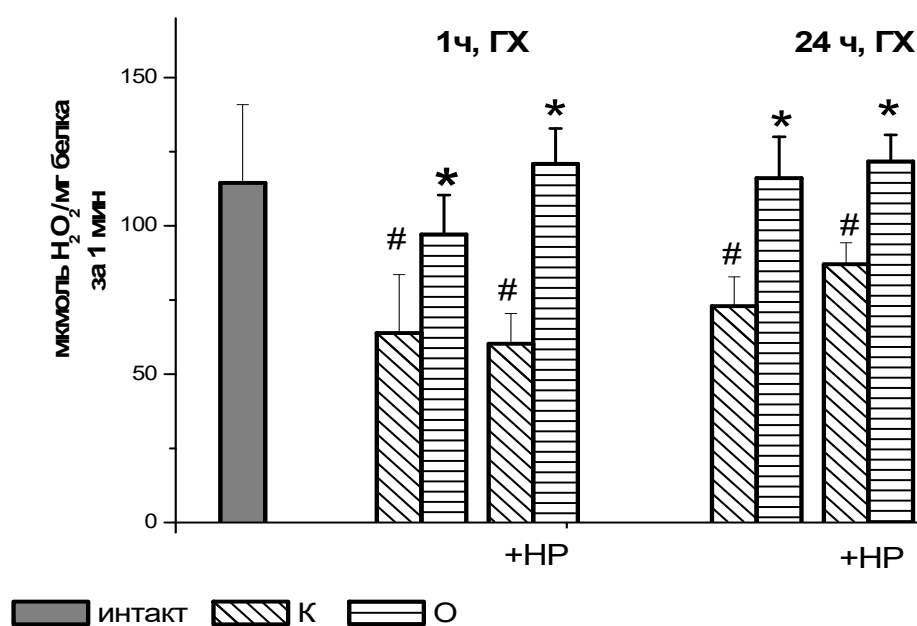


Рис. 3.16. Влияние ЭСФ на каталазную активность печени в ходе гипотермического хранения и нормотермической реперфузии.

Примечания: * – достоверные отличия относительно контрольной группы;

– достоверные отличия относительно интактной группы; $p < 0,05$

Предобработка ЭСФ восстанавливала КАТ активность до интактного уровня во все изученные сроки хранения, до и после реперфузии (рис. 3.16).

Чувствительность КАТ к действию повреждающих факторов является известным фактом. На ранних этапах ГХ происходит инаktivация фермента без изменения его количества [117], нормальная активность супероксиддисмутазы при этом является источником дополнительных свободных радикалов [212]. Последующая НР приводит к протеолизу существующих молекул и деградации мРНК фермента [212]. Нормализующее действие ЭСФ может быть обусловлено как регуляцией собственно активности фермента, так и путем предполагаемого механизма стабилизации мембранных структур. Показано [117], что при ишемии/реперфузии происходит нарушение ультраструктуры пероксисом, которое, несомненно, способствует угнетению активности КАТ и выходу H_2O_2 из этих органелл.

Ключевую роль в защите клеток печени от повреждающего действия ГХ/НР многие авторы отводят ГП – единственному ферменту, работающему сопряженно с супероксиддисмутазой в защитной системе митохондрий при развитии внутриклеточного оксидативного стресса [30, 137].

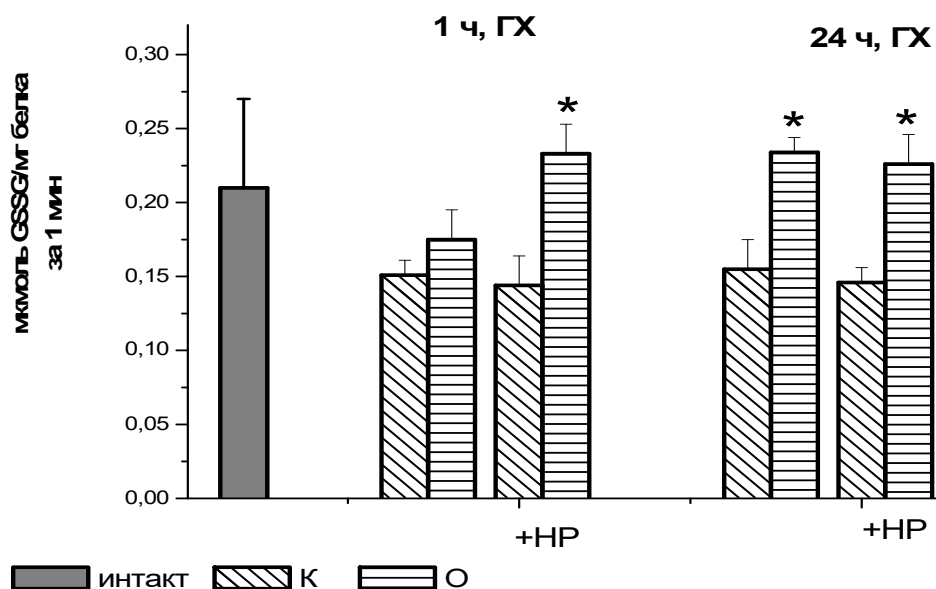


Рис. 3.17. Влияние ЭСФ на глутатионпероксидазную активность в печени в ходе гипотермического хранения и нормотермической реперфузии.

* – достоверные отличия относительно контрольной группы; $p < 0,05$

В норме активность ГП была на уровне $0,210 \pm 0,06$ мкмоль GSSG/мг белка за 1 мин. После 1 ч ГХ наблюдалась тенденция ($p=0,07$) к снижению активности ГП в контрольной группе до $72 \pm 10\%$ относительно интактных значений. Предобработка ЭСФ не влияла на этот показатель (рис. 3.17). После 60 мин НР тенденция в контрольной группе сохранялась. В опытной группе наблюдалось достоверное повышение активности ГП в 1,6 раза ($p<0,02$). Аналогичная картина наблюдалась на всех последующих этапах исследования. Отсутствие достоверных отличий между интактной и контрольной группой может быть обусловлено значительным разбросом значений в интактной группе.

Действие ЭСФ на активность ГП, вероятно, осуществляется опосредованно, путем регуляции редокс-чувствительных элементов, которые принимают участие в активации фермента, в частности фактора транскрипции p53 [82, 227]. Отсутствие эффекта ЭСФ на этапе 1ч ГХ может быть обусловлено недостаточным временем для реализации действия вследствие замедления метаболических процессов при охлаждении. В пользу такого предположения свидетельствует высокая активность ГП через 24 ч ГХ перед началом НР, возвращающей орган в «физиологические условия».

Многие исследователи указывают на снижение активности ГП в печени при ишемии/реперфузии, при этом особо важную роль играет НР [137, 212, 205]. Степень угнетения активности зависит от продолжительности воздействия, как хранения, так и реперфузии [68]. Причиной угнетения активности ГП в случае НР во многом является быстрая потеря паренхиматозными клетками печени GSH, который используется для защиты эндотелиальных клеток печеночного синусоида [133]. Как указывалось ранее, восстановление пула GSH возможно за счет работы γ -глутамилцистеинилсинтетазы и ГР. Учитывая тот факт, что GSH элиминирует из гепатоцитов, его количество может быть восстановлено только путем синтеза *de novo*. Тем не менее, в клетках печени, в частности в митохондриях, накапливается определенное количество GSSG, для восстановления которого требуется завершение редокс-цикла глутатиона при помощи ГР.

Было установлено, что в норме активность ГР составляла $15,2 \pm 2,1$ нмоль НАДФН/мг белка за 1 мин. ГХ в течение 1 ч приводило к выраженному, в 2 раза, снижению активности ГР ($p < 0,05$) в контрольной группе. Последующая НР не влияла на активность фермента. Увеличение срока ГХ до 24 ч вызывало снижение активности ГР в 2 раза ($p < 0,05$), НР не влияла на данное изменение (рис. 3.18).

Предобработка ЭСФ приводила к восстановлению активности ГР практически до интактных значений во все изученные сроки (рис. 3.18).

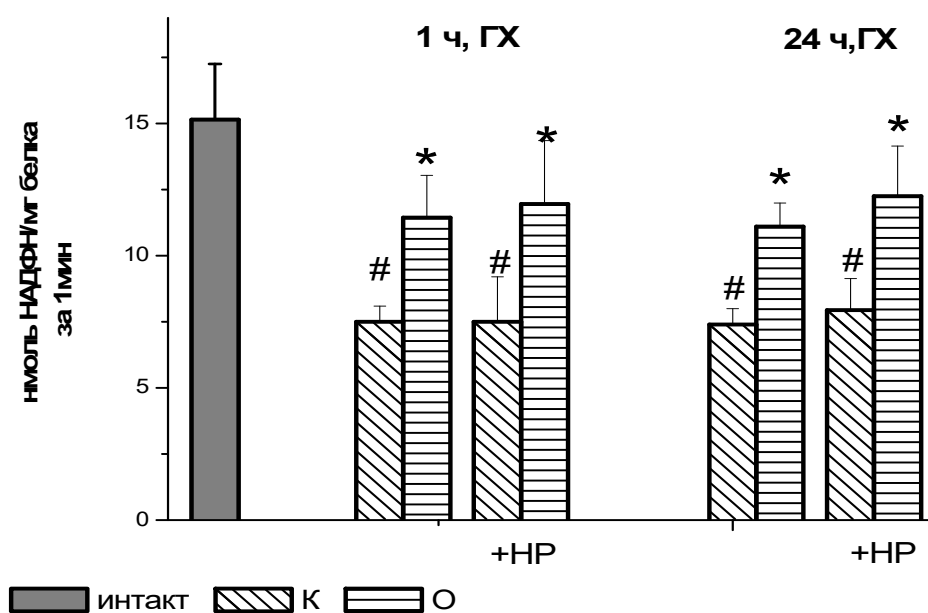


Рис. 3.18. Влияние ЭСФ на глутатионредуктазную активность в печени в ходе гипотермического хранения и нормотермической реперфузии.

Примечания: * — достоверные отличия относительно контрольной группы;

— достоверные отличия относительно интактной группы; $p < 0,05$

Угнетение активности ГР при ГХ/НР, наблюдаемое в данной работе согласуется с литературными данными [68, 205]. Ингибирование фермента может быть обусловлено несколькими причинами: холодной инактивацией фермента, обусловленной изменением окислительно-восстановительного статуса клеток печени; высокой чувствительностью молекул фермента к действию субнулевых температур; недостатком субстрата для восстановления.

Проявление положительного эффекта предобработки ЭСФ на активности ГП и ГР может быть обусловлено воздействием на любом из описанных этапов. Сюда может быть отнесено предполагаемое в нашей работе стабилизирующее действие ЭСФ на мембраны, которое может препятствовать потере клетками обеих форм глутатиона. Кроме того, не исключается возможность регуляторного действия на цитокин-чувствительные факторы транскрипции.

Важнейшим фактором, влияющим на чувствительность клеток к действию оксидативного стресса, является состояние пула НАДФН. В нашем случае от его состояния прямо зависят ГР и КАТ [78, 143], а аллостерически – ГП [30]. Так как основным поставщиком восстановительных эквивалентов считается ключевой фермент пентозофосфатного пути – Г6ФДГ, мы исследовали ее активность в ходе ГХ/НР.

У интактных животных активность Г6ФДГ составила $16,2 \pm 1,6$ нмоль НАДФН/мг белка за 1 мин.

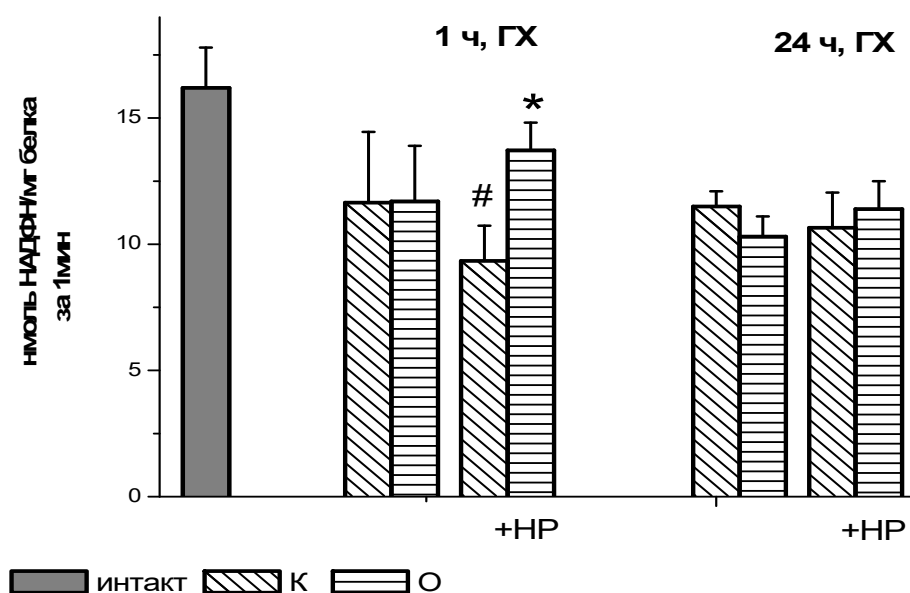


Рис. 3.19. Влияние ЭСФ на глюкозо-6-фосфатдегидрогеназную активность в печени в ходе гипотермического хранения и нормотермической реперфузии.

Примечания: * – достоверные отличия относительно контрольной группы;

– достоверные отличия относительно интактной группы; $p < 0,05$

1 ч ГХ не привел к достоверному снижению активности Г6ФДГ в контрольной группе, однако наблюдалась тенденция к нему ($72 \pm 9\%$ по сравнению с интактной группой). Предобработка ЭСФ не влияла на исследуемый показатель (рис. 3.19). После 1 ч ГХ/60 мин НР наблюдалось достоверное понижение, в 1,7 раза ($p < 0,05$) активности Г6ФДГ в контрольной группе относительно интактной группы. Введение ЭСФ приводило к увеличению активности фермента (в 1,5 раза) до нормальных значений ($p < 0,05$). После 24 ч ГХ, до и после реперфузии, никаких дополнительных изменений в активности Г6ФДГ в контрольной группе не наблюдалось, предобработка ЭСФ не влияла на активность фермента, и тенденция к снижению активности сохранялась (рис. 3.19). Наблюдаемое при этом выраженное угнетение активности КАТ и ГР, тесно связанных с пулом НАДФН в клетке, вероятно, свидетельствует об инактивации этих ферментов, независимой от окислительно-восстановительного равновесия в клетке и описанной ранее в разделе 1.

Отсутствие эффекта предобработки ЭСФ в отношении этого фермента может свидетельствовать о запуске других регуляторных механизмов, не связанных с активацией пентозофосфатного пути. Кроме того, известно, что в клетках печени, в отличие от других органов, наблюдается высокая активность других НАДФН-генерирующих ферментов (малик-фермента, изоцитратдегидрогеназы), которые могут частично компенсировать недостаток окислительно-восстановительных эквивалентов [182].

Несмотря на то, что в настоящее время Г6ФДГ и НАДФН отводят одну из ключевых ролей в поддержании окислительно-восстановительного равновесия в клетке, уровня GSH, митохондриального трансмембранного потенциала и чувствительности к проапоптотическим сигналам [187], нами не было обнаружено каких-либо литературных данных о влиянии ГХ/НР на активность этого фермента в гепатоцитах.

Наблюдаемая в нашей работе устойчивость фермента к действию охлаждения и последующей реперфузии может быть связана с несколькими факторами. Молекулярная структура Г6ФДГ обладает определенной стабильностью к действию

повреждающих агентов, для этого необходимо достаточное количество НАДФ⁺, который накапливается при гипоксии органа [65]. Активация фермента является адаптационным ответом клеток на стресс, поддержание работы пентозофосфатного пути является одним из лимитирующих факторов для анаэробного гликолиза, основного источника макроэргов при ишемии органа [230]. Наблюдаемое снижение активности Г6ФДГ после 1 ч ГХ/60 мин НР может быть связано с неэнзиматической инактивацией фермента продуктом ПОЛ – малоновым диальдегидом [105]. В данном случае и может проявляться регуляторное действие вводимых ЭСФ, вызывавших нормализацию процессов ПОЛ. Также показано, что ростовые факторы, в частности ЭФР, могут быстро мобилизовать мембраносвязанные молекулы фермента для поддержания пула НАДФН [217].

Вклад в общую Г6ФДГ активность печени, особенно на этапе длительного ГХ, могут вносить активированные клетки Купфера, в которых при ишемии/реперфузии пентозофосфатный путь является основным поставщиком НАДФН для НАДФН-оксидазы, интегрального белка плазматической мембраны, генерирующего супероксиданион во внеклеточное пространство [235].

Несмотря на практически полное отсутствие отличий в прооксидантно-антиоксидантном состоянии между краткосрочным и длительным хранением печени, вполне вероятно, что соотношение вкладов различных систем, генерирующих свободные радикалы, имеет существенные различия, зависящие от времени охлаждения. Подтверждением этому предположению, помимо литературных данных [73], является снижение активности Г6ФДГ на этапе 1 ч ГХ/60 мин НР, которое не наблюдается в дальнейшем, и повышение скорости накопления ТБК-активных продуктов только на этапе 24 ч ГХ/60 мин НР.

Корректирующее действие предобработки ЭСФ, наблюдаемое в отношении всех изученных показателей прооксидантно-антиоксидантного равновесия, может быть обусловлено несколькими факторами. Необходимо подчеркнуть, что в связи с небольшими сроками воздействия в случае ГХ/НР можно предположить прямые эффекты компонентов ЦЭТ на состояние печени при ГХ/НР. В частности, сюда

относится предполагаемый механизм изменения под действием ЭСФ физико-химических свойств мембран клеток печени, в частности путем регуляции их рецепторных свойств. Стабилизация мембран гепатоцитов на фоне появления толерантности к действию провоспалительных факторов, может снижать степень повреждения клеток печени и препятствовать быстрой потере антиоксидантов, в особенности GSH.

Выявленное в работе снижение интенсивности индуцированного ПОЛ ниже интактного уровня на всех этапах эксперимента, кроме последнего (24 ч ГХ/60 мин НР), без выраженного повышения активности ферментов САОЗ, может быть обусловлено присутствием в ЦЭТ компонентов, способных проявлять частичное скавенджерное действие и/или ингибирующих прооксидантные системы, и положительно влияющих на активность ферментов САОЗ. В первую очередь, это мелатонин и α -фетопротеин, высокое содержание которых в ЦЭТ может позитивно влиять на про- и антиоксидантный статус клеток печени при ГХ/НР.

Необходимо подчеркнуть важную роль нормализации цитокинового профиля для успешного исхода ГХ/НР, особенно при длительном хранении органа. Снижение количества провоспалительных факторов (но не полное их отсутствие) при ишемии/реперфузии способствует снижению степени дисфункции органа, нормализации работы САОЗ, что, в свою очередь, ведет к уменьшению числа погибших клеток. Эффективность применения различных блокаторов воспалительного ответа при ишемии/реперфузии показана в ряде работ [69, 122, 199, 246]. Однако, использование подобных соединений не может не отразиться на функциональной активности печени при долговременном воздействии, например, при трансплантации, так как известно, что для запуска последующих репаративных процессов необходимо наличие провоспалительных факторов [97, 178]. Большой интерес представляет использование противовоспалительных цитокинов, присутствующих в эмбриональных тканях. Эффективность применения некоторых из них показана при ишемии/реперфузии. Так, введение ИЛ- 4, 10, 13, экспрессируемых в ходе эмбрионального развития, приводило к угнетению продукции ФНО α и ИЛ-1, снижало ДНК-связывающую активность NF κ B и

повышало таковую фактора STAT6, который, в свою очередь, усиливал продукцию антагониста к рецепторам ИЛ-1 на поверхности гепатоцитов [139, 250, 251]. Обработка ИЛ-4, 13 приводила также к повышению экспрессии эндогенных противовоспалительных цитокинов при НР [139]. Кроме того, одним из мощных факторов, демонстрировавшим защитные эффекты в отношении состояния печени при ишемии/реперфузии, является ФРГ. Предобработка животных ФРГ в течение недели оказывала выраженное цитопротекторное действие, что проявлялось в снижении уровня элиминировавшихся аминотрансфераз, количества как некротизированных, так и апоптотических клеток в печени, степени повреждения эндотелиальных клеток печеночного синусоида [194, 225]. Введение ФРФ при ишемии/реперфузии оказывало регуляторное действие на состояние САОЗ, при этом наиболее выраженным был эффект в отношении КАТ активности [158].

Большинство авторов указывают, что действие ростовых факторов в основном опосредуется путем стимуляции биосинтетических процессов в поврежденных клетках [97, 163, 248]. Существует вероятность того, что позитивная регуляция системы САОЗ, хотя бы частично, осуществляется при помощи биосинтеза *de novo*. В таком случае необходимо большое количество высокоэнергетических соединений, в особенности АТФ. Известно, что содержание АТФ снижается в ходе ГХ/НР [172, 193]. Этому факту отводится важная роль в реализации механизмов развития ишемически-реперфузионных повреждений, что послужило причиной нашего интереса к возможному влиянию ЭСФ на уровень АТФ.

3.2.4. Влияние предобработки эмбриоспецифическими факторами на уровень АТФ в печени

Оценка энергетического статуса клеток в ходе ГХ/НР является важнейшим показателем функциональной активности печени после возвращения в физиологические условия. ГХ является причиной угнетения процессов синтеза АТФ и снижения содержания уже существующих макроэргов, независимо от вида консервирующего раствора [114, 148, 172].

В нашей работе в качестве исходного принимался уровень АТФ через 1 ч ГХ в контрольной группе, который составил $5,18 \pm 1,3$ мкмоль АТФ/г ткани. В контрольной группе после 1 ч ГХ/60 мин НР наблюдалось достоверное снижение содержания АТФ (до $46 \pm 14\%$) относительно исходного уровня. Продление сроков хранения до 24 ч не повлияло на этот показатель, последующая реперфузия привела к достоверному снижению уровня АТФ по сравнению с 24 ч ГХ ($p < 0,05$), который составил $22 \pm 5\%$ относительно исходного (рис. 3.20). Эти данные согласуются с полученными ранее в нашей лаборатории [29, 49].

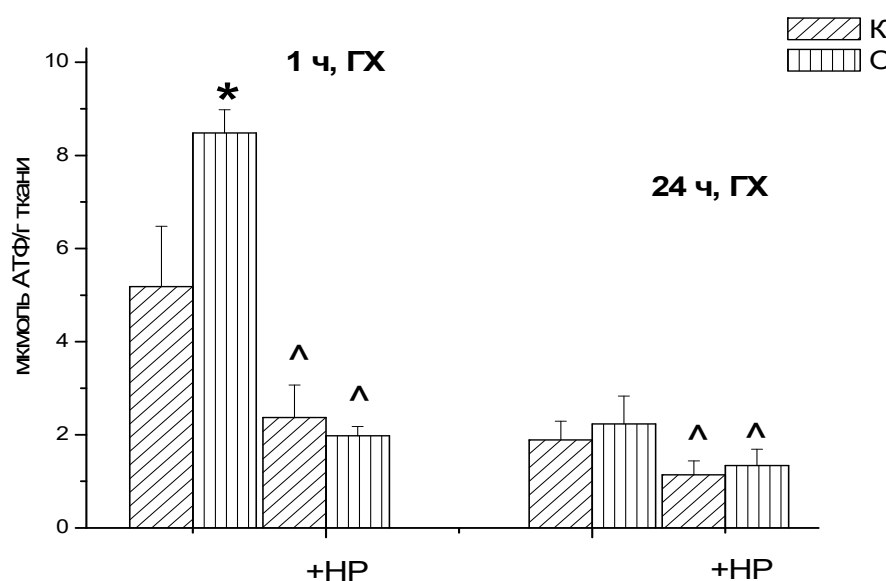


Рис. 3.20. Влияние ЭСФ на уровень АТФ в печени в ходе ГХ/НР (мкмоль/г ткани).

Примечания: * – достоверно относительно контрольной группы;

^ – достоверные отличия внутри группы; $p < 0,05$

Предобработка ЭСФ привела к значительному повышению ($165 \pm 10\%$ относительно контрольной группы) содержания АТФ на начальном этапе исследования (1 ч ГХ) (рис. 3.20). После 60 мин НР это изменение нивелировалось, уровень АТФ не отличался от контрольной группы. Увеличение срока хранения до 24 ч не повлияло на этот показатель, НР привела к дальнейшему его снижению, аналогично изменению в контрольной группе.

Следует отметить, что в ходе НР наблюдался различной степени отек ткани печени, что могло повлиять на соотношение ткань/жидкость в гомогенате печени,

использованном для определения содержания АТФ. Согласно стандартной методике [51] расчет осуществляется на влажный вес ткани, однако, содержание белка до и после реперфузии в гомогенате из одной печени во многих случаях отличалось в 1,5-1,7 раза ($p < 0,05$) (табл. 3.4). Кроме того, все остальные показатели в данной серии экспериментов стандартизировались по содержанию белка.

Таблица 3.4

Содержание белка в гомогенатах печени (разведение 1:4) в ходе ГХ, до и после НР,
мг белка/г ткани ($M \pm m$, $n = 5-7$)

1 ч ГХ	1 ч ГХ+НР	24 ч ГХ	24 ч ГХ+НР
Контрольная группа			
$290,8 \pm 19,4$	$191,2 \pm 16,6^{\wedge}$	$266,4 \pm 10,1$	$160,3 \pm 11,9^{\wedge}$
Опытная группа			
$250,2 \pm 28,7$	$176,0 \pm 26,1^{\wedge}$	$219,9 \pm 11,7$	$140,5 \pm 9,5^{\wedge}$

$\wedge$ - достоверные отличия внутри группы; $p < 0,05$

Действительно, при пересчете содержания АТФ относительно содержания белка были обнаружены отличия в динамике показателя в ходе ГХ/НР.

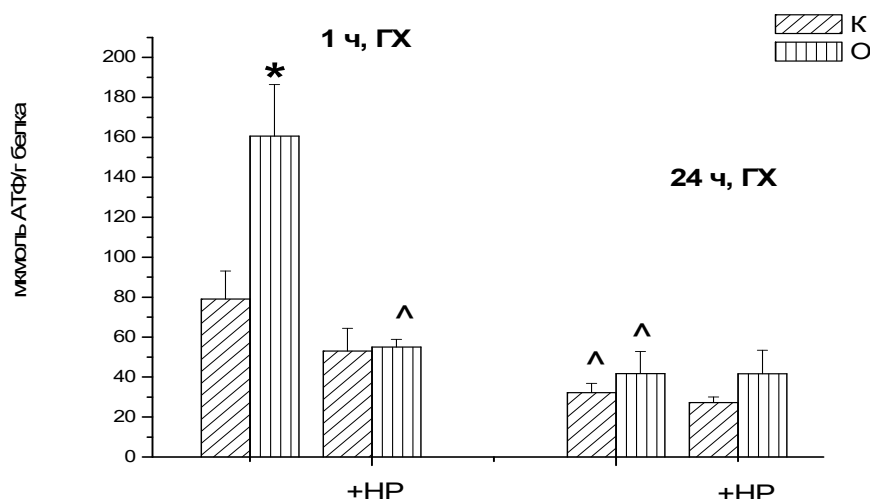


Рис. 3.21. Влияние ЭСФ на уровень АТФ в печени в ходе ГХ/НР.

Примечания: * — достоверно относительно контрольной группы;

$\wedge$ — достоверные отличия внутри группы; $p < 0,05$

Исходный уровень АТФ составлял $79,04 \pm 28,2$ мкмоль /г белка (рис. 3.20). После 1 ч ГХ/60 мин НР содержание АТФ не отличалось от исходного уровня. Продление сроков хранения до 24 ч приводило к достоверному снижению показателя ($60 \pm 10\%$ относительно 1 ч ГХ/60 мин НР). Последующая реперфузия не влияла на этот показатель.

Предобработка ЭСФ приводила к достоверному повышению содержания АТФ после 1 ч ГХ ($203 \pm 32\%$ по сравнению с контрольной группой ($p < 0,01$)). Через 60 мин НР уровень АТФ резко снижался (в 2,9 раза) и достигал значений контрольной группы. Продление сроков хранения вызывало дальнейшее уменьшение содержания АТФ, аналогично изменениям в контрольной группе (рис. 3.20).

Обнаруженные в работе различия в динамике показателя, зависящие от вида расчета, свидетельствуют о важности корректного методического подхода при анализе полученных данных. В случае ГХ/НР это особенно важно, так как в ходе проведения экспериментов орган подвергается различным манипуляциям, что не может не повлиять на качество проводимой реперфузии. Согласно данным Schemmer P. et al. [200], точность выполнения всех процедур при выделении, ГХ и НР печени оказывает значительное влияние на степень свободнорадикального повреждения и снижения уровня АТФ в печени. В ходе ГХ печени происходит изменение проницаемости мембран клеток печени, что является причиной нарушения ионного гомеостаза, что в свою очередь, приводит к набуханию клеток [133]. При НР данный процесс усиливается, наблюдается значительный отек органа с повышением влажного веса вплоть до 140% по сравнению с этапом ГХ [49]. Для предупреждения набухания в состав консервирующих растворов вводят непроницающие компоненты, такие как сахароза, лактобионат [27, 49, 186], которые вымываются в ходе НР, что способствует быстрому отеку ткани печени.

Показано падение содержания АТФ в ходе ГХ/НР при использовании различных консервирующих сред и сроков хранения. Через 1 ч холодового хранения печени в растворе UW уровень АТФ снижается до 50-60%. НР после краткосрочного охлаждения органа позволяет полностью восстанавливать или в какой-то мере повышать уровень АТФ. Продление сроков ГХ до 24 ч приводит к

необратимым нарушениям синтеза АТФ и последующая реперфузия не позволяет восстановить пул макроэргов [27, 29, 49]. В нашей работе снижение содержания АТФ после 1 ч ГХ/60 мин НР в контрольной группе наблюдается при расчете на влажный вес ткани, перерасчет на белок нивелирует такое изменение, что больше коррелирует с литературными данными. Достоверное снижение показателя при 24-часовом хранении также наблюдается только при расчете уровня АТФ относительно содержания белка.

Регуляция уровня АТФ в клетках печени тесно связана с прооксидантно-антиоксидантным равновесием. Известно, что снижение содержания АТФ в ходе ГХ происходит вследствие нарушения работы митохондрий, разобщения процессов дыхания и окислительного фосфорилирования и, как следствие, инактивации АТФ-синтазы [28, 29, 41, 134]. Наблюдается корреляция между степенью повреждения митохондрий и уровнем АТФ [164, 193, 197]. Изменение проницаемости митохондриальной мембраны и активация ПОЛ при ишемии/реперфузии приводит к быстрому истощению пула GSH, высокий уровень которого необходим для нормальной работы митохондрий [243, 246]. Показано, что применение эфира GSH или его предшественников приводит к повышению уровня АТФ в ходе ГХ/НР путем стабилизации молекул АТФ-синтазы, содержащих тиоловые группы [114].

При ишемии/реперфузии печени показано уменьшение уровня АТФ и пула адениновых нуклеотидов, коррелирующее с накоплением продуктов их деградации – ксантина и гипоксантина, которые, в свою очередь, являются субстратами для ферментативного образования активных форм кислорода в клетках [162]. Кроме того, наблюдается значительное повышение содержания цАМФ, участвующего в работе аденилатциклазной сигнальной системы [193].

Следует отметить, что падение содержания АТФ в печени при ГХ/НР обусловлено сложной организацией и гетерогенным составом органа. Показано, что снижение уровня АТФ в ходе ГХ изолированных гепатоцитов является обратимым, последующая реинкубация клеток при 37 °С приводит к достоверному повышению этого показателя, до или даже выше интактного уровня. Такие изменения наблюдаются через 1, 24 и 48 ч ГХ изолированных гепатоцитов [29].

Важность клеточной кооперации при развитии повреждения подтверждается тем, что применение предшественников АТФ оказывает протекторное действие на развитие ишемически-реперфузионных повреждений клеток печени, в частности непаренхиматозных. Предобработка животных аденозином препятствует угнетению эндотелиальной формы NO-синтазы, что оказывает позитивное действие на состояние клеток печеночного синусоида, тем самым, снижая степень повреждения органа [203]. Ингибирование синтеза NO является губительным для клеток печени при ГХ/НР, в том числе вызывая резкое снижение содержания макроэргов, при этом повышение их уровня в печени после инфузии АТФ в липосомах не опосредуется NO [172]. Провоспалительные цитокины (ФНО α , ИЛ-1) угнетают синтез АТФ, в данном случае возможным медиатором является оксид азота [145]. Ростовые факторы принимают непосредственное участие в регуляции синтеза АТФ. Показано, что их удаление из клеток приводит к нарушению дыхательного контроля в митохондриях [113]. ЭФР стимулирует активность цикла трикарбоновых кислот, поставщика восстановительных эквивалентов для электрон-транспортной цепи митохондрий [189].

Наблюдаемое в работе резкое повышение, по сравнению с контрольной группой, уровня АТФ после 1 ч ГХ является косвенным подтверждением прямого действия компонентов ЦЭТ на функциональное состояние печени. Последующее нивелирование эффекта, вероятно, связано с осуществлением в ходе НР регуляции различных систем клетки. Такое изменение коррелирует с нормализацией работы САОЗ. Резкое угнетение индуцированного ПОЛ в опытной группе также может быть связано с высоким уровнем АТФ, так как ксантиноксидазная система должна испытывать недостаток в субстратах.

Большой расход АТФ в ходе НР после 1 ч ГХ в опытной группе может быть обусловлен несколькими факторами. Не исключена возможность индукции синтеза *de novo* молекул ферментов САОЗ, по крайней мере, стимуляции синтеза GSH при повышении активности γ -глутамилцистеинилсинтетазы. Однако, наиболее вероятным, является использование макроэргов при передаче сигналов цитокинов и ростовых факторов, в том числе для посттранскрипционной и посттрансляционной

регуляции активности ферментов САОЗ, которые в большинстве своем не деградируют на этом этапе эксперимента, а только инактивируются. Согласно современным представлениям регуляция регенерационных и репарационных процессов осуществляется именно на этих этапах [150]. Сигнальная трансдукция регуляторных молекул как через митоген-активируемые протеинкиназы, так и при взаимодействии с аденилатциклазной системой, требует наличия достаточного количества макроэргов. Наиболее распространенным способом регуляции ферментативной активности, является фосфорилирование и дефосфорилирование функционально активных аминокислотных остатков, для этого также требуется АТФ. Несмотря на снижение уровня АТФ в опытной группе, при увеличении сроков хранения здесь наблюдается нормальное прооксидантно-антиоксидантное состояние печени, что свидетельствует о некотором преувеличении роли АТФ в сохранении полноценной функциональной активности печени после деконсервации. Это мнение подтверждается некоторыми авторами, продемонстрировавшими высокую жизнеспособность органа и длительный срок выживаемости реципиентов после трансплантации печени с низким содержанием АТФ [161]. Многие процессы в клетках печени не являются АТФ-зависимыми, однако, считаются необходимыми для полноценного функционирования органа. Например, наблюдаемое при холодовом хранении угнетение биосинтеза белка в гепатоцитах, не предотвращается при повышении уровня АТФ [240]. Некоторые авторы подчеркивают более важную, чем у АТФ, роль в поддержании жизнеспособности НАДФН-редокс-потенциала, нарушение которого даже при высоком уровне АТФ может привести к гибели клетки [187, 230].

Анализ литературных данных показал, что основное внимание исследователей при ишемически-реперфузионных повреждениях печени привлекает функциональное состояние митохондрий, как главного источника макроэргов в клетках [28, 29]. Нарботка АТФ в процессе гликолиза считается недостаточной для поддержания пула высокоэнергетических соединений. Кроме того, анаэробный гликолиз представляется вынужденным фактором, приводящим к закислению рН в клетках печени при гипоксии [48, 133]. Мы позволили себе критически отнестись к

этому общепринятому мнению и приняли снижение pH как необходимую адаптацию клеток к стрессорному воздействию (угнетение лизосомальных гидролаз и протеаз, чаще всего имеющих нейтральный оптимум pH). Также показана эффективность применения субстратов гликолиза при ГХ/НР. Внесение фруктозо-1,6-бисфосфата – продукта фосфофруктокиназной реакции и аллостерического регулятора активности пируваткиназы, в раствор хранения UW улучшало сохранность печени. Действие осуществлялось путем контроля продукции провоспалительных цитокинов (ФНО α) и оксида азота клетками Купфера, а также поддержания их фагоцитирующей активности [128]. Применение фосфоенолпирувата, макроэрга и субстрата пируваткиназы, приводило к повышению уровня АТФ, пирувата, улучшению функционального состояния митохондрий. Реализация эффекта осуществлялась на начальном этапе реперфузии, после краткосрочного хранения органа [193].

Эмбриональные ткани характеризуются высокой устойчивостью к гипоксии, основным источником макроэргов в них является анаэробный гликолиз [39]. В связи с этим несомненно существует необходимость наличия ряда молекул, участвующих в регуляции процессов утилизации глюкозы. К ним относятся, в частности, ЭФР, инсулин и ИПФР-1,2, ИЛ-3 [75, 110]. Активация пируваткиназы и фосфофруктокиназы при участии ЭФР, инсулина и ИПФР осуществляется путем фосфорилирования функционально активного остатка тирозина [75]. Регуляция гликолиза при участии ИЛ-3 осуществляется при помощи других механизмов, в частности, путем изменения транспорта глюкозы. В присутствии ИЛ-3 клетки способны выживать даже при низком уровне клетки АТФ, реализация эффекта осуществляется при помощи индукции экспрессии антиапоптотического белка BCLx [110].

Опираясь на вышесказанное, были проведены эксперименты для оценки вклада гликолиза в повышение уровня АТФ после предобработки ЭСФ на этапе 1 ч ГХ. В качестве оптимального показателя мы выбрали один из ключевых ферментов гликолиза – пируваткиназу. Выбор обусловлен несколькими причинами, а в особенности тем фактом, что этот фермент является АТФ-генерирующим [238] и его

активность регулируется при участии ростовых факторов [75]. Важным моментом является разнообразие источников субстрата пируваткиназной реакции, фосфоенолпирувата. Это может быть как последовательное включение всех предшествующих этапов гликолиза, так и упрощенный путь при участии продукта пентозофосфатного пути, фосфодиоксиацетона. Этот путь кажется наиболее вероятным и энергетически более выгодным: адаптационная активация Г6ФДГ с одной стороны и отсутствие расхода АТФ на начальных этапах гликолиза с другой, служат подтверждением такому предположению. Кроме того, источником фосфоенолпирувата является глюконеогенез, который может активироваться в условиях высокой активности протеиназ и недостатке глюкозы в клетке в ходе ГХ/НР.

Полученные результаты свидетельствуют, что ГХ печени в течение 1 ч приводит к 2-кратному снижению пируваткиназной активности относительно интактного уровня в ($p < 0,01$) (табл. 3.5). Предобработка ЭСФ полностью нормализовала исследованный показатель, что демонстрирует значительный вклад гликолиза в повышение уровня АТФ в условиях предобработки животных ЭСФ.

Таблица 3.5

Влияние ЭСФ на пируваткиназную активность печени после 1 ч гипотермического хранения (нмоль АТФ/мг белка за 1 мин) ($M \pm m$, $n = 5$)

интактная группа	Контрольная группа	Опытная группа
$47,25 \pm 4,0$	$21,57 \pm 3,1$ *	$44,4 \pm 3,0$

* - достоверные отличия относительно интактной группы; $p < 0,01$

Можно утверждать, что частично нехватка макроэргов при краткосрочном ГХ компенсируется при помощи генерирующей энергию части гликолитического пути, а ЭСФ оказывают выраженное стимулирующее действие на интенсивность этого процесса. Высокая активность пируваткиназы при реоксигенации на начальных

этапах НР обеспечивает увеличение содержания пирувата, необходимого для нормализации функциональной активности митохондрий. Показано, что предобработка *in vivo* пируватом [209] или добавка его в среду гипотермического хранения [213], снижали степень элиминации аминотрансфераз и количество апоптотических клеток в печени в ходе ишемии/реперфузии.

Совокупность полученных данных свидетельствует, что 1 ч ГХ печени в сахарозно-солевом растворе приводит к повышению базального уровня ТБК-активных продуктов при нормальной скорости их накопления. Увеличение сроков хранения органа до 24 ч не влияет на исследованные показатели, однако, последующая НР приводит к усилению перекисных процессов. Наблюдаемое угнетение работы САОЗ коррелирует со степенью свободнорадикальных процессов, ГП оказалась более устойчивой по отношению к ГХ/НР, чем КАТ, хотя это может быть обусловлено недостатком лимитирующего активность ГП GSH, элиминировавшегося из клетки. Предобработка ЭСФ оказывает выраженное превентивное действие на перекисные процессы и состояние САОЗ. Представленные результаты свидетельствуют о краткосрочном, но выраженном стимулирующем эффекте предобработки ЭСФ на энергетическое состояние клеток печени после 1 ч ГХ, оцененного по уровню АТФ. При этом частичный вклад в поддержание пула макроэргов вносит повышение активности ключевого фермента гликолиза – пируваткиназы. Наблюдаемая на этом фоне нормализация прооксидантно-антиоксидантного баланса в печени свидетельствует о возможном положительном посттранскрипционном и посттрансляционном регуляторном воздействии ЭСФ на активности ферментов САОЗ путем реализации сигналов с вовлечением макроэргов. Такой краткосрочный эффект является достаточным для поддержания нормального функционального состояния печени при продлении сроков гипотермического хранения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Существующие методы гипотермического хранения печени направлены на создание консервирующих сред, способных, за счет сохранения ионного гомеостаза, препятствовать аутолизу клеток [186]. Кроме того, поддержание достаточного количества высокоэнергетических соединений обеспечивается путем добавления макроэргов или их предшественников [128, 172, 193]. Несмотря на успехи в разработке мультикомпонентных растворов, оптимальный срок хранения печени без выраженной потери жизнеспособности и функциональной активности находится в пределах 10-20 ч [80, 181, 186].

Высокий интерес исследователей к клеткам эмбрионального происхождения во многом обусловлен высоким содержанием в них ряда биологически активных соединений, стимулирующих биосинтетические процессы и обладающих выраженным иммуномодулирующим действием [39, 43]. Возможность применения бесклеточных фракций эмбриональных тканей в качестве предподготовки организма и печени к последующему гипотермическому хранению оставалась неизученной. В данной работе была осуществлена попытка оценить эффективность действия ЦЭТ на этапе подготовки донора. Представляло интерес предварительно изучить возможное влияние ЦЭТ и его зависимость от состава и сроков предобработки в системе *in vivo*. Острое токсическое поражение печени ТХМ является удобной моделью для оценки действия различных биологически активных соединений. При развитии ТХМ-индуцированного гепатита наблюдается ряд метаболических и функциональных нарушений, в частности сдвиг прооксидантно-антиоксидантного баланса.

Исследования показали, что однократное введение ТХМ сопровождалось гибелью 40% животных. У выживших наблюдалось значительное повреждение печени, проявлявшееся в многократном повышении аминотрансферазной активности, увеличении уровня ТБК-активных продуктов и значительном снижении содержания альбумина в сыворотке крови уже через сутки после отравления. Через

3-е суток указанные изменения сохранялись, кроме содержания альбумина, которое возвращалось к исходному уровню.

Предобработку животных ЦЭТ проводили за 4 и 24 ч до интоксикации. Введение ЭСФ предотвращало гибель животных. С целью выяснения столь мощного эффекта было исследовано действие ЦЭТ на течение ТХМ-индуцированного гепатита.

В условиях предобработки ЭСФ наблюдалось снижение трансаминазной активности и уровня ТБК-активных продуктов в сыворотке. Через 1 и 2-е суток после интоксикации 4-часовая предобработка, по сравнению с 24-часовой, оказывала более выраженное защитное действие в отношении элиминации аминотрансфераз, к третьим суткам различия отсутствовали.

Ранее в нашей лаборатории было показано, что введение эмбрионального экстракта за трое суток до острой интоксикации приводило к снижению содержания МДА только в 1-е сутки после отравления, в дальнейшем эффект отсутствовал [34]. Такое изменение, предположительно, было обусловлено краткосрочностью действия ЭСФ. Как показано в настоящей работе, в 1 и 2-е сутки после интоксикации снижение уровня ТБК-активных продуктов не зависело от сроков предобработки, через 3-е суток в 24-часовой группе значения повышались до контрольных, в 4-часовой – полностью нормализовались.

Наблюдаемое превентивное действие ЭСФ, вероятно, обусловлено повышением устойчивости клеток к действию ТХМ, что может реализоваться путем стабилизации мембран, а также стимуляции регенерационных и репаративных процессов в поврежденном органе.

Важным критерием оценки степени повреждения печени является прооксидантно-антиоксидантный баланс, нарушение которого наблюдается при развитии свободнорадикальных процессов. Через 3-е суток после интоксикации ТХМ наблюдалось увеличение базального уровня ТБК-активных продуктов и интенсивности индуцированного ПОЛ. При этом была снижена активность КАТ, ГП, ГР и Г6ФДГ. Это обусловлено ингибирующим действием активных форм кислорода, усилением протеолитических и угнетением биосинтетических

процессов, наблюдающихся при острой интоксикации ТХМ. Через 7 суток наблюдалась нормализация всех изученных на этом этапе показателей. Содержание GSH через трое суток после отравления находилось на исходном уровне, что может быть связано с индукцией его синтеза *de novo*.

Введение ЦЭТ за 4 ч до инициации гепатита приводило к нормализации базального уровня и скорости накопления ТБК-активных продуктов уже через 3-е суток после отравления. При этом активности КАТ, ГП, ГР восстанавливались полностью, а Г6ФДГ – частично. Содержание GSH не отличалось от интактных значений. Неполное восстановление активности Г6ФДГ на фоне исходных КАТ и ГР может быть обусловлено тем, что в клетках печени нехватку НАДФН частично могут компенсировать другие НАДФН-генерирующие системы [182].

Предобработка ЦЭТ за 24 ч до острой интоксикации ТХМ вызывала значительное угнетение интенсивности индуцированного ПОЛ, до значений, достоверно отличающихся от исходных. Это изменение сопровождалось повышением содержания GSH, тенденцией к увеличению активности КАТ, нормализацией активности ГП и Г6ФДГ и неполным восстановлением ГР. Неполное восстановление ГР активности в группе с 24-часовой предобработкой на фоне повышенного уровня GSH и исходной активности ГП может быть обусловлено усилением синтеза GSH *de novo*.

Совокупность полученных данных о прооксидантно-антиоксидантном состоянии печени после предобработки ЦЭТ демонстрирует его выраженное ингибирующее действие на процессы ПОЛ, которое, по-видимому, обусловлено положительной регуляцией активности ферментов САОЗ.

Результаты, полученные в группе с 24-часовой предобработкой, могут свидетельствовать об усилении регенерационных процессов в печени, так как известно, что баланс между системами, генерирующими активные формы кислорода и нейтрализующими их, играет важную роль в регуляции процессов пролиферации и репарации [18]. В пользу этого свидетельствуют различия между показателями, зависящие от сроков предобработки, демонстрирующие различные этапы осуществления действия ЭСФ. Кроме того, более высокая степень повреждения

печени на ранних этапах после интоксикации, наблюдаемая при 24-часовом воздействии, должна вызывать гибель большего числа клеток, что является предпосылкой усиления собственного регенерационного ответа печени.

Многообразие биологически активных соединений, входящих в состав ЦЭТ, осложняет оценку вклада его отдельных компонентов в реализацию превентивного действия при острой интоксикации ТХМ. В связи с этим возникла необходимость изменить состав цитозольной фракции путем термической обработки для тепловой денатурации входящих в ее состав белков. В частности, выбранный метод используется для частичной очистки термостабильного фактора роста гепатоцитов (ТФРГ) [12], снижающего свободнорадикальное повреждение при ТХМ-индуцированном гепатите [163] и усиливающего регенерационный ответ печени путем стимуляции биосинтетических процессов [156]. Экспрессия гена ТФРГ показана в эмбриональных тканях [124].

Введение ТСФ за 4 ч до интоксикации ТХМ предотвращало гибель животных. Предобработка ТСФ вызывала снижение аминотрансферазной активности сыворотки крови относительно контрольной группы на всех этапах эксперимента. Однако, ТСФ была менее эффективна, чем ЦЭТ, в отношении АСТ – на всех этапах исследования, АЛТ – через 1 и 2-е суток после интоксикации. Содержание ТБК-активных продуктов в сыворотке после предобработки ТСФ, в 1 и 2-е сутки было ниже, чем в контрольной группе. К 3-м суткам показатель достигал контрольных значений, в отличие от ЦЭТ-группы, где уровень МДА полностью нормализовался.

Предобработка ЭСФ, независимо от состава, приводила к повышению содержания альбумина в сыворотке крови, в 1 и 2-е сутки после интоксикации. Отсутствие отличий между действием ЦЭТ и ТСФ на содержание альбумина в сыворотке интоксигированных животных, может быть обусловлено тем, что реализация эффектов ЦЭТ и ТСФ происходит разными путями либо выделение термостабильных субстанций позволяет наблюдать эффекты, которые не реализуются при комплексном воздействии ЦЭТ.

Предварительное введение ТСФ приводило к полной нормализации базального уровня и скорости накопления ТБК-активных продуктов в печени через

3-е суток после интоксикации. При этом повышалась активность ферментов САОЗ относительно контрольного уровня, но КАТ и ГП не достигали исходных значений. Наблюдаемые изменения на фоне нормальной активности Г6ФДГ могут свидетельствовать о действии ТСФ на неферментативное звено САОЗ. Для пополнения пула низкомолекулярных скавенджеров свободных радикалов, в частности GSH, необходим НАДФН, генерируемый в Г6ФДГ реакции. Повышение уровня альбумина в условиях предобработки ЭСФ, в 1 и 2-е сутки после интоксикации может вносить существенный вклад в поддержание пула GSH в печени [76], который участвует в работе САОЗ как неэнзиматически, так и ферментативно.

Исследования с применением ТСФ показали, что превентивный эффект ЦЭТ обусловлен не отдельными его ингредиентами, а комплексным разнонаправленным действием на метаболические процессы в печени. Предобработка ЦЭТ является более эффективной в реализации ранних защитных механизмов, о чем свидетельствует динамика развития ТХМ-индуцированного гепатита.

Результаты, полученные в ходе экспериментов на модели ТХМ-индуцированного гепатита, свидетельствовали о выраженном, быстро реализующемся, гепатопротекторном действии ЦЭТ, что позволило предположить перспективность его применения для предобработки животных перед гипотермическим хранением печени. Как максимально проявившее свое действие при острой интоксикации ТХМ, было выбрано 4-часовое предварительное введение ЦЭТ.

Гипотермическое хранение печени в сахарозо-содержащем растворе даже в течение 1 ч приводило к некоторому повышению трансаминазной активности перфузата в ходе 60 мин НР. На данное изменение не влияло продление срока хранения до 24 ч. Резкое усиление элиминации аминотрансфераз происходило в течение последних 30 мин НР. Предобработка ЭСФ не влияла на уровень АЛТ, в то время как активность АСТ в опытной группе была ниже по сравнению с контрольной группой. Учитывая, что АСТ, в отличие от АЛТ, на 40% локализована в митохондриях, можно предположить, что реализация действия ЭСФ каким-то

образом связана с поддержанием стабильности мембран и функциональной активности этих органоидов.

Уже через 1 ч ГХ наблюдалось повышение базального уровня ТБК-активных продуктов в печени. На это изменение не влияла ни НР, ни увеличение сроков ГХ до 24 ч. Скорость накопления ТБК-активных продуктов оставалась на исходном уровне, исключая последний этап эксперимента (24 ч ГХ/60 мин НР), на котором этот показатель повышался.

Такие изменения обусловлены, вероятно, активацией различных систем генерации активных форм кислорода, которые зависят от длительности ГХ. Показано, что на ранних этапах ГХ и НР, основной вклад вносят внутриклеточные прооксидантные системы, в частности, ксантиноксидазная и митохондриальная. При увеличении сроков хранения происходит активация непаренхиматозных клеток печени, что приводит к развитию экстрацеллюлярных свободнорадикальных процессов [73].

После 1 ч ГХ наблюдалось угнетение работы ферментов САОЗ, КАТ и ГР, а также тенденция к снижению ГП и Г6ФДГ активности. Последующая НР, равно как и продление сроков хранения, не влияли на эти показатели, за исключением активности Г6ФДГ, которая снижалась после 1 ч ГХ/60 мин НР. Угнетение активности ферментов САОЗ на ранних этапах ГХ/НР обусловлено их инактивацией, наибольшей чувствительностью обладает КАТ [117, 212]. ГП и Г6ФДГ менее подвержены повреждающему действию охлаждения. Кроме того, при увеличении срока ГХ наблюдается протеолиз существующих молекул ферментов САОЗ и деградация их мРНК [117, 212], что на фоне угнетения биосинтетических процессов [240], является достаточной предпосылкой для снижения энзиматической активности.

Предобработка ЭСФ приводила к нормализации базального уровня ТБК-активных продуктов в печени на всех этапах эксперимента. Интенсивность индуцированного ПОЛ была значительно ниже исходного уровня, исключая 24 ч ГХ/60 мин НР, когда данный показатель возвращался к интактным значениям. Введение ЭСФ полностью нормализовало КАТ и ГР активность, достоверно

повышало ГП активность на всех этапах эксперимента; не влияло на Г6ФДГ, кроме периода 1 ч ГХ/60 мин НР, на котором активность фермента повышалась.

Нормализация активности ферментов САОЗ может быть, в частности, обусловлена стабилизацией мембран клеток печени под действием ЭСФ. Показано изменение ультраструктуры пероксисом, в которых локализуется КАТ, под действием ГХ [117]. Не исключается возможность положительной регуляции активности ферментов САОЗ компонентами ЦЭТ, в первую очередь, путем предупреждения их инактивации и последующей деградации.

Основным источником активных форм кислорода в ходе ГХ/НР считается ксантиндегидрогеназно-оксидазная система, накопление субстратов которой (гипоксантина и ксантина) происходит в ходе ГХ [148]. Эти соединения образуются в результате деградации адениновых нуклеотидов, в частности АТФ, в клетках печени [42]. Известно, что нарушение функции митохондрий в ходе ГХ/НР является причиной снижения содержания макроэргов [41, 133]. В связи с этим представлялось целесообразным оценить влияние ЭСФ на содержание АТФ в печени при ГХ/НР.

60 мин НР после 1 ч ГХ не повлияло на содержание АТФ в печени, которое значительно снижалось при продлении сроков хранения до 24 ч. Предобработка ЭСФ приводила к резкому повышению уровня АТФ после 1 ч ГХ, который в ходе последующей НР падал до значений контроля. В дальнейшем динамика была аналогична контрольной группе. Такое изменение может служить косвенным подтверждением прямого действия компонентов ЦЭТ на функциональное состояние печени, оно коррелирует с нормализацией работы САОЗ. Резкое угнетение индуцированного ПОЛ в опытной группе также может быть связано с высоким уровнем АТФ, так как ксантинооксидазная система должна испытывать недостаток в субстратах. Падение уровня АТФ в ходе НР, вероятно, обусловлено его использованием в передаче сигналов компонентами ЦЭТ, так как фосфорилирование является наиболее распространенным способом сигнальной трансдукции и регуляции активности различных систем клетки.

В ходе ГХ основным источником макроэргов является анаэробный гликолиз. Полученные результаты вызвали необходимость оценить возможный вклад этого метаболического пути в поддержание уровня АТФ под действием ЭСФ. На этапе 1 ч ГХ была изучена активность ключевого, АТФ-генерирующего фермента гликолиза – пируваткиназы. Установлено, что в контрольной группе после 1 ч ГХ происходило значительное снижение пируваткиназной активности, которую полностью восстанавливала предобработка ЭСФ. Таким образом, можно утверждать, что частичный вклад в повышение уровня АТФ вносит гликолитический путь. Нормальная активность пируваткиназы при реоксигенации должна положительно влиять на соотношение пируват/лактат, что является дополнительным стимулом для нормальной функции митохондрий.

Эффективность предобработки, наблюдаемая в данной работе, обусловлена большим количеством биологически активных соединений, входящих в состав ЦЭТ. Показано присутствие в эмбриональных тканях целого ряда белков и пептидов, обладающих выраженным анаболическим, иммуномодулирующим и противовоспалительным действием, таких как: ФРГ, ТФРГ, ЭФР, ФРФ, ИЛ-1, 1, 3, 4, 6, 10, 13; ТФР α и β , инсулин и ИПФР, ФНО α и многие другие [124, 167, 179, 202]. Сигнальная трансдукция под действием этих факторов в основном, является рецептор-опосредованной и осуществляется при участии митоген-активируемых протеинкиназ и ряда транскрипционных факторов, в частности NF κ B, AP-1, STAT-семейств, проявляющих высокую чувствительность к прооксидантно-антиоксидантному статусу клеток [97, 136].

Выраженное нормализующее действие ЭСФ на прооксидантно-антиоксидантное равновесие в клетках печени, по-видимому, обусловлено положительной регуляцией активности ферментов САОЗ, что, в частности, может быть опосредовано модуляцией профиля провоспалительных цитокинов, которые принимают активное участие в регуляции баланса между активными формами кислорода и системами, их нейтрализующими.

Полученные результаты свидетельствуют, что цитозольные фракции эмбриональных тканей оказывают выраженное гепатопротекторное действие при

развитии поражения печени, сопровождающегося усилением свободнорадикальных процессов и изменением цитокинового профиля в органе, независимо от этиологии повреждения и являются эффективным способом подготовки организма в целом и печени в частности к последующему стрессорному воздействию.

ВЫВОДЫ

1. В диссертационной работе представлено теоретическое, экспериментальное обобщение и новое решение научной проблемы, касающейся снижения степени повреждения печени в ходе длительного гипотермического хранения путем предварительной обработки крыс цитозольными фракциями эмбриональных тканей.
2. Предварительное введение цитозольных фракций эмбриональных тканей ослабляет токсическое действие тетрахлорметана, что проявляется в предотвращении гибели животных, снижении аминотрансферазной активности, уровня ТБК-активных продуктов и повышении содержания альбумина в сыворотке крови. Выраженность действия зависит от сроков предобработки и состава фракций.
3. Введение термостабильной фракции цитозоля эмбриональных тканей нормализует в печени перекисные процессы, глутатионредуктазную и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназную активности, на фоне неполного восстановления глутатионпероксидазной и каталазной активности.
4. Введение цитозоля эмбриональных тканей за 4 ч до интоксикации тетрахлорметаном оказывает нормализующее действие на интенсивность перекисных процессов и активность ферментов системы антиоксидантной защиты в печени крыс, а предобработка за 24 ч значительно ингибирует интенсивность индуцированного ПОЛ в печени, что сопровождается тенденцией к повышению активности каталазы и содержания восстановленного глутатиона на фоне неполного восстановления активности глутатионредуктазы.

По совокупности всех изученных параметров оптимальной является 4- часовая предобработка животных.

5. Предобработка крыс цитозолем эмбриональных тканей за 4 ч до изоляции органа снижает степень повреждения печени после 24 ч гипотермического хранения, оцененную в ходе нормотермической реперфузии органа.

6. Введение цитозоля эмбриональных тканей приводит к значительному угнетению интенсивности Fe^{2+} -аскорбат-индуцированного ПОЛ и нормализации базального уровня ТБК-активных продуктов и активности каталазы, глутатионредуктазы, глутатионпероксидазы после 1 и 24 ч гипотермического хранения печени крыс.
7. Защитное действие предобработки на прооксидантно-антиоксидантное равновесие печени в ходе гипотермического хранения сопровождается кратковременным повышением уровня АТФ и стимуляцией гликолиза, оцененного по активности пируваткиназы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абакумова О.Ю., Куценко Н.Г., Федорова Л.М. и др. Стимуляция процессов регенерации и коррекция функциональной активности печени при ее частичной резекции и токсических поражениях // Вест. РАМН. – 1996. – т. 5. – С. 36-41.
2. Абдулаев Н.Х., Каримов Х.Я. Печень при интоксикации гепатотропными ядами. - Ташкент: «Медицина», 1989. – 96с.
3. Абелев Г.И. α -фетопротеин (биология) // Вест. РАМН. – 2001. – № 9. – С. 77-83.
4. Андреева Л.Н. Модификация метода определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой // Лаб. дело. – 1988. – № 11. – С. 41-43.
5. Арутюнян А.В., Дубинина Е.Е., Жибина Н.Н. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма. Спб.: ИКС «Фолиант», 2000. – 200 с.
6. Баталов А.Н., Эберт Л.Я., Димов П.Г., Пышкин С.А. Влияние трансплантации фетальных тканей на репаративные процессы при экспериментальном циррозе печени // БЭБиМ. – 2000. – т. 130, № 8. – С. 216-219.
7. Белоус А.М., Бондаренко В.А. Структурные изменения биологических мембран при охлаждении. – Киев: Наукова думка, 1982. – 256 с.
8. Блюгер А.Ф., Карташова О.Я. Моделирование патологических процессов в печени // Экспериментальная патология печени. – Рига: Зинатне. – 1983. – С. 7-16.
9. Бондаренко Л.Б., Бышовец Т.Ф., Сайфетдинова Г.А. Некоторые биохимические показатели при токсическом гепатите // Биополимеры и клетка. – 1999. – т. 15, № 1. – С. 12-17.
10. Вешеровский А.И., Головина Е.Л., Буркова В.Н., Сократиков А.С. Энтеросорбенты усиливают гепатозащитное действие эплира при экспериментальном токсическом гепатите // Эксп. и клин. фармакология. – 2001. – т. 64, № 1. – С. 46-48.
11. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. – М.: Наука, 1972. – 252 с.

12. Гальперин Э.И., Абакумова О.Ю., Платонова Л.В. и др. Термостабильный фактор роста гепатоцитов и энергетический обмен после частичной гепатэктомии у крыс // БЭБиМ. – 1999. – т. 127, № 1. – С. 53-56.
13. Герасимова О.О. Експериментальне дослідження впливу на процеси вільнорадикального окислення нового гепатопротектора піфламину // Мед. хімія. – 2001. – т. 3, № 1. – С. 44-47.
14. Гонский Я.И., Корда М.М., Клищ И.М., Фира Л.С. Роль антиоксидантной системы в патогенезе токсического гепатита // Патол. физиол. эксп. тер. – 1996. – № 2. – С. 43-45.
15. Гонський Я.І., Корда М.М., Кліщ І.М. Стан вільнорадикального окислення і антиоксидантової системи у щурів з токсичним ураженням печінки; вплив – токоферолу й диметилсульфоксиду // Укр. біохім. журн. – 1991. – т. 63, № 5. – С. 112-116.
16. Грищенко В.И., Гольцев А.Н. Трансплантация продуктов эмбриофетоплацентарного комплекса. От понимания механизма действия к повышению эффективности применения // Проблемы криобиологии. – 2002. – № 1. – С. 54-84.
17. Губский Ю.И., Левицкий Е.Л., Примаков Р.Г. и др. Влияние витамина Е на структурно-функциональную организацию хроматина печени в условиях повреждения тетрахлорметаном // Биополимеры и клетка. – 1993. – т. 9, № 3. – С. 27-34.
18. Дубинина Е.Е. Роль активных форм кислорода в качестве сигнальных молекул в метаболизме тканей при состояниях окислительного стресса // Вопр. мед. химии. – 2001. – т. 47, № 6. – С. 561-581.
19. Дубовая Т.К., Цибулевский А.Ю., Деев А.И. и др. Связывающая способность сывороточного альбумина крыс в условиях интоксикации тетрахлорметаном и введения антиоксидантов, антилипоксантов и актопротекторов // БЭБиМ. – 1996. – т. 122, № 12. – С. 635-637.

20. Ершова О.Н., Головенко Н.Я., Галкин Б.Н. Восстановление порфиринами содержания и активности цитохрома Р-450 после повреждения микросомальной мембраны тетрахлорметаном // Укр. біохім. журн. – 1993. – т. 65, № 3. – С. 111-113.
21. Кліщ І.М. Особливості перебігу окисно-відновних процесів у печінці щурів різного віку за умов токсичного ураження тетрахлорметаном // Укр. біохім. журн. – 1998. – т. 70, № 6. – С.23-30.
22. Коваленко О.А., Тарасова Н.И., Микоян В.Д., Ванин А.Ф. CCl_4 как индуктор L-аргининзависимого синтеза NO // БЭБиМ. – 1996. – № 4. – С. 414-416.
23. Колесниченко Л.С., Кулинский В.И., Манторова Н.С., Шапиро Л.А. Влияние фенобарбитала, ионола и сАМР на активность ферментов метаболизма глутатиона у грызунов // Укр. біохім. журн. – 1990. – т. 62, № 4. – С. 60-66.
24. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16-19.
25. Костюк В.А. Роль ковалентного связывания и ПОЛ в повреждении печени четыреххлористым углеродом // Биохимия. – 1991. – т. 56, № 10. – С. 1878-1885.
26. Костюк В.А., Потапович А.И., Маслова Г.Т. Состояние антиокислительной защитной системы печени при воздействии четыреххлористого углерода // УБЖ. – 1992. – т. 64, № 3. – С. 111-115.
27. Кравченко Л.П., Белоус А.М., Шанина И.В. Длительное холодовое хранение печени в системе *in vivo* и *in vitro* // Проблемы криобиологии. – 1998. – № 3. – С. 39-41.
28. Кравченко Л.П., Петренко А.Ю., Сомов А.Ю., Фуллер Б.Д. Дыхательная активность изолированных гепатоцитов при длительном холодовом хранении и последующей нормотермической инкубации // Проблемы криобиологии. – 2001. – № 1. – С. 15-19.
29. Кравченко Л.П., Семенченко О.А., Фуллер Б.Д. Уровень АТФ в изолированных гепатоцитах на этапах холодового хранения в различных средах // Проблемы криобиологии. – 2001. – № 2. – С. 56-60.

30. Кулинский В.И., Колесниченко Л.С. Структура, свойства, биологическая роль и регуляция глутатионпероксидазы // Усп. совр. биол. – 1993. – т. 113, № 1. – С. 107-122.
31. Оболенская М.Ю. Сигнальные молекулы в регенерирующей печени // Биополимеры и клетка. – 1998. – т. 14, № 3. – С. 210-222.
32. Окислительно-антиоксидантный гомеостаз в норме и патологии / Барабой В.А., Сутковой Д.А.; под общ. ред. Зозули Ю.А. – Киев: Наук. Думка, 1997. – 420 с.
33. Отримання цитозолу ембріональних та фетальних тканин та їх клінічне застосування: Метод. рекомендації / В.І. Грищенко, О.С. Снурніков, О.Ю. Петренко та ін./ Харків, 2000. – 10 с.
34. Оченашко О.В. Влияние трансплантации криоконсервированных клеток эмбриональной печени на перекисное окисление липидов и восстановительные процессы у крыс с печеночной недостаточностью. Автореф. дисс...канд. биол. наук: 03.00.19/ Ин-т проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины. – Харьков, 2003. – 19 с.
35. Пат. 57680 А (Україна) МПК⁷ А01№ 1/02. Середовище для гіпотермічного зберігання ізольованої печінки / О.А. Семенченко, І.В. Шаніна, О.Ю. Петренко. Заявлено 05.11.2002. Публ. 16.06.2003. Бюл. № 6.
36. Пашинский П.П. Влияние криоконсервированных фетальных препаратов и сроков их хранения на биохимические процессы при ОПН // Проблемы криобиологии. – 2000. – № 4. – С. 76-82.
37. Петренко А.Ю., Оченашко О.В. Влияние препаратов эмбриональных тканей человека на интенсивность ПОЛ при остром токсическом гепатите у крыс // Проблемы криобиологии. – 2001. - № 2. – С. 66-71.
38. Путилина Ф.Е. Определение содержания восстановленного глутатиона в тканях / Методы биохим. исслед. Под редакцией М.И. Прохоровой. – Л.: Изд-во Ленинград. ун-та, 1982. – С. 183-185.
39. Репин В.С., Сухих Г.Т. Медицинская клеточная биология. – М., РАМН: БЭБиМ, 1998. – 200 с.

40. Скакун Н.П., Писько Г.Т., Мосейчук И.П. Поражение печени четыреххлористым углеродом – М., НИИТЭХИМ, 1989. – 94 с.
41. Сомов А.Ю. Чувствительность системы окислительного фосфорилирования к гипотермическому хранению печени // Проблемы криобиологии. – 2002. - № 1. – С. 129.
42. Сумбаев В.В., Розанов А.Я. Ксантинооксидаза как компонент системы генерирования активных форм кислорода // Суч. пробл. токсикол. – 2001. – № 1. – С. 10-16.
43. Сухих Г.Т., Штиль А.А. Трансплантация эмбриональных гепатоцитов: экспериментальное обоснование нового подхода к лечению недостаточности печени // БЭБиМ.– 2002. – т. 134, № 12. – С. 604-610.
44. Тараковский М.Л., Цыпкун А.Г., Сергеев В.П. и др. Эффективность энтеросорбентов и механизмы детоксикации при моделированном гепатите у неполовозрелых крыс // Физиол. журн. – 1991. – т. 37, № 6. – С. 48-55.
45. Тефтьюєва Н.Б., Яремій І.М., Григор'єва Н.П. Вплив настоянки перстачу прямостоячого на глутатионову систему печінки щурів за умов токсичного гепатиту // Мед. хімія. - 2001. – т. 3, № 4. – С. 52-55.
46. Ушаков В.Ф., Палиенко Л.А., Лившиц К.И. и др. Состояние клеточной поверхности гепатоцитов при действии четыреххлористого углерода / / Архив анатомии, гистологии и эмбриологии. – 1990. - № 11. – С. 44-48.
47. Чернов Н.Н. Исследование глутатионредуктазы в печени крыс. Энзимология опухолей. – М.: Ун-т дружбы народов, 1979. – С. 96-101.
48. Чиркин А.А. Молекулярные механизмы повреждения печени / / Иммунология, инфектология, аллергология. – 2000. – № 1. – С. 5-12.
49. Шанина И.В. Гипотермическое хранение изолированных гепатоцитов и печени крыс в средах различного состава. Автореф. дисс...канд. биол. наук: 03.00.19/ Ин-т проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины. – Харьков, 2000. – 19 с.
50. Якунин Д. Ю., Мартынов М.Н. О феномене регуляции аланин и аспаратаминотрансфераз в крови человека // Бюлл. лабор. службы. – 2002. – № 10. – С. 5-8.

51. Adams H. Adenosine 5'-triphosphate determination with phosphoglycerate kinase: In Methods of enzymatic analysis. Ed. Bergmeyer H.U. – Academic Press, NY, 1963. – P. 539-543.
52. Adamson G.M., Billings R.E. Tumor necrosis factor induced oxidative stress in isolated mouse hepatocytes // Arch. Biochem. Biophys. – 1992. – Vol. 294, № 31. – P. 223-229.
53. Alexander B. The role of nitric oxide in hepatic metabolism // Nutrition. – 1998. – Vol. 14, № 4. – P. 376-390.
54. Ammon H.L., Murphy K.C., Bhattacharjee S.K. et al. Preliminary crystallographic study of glucose-6-phosphate dehydrogenase from rat liver // J. Mol. Biol. – 1983. – Vol. 171, № 2. – P. 233-236.
55. Amtmann E., Edde E., Sauer G., Westphal O. Restoration of the responsiveness to growth factors in senescent cells by an embryonic cell extract // Exp. Cell Res. – 1990. – Vol. 189, № 2. – P. 202-207.
56. An W., Liu X.J., Lei T.G. et al. Growth induction of hepatic stimulator substance in hepatocytes through its regulation on EGF receptors // Cell Research. – 1999. – Vol. 9, № 1. – P. 37-50.
57. Anand P., Boylan J.M., Ou Y., Gruppuso P.A. Insulin signaling during perinatal liver development in the rat // Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. – 2002. – Vol. 283, № 4. – P. E844-852.
58. Anderson M.E. Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation // Chem. Biol. Interact. – 1998. – Vol. 111-112. – P. 1-14.
59. Archambault A.J., Sirois M.G., Bernatchez P.N. et al. Vascular endothelial growth factor production by isolated rat hepatocytes after cold ischemia-warm reoxygenation // Liver Transpl. – 2001. – Vol. 7, № 11. – P. 988-997.
60. Arai S., Imamura M. Physiological role of sinusoidal endothelial cells and Kupffer cells and their implication in the pathogenesis of liver injury // J. Hepatobiliary Pancreat. Surg. – 2000. – Vol. 7, № 1. – P. 40-48.

61. Arai S., Monden K., Adachi Y. et al. Pathogenic role of Kupffer cell activation in the reperfusion injury of cold-preserved liver // *Transplantation*. – 1994. – Vol. 58, № 10. – P. 1072-1077.
62. Arosio B., Santambrogio D., Gagliano N., Annoni G. Changes in expression of the albumin, fibronectin and type 1 procollagen genes in CCl₄-induced liver fibrosis: effect of pyridoxol L,2-pyrrolidon-5 carboxylate // *Pharmacol. Toxicol.* – 1993. – Vol. 73, № 6. – P. 301-304.
63. Arosio B., Santambrogio D., Gagliano N. et al. Glutathione pretreatment lessens the acute liver injury induced by carbon tetrachloride // *Pharmacol. Toxicol.* – 1997. – Vol. 81, № 4. – P. 164-168.
64. Arrigo A.-P. Gene expression and thiol redox state // *Free Rad. Biol. Med.* – 1999. – Vol. 27, № 9-10. – P. 936-944.
65. Au S.W., Gover S., Lam V.M., Adams M.J. Human glucose-6-phosphate dehydrogenase: the crystal structure reveals a structural NADP(+) molecule and provides insights into enzyme deficiency // *Structure Fold Des.* – 2000. – Vol. 8, № 3. – P. 293-303.
66. Bailey S.M., Reinke L.A. Effect of flow ischemia-reperfusion injury on liver function // *Life Science*. – 2000. – Vol. 66, № 11. – P. 1033-1044.
67. Barle H., Rahlen L., Essen P. et al. Stimulation of human albumin synthesis and gene expression by growth hormone treatment // *Clin. Nutr.* – 2001. – Vol. 20, № 1. – P. 59-67.
68. Barnard M.L., Snyder S.J., Engerson T.D., Turrens J.F. Antioxidant enzyme status of ischemic and postischemic liver and ischemic kidney in rats // *Free Radic. Biol. Med.* – 1993. – Vol. 15, № 2. – P. 227-232.
69. Ben-Ari Z., Hochhauser E., Burstein I. et al. Role of anti-tumor necrosis factor-alpha in ischemic-reperfusion injury in isolated rat liver in a blood free environment // *Transplantation*. – 2002. – Vol. 73, № 12. – P. 1875-1880.
70. Bergmeyer H.U., Scheibe P., Wahlefeld A.W. Optimization of methods for aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase // *Clin. Chem.* – 1978. – Vol. 24, № 1. – P. 58-73.

71. Boll M., Weber L.W., Becker E., Stampfl A. Pathogenesis of carbon tetrachloride-induced hepatocyte injury bioactivation of CCl₄ by cytochrome P450 and effects on lipid homeostasis // *Z. Naturforsch.* – 2001. – Vol. 56, № 1-2. – P. 111-121.
72. Boros P., Tarcsafalvi A., Wang L. et al. Intrahepatic expression and release of vascular endothelial growth factor following orthotopic liver transplantation in the rat // *Transplantation.* – 2001. – Vol. 72, № 5. – P. 805-811.
73. Brass C.A., Roberts T.G. Hepatic free radical production after cold storage: Kupffer cell-dependent and –independent mechanisms in rats // *Gastroenterology.* – 1995. – Vol. 108, № 4. – P. 1167-1175.
74. Camargo C.A., Madden J.F., Gao W. et al. Interleukin-6 protects liver against warm ischemia/reperfusion injury and promotes hepatocyte proliferation in the rodent // *Hepatology.* – 1997. – Vol. 26, № 6. – P. 1513-1520.
75. Canesi L., Ciacci C., Betti M. et al. Growth factors stimulate the activity of key glycolytic enzymes in isolated digestive gland cells from mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lam.) through tyrosine kinase mediated signal transduction // *Gen.Comp.Endocrinol.* – 1999. – Vol. 116, № 2. – P. 241-248.
76. Cantin A.M., Paquette B., Richter M., Larivee P. Albumin-mediated regulation of cellular glutathione and nuclear factor kappa B activation // *Am.J.Respir.Crit.Care Med.* – 2000. – Vol. 162, № 4. – 1539-1546.
77. Capovilla A., Arbuthnot P. Nucleotide excision repair by extracts of human fetal hepatocytes // *FEBS Letters.* – Vol. 518, № 1-3. – P. 144-147.
78. Carlberg I., Mannervik B. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver // *Jour. Biol. Chem.* – 1975. – Vol. 250, № 14. – P. 5475-5480.
79. Chan E.D., Riches D.W.H., White C.W. Redox paradox: Effect of n-acetylcysteine and serum on oxidation reduction-sensitive mitogen-activated protein kinase signaling pathways // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* – 2001. – Vol. 24, № 5. – P. 627-632.
80. Churchill T., Mitchell S.J., Fuller B.J. Metabolic considerations of histidine-based solutions for liver storage // *Transplant. Proceed.* – 1995. – Vol. 27. – P. 2859-2860.

81. Cighetti G., Debiasi S., Paroni R. No documentable role for xanthine oxidase in the pathogenesis of hepatic in vivo ischaemia/reperfusion injury // *Pharmacol. Res.* – 1994. – Vol. 30, № 3. – P. 243-251.
82. Coe J.P., Rahman I., Sphyris N. et al. Glutathione and p53 independently mediate responses against oxidative stress in ES cells // *Free Radic. Biol. Med.* – 2002. – Vol. 32, № 2. – P. 187-196.
83. Cuzzocrea S., Reiter R.J. Pharmacological action of melatonin in shock, inflammation and ischemia/reperfusion injury // *Eur. J. Pharmacol.* – 2001. – Vol. 426, № 1-2. – P. 1-10.
84. Czaja M.J., Xu J., Alt E. Prevention of carbon tetrachloride-induced rat liver injury by soluble tumor necrosis factor receptor // *Gastroenterology.* – 1995. – Vol. 108, № 6. – P. 1849-1854.
85. Davis F.C. Melatonin: role in development // *J. Biol. Rhythms.* – 1997. – Vol. 12, № 6. – P. 498-508.
86. Deaciuc I.V., D'Souza N.B., Burikhanov R. et al. Epidermal growth factor protects the liver against alcohol-induced injury and sensitization to bacterial lipopolysaccharide // *Alcohol. Clin. Exp. Res.* – 2002. – Vol. 26, № 6. – P. 864-874.
87. De Bleser P.J., Xu G., Rombouts K. et al. Glutathione levels discriminate between oxidative stress and transforming growth factor-beta signaling in activated rat hepatic stellate cells // *J. Biol. Chem.* – 1999. – Vol. 274, № 48. – P. 33881-33887.
88. Debonera F., Aldeguer X., Shen X. et al. Activation of interleukin-6/STAT3 and liver regeneration following transplantation // *J. Surg. Res.* – 2001. – Vol. 96, № 2. – P. 289-295.
89. Decker K. The response of liver macrophages to inflammatory stimulation // *Keio J. Med.* – 1998. – Vol. 47, № 1. – P. 1-9.
90. Deguchi M., Shiraki K., Inoue H. et al. Expression of survivin during liver regeneration // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2002. – Vol. 297, № 1. – P. 59.
91. Domenicotti C., Paola D., Vitali A. et al. Glutathione depletion induces apoptosis of rat hepatocytes through activation of protein kinase C novel isoforms and dependent increase in AP-1 nuclear binding // *Free Rad. Biol. Med.* – 2000. – Vol. 29, № 12. – P. 1280-1290.

92. Dudley D.J., Collmer D., Mitchell M.D., Trautman M.S. Inflammatory cytokine mRNA in human gestational tissues: implications for term and preterm labor // J. Soc. Gynecol. Investig. – 1996. – Vol. 3, № 6. – P.328-335.
93. Dunne J.B., Davenport M., Williams R. et al. Evidence that S-adenosylmethionine and n-acetylcysteine reduce injury from sequential cold and warm ischemia in the isolated perfused rat liver // Transplantation. – 1994. – Vol. 57, № 8. – P. 1161-1168.
94. Esposito L.A., Kokoszka J.E., Waymire K.G. et al. Mitochondrial oxidative stress in mice lacking the glutathione peroxidase-1 gene // Free Rad. Biol. Med. – 2000. – Vol. 28, № 5. – P. 754-766.
95. Fan C., Zwacka R.M., Engelhardt J.F. Therapeutic approaches for ischemia/reperfusion injury in the liver // J. Mol. Med. – 1999. – Vol. 77. – P. 577-592.
96. Farquharson C., Milne J., Loveridge N. Mitogenic action of insulin-like growth factor-1 on human osteosarcoma MG-63 cells and rat osteoblasts maintained in situ: the role of glucose-6-phosphate dehydrogenase // Bone Miner. – 1993. – Vol. 22, № 2. – P. 105-115.
97. Fausto N. Liver regeneration // Hepatology. – 2000. – Vol. 32, № 1. – P. 19-31.
98. Feghali C.A., Wright T.M. Cytokines in acute and chronic inflammation // Front. Bioscience. – 1997. - № 2. – P. 12-26.
99. Fernandez-Checa J.C., Garcia-Ruiz C., Colell A. Cytokine-induced oxidative stress: origin, signaling and regulation // Int. Jour. Immunopharmacol. – 1998. – Vol. 20, № 4-5. – P. 125-139.
100. Fernandez-Checa J.C., Kaplowitz N., Garcia-Ruiz C., Colell A. Mitochondrial glutathione: importance and transport // Semin. Liv. Dis. – 1998. – Vol. 18, № 4. – P. 389-401.
101. Fisher R., Cariers A., Reinehr R., Haussinger D. Caspase 9-dependent killing of hepatic cells by activated Kupffer cells // Gastroenterology. – 2002. – Vol. 123, № 3. – P. 845-861.
102. Friedman S.L. Cytokines and fibrogenesis // Semin.Liv.Dis. – 1999. – Vol. 19, № 2. – P. 129-140.
103. Fukuda S., Pelus L.M. Regulation of the inhibitor of apoptosis family member survivin in normal cord blood and bone marrow CD34(+) cells by hematopoietic growth factors:

- implication of survivin expression in normal hematopoiesis // *Blood*. – 2001. – Vol. 98, № 7. – P. 2091-2100.
104. Fukuhara K., Suzuki M., Unno M. et al. The degree of hepatic regeneration after partial hepatectomy in rats with peritonitis and the role of lipid peroxidation // *Free Rad. Biol. Med.* – 1999. – Vol. 26, № 7-8. – P. 881-886.
 105. Ganea E, Harding JJ. Alpha-crystallin protects glucose 6-phosphate dehydrogenase against inactivation by malondialdehyde // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2000. – Vol. 1500, № 1. –P. 49-58.
 106. Garcia-Alfonso C., Martinez-Galisteo E., Llobell A. et al. Regulation of horse-liver glutathione reductase // *Int. J. Biochem.* – 1993. – Vol. 25, № 4. – P. 513-520.
 107. Geller D.A., Chia S.H., Takahashi Y. et al. Protective role of the L-arginine-nitric oxide synthase pathway on preservation injury after rat liver transplantation // *J. Parenter. Enteral Nutr.* – 2001. – Vol. 25. – P. 142-147.
 108. Giakoustidis D., Kontos N., Iliadis S. et al. Severe total hepatic ischemia and reperfusion: relationship between very high alfa-tocopherol uptake and lipid peroxidation // *Free Radic. Res.* – 2001. – Vol. 35, № 2. – P. 103-109.
 109. Glosli H., Tronstad K.J., Wergedal H. et al. Human TNF-alpha in transgenic mice induces differential changes in redox status and glutathione-regulating enzymes // *FASEB J.* – 2002. - Vol. 16, № 11. – P.1450-1452.
 110. Gonin-Giraud S., Mathieu A.L., Diocou S. et al. Decreased glycolytic metabolism contributes to but is not the inducer of apoptosis following IL-3-starvation // *Cell Death Differ.* – 2002. – Vol. 9, № 10. – P. 1147-1157.
 111. Gorczynski R.M., Bessler W.G., Chung S. et al. A fetal sheep liver extract reverses age-related increments in spontaneous and induced cytokine production by indirect environmental effects // *Immunology Letters*. – 1998. – Vol. 60, № 2-3. – P. 157-164.
 112. Gornall A.G., Bardawill C.J., David M.M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction // *J. Biol. Chem.* – 1949. – Vol.177. – P. 751-766.
 113. Gottlieb E., Armour S.M., Thompson C.B. Mitochondrial respiratory control is lost during growth factor deprivation // *Proc. Nat. Acad. Sci.* – 2002. – Vol. 99, № 20. – P. 12801-12806.

114. Grattagliano I., Vendemiale G., Lauterburg B.H. Reperfusion injury of the liver: role of mitochondria and protection by glutathione ester / / J.Surg.Res. – 1999. – Vol.86, № 1. – P.2-8.
115. Griffith O.W. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis / / Free Radic. Biol. Med. – 1999. – Vol. 27, № 9-10. – P. 922-935.
116. Grundmann R., Koebe H.G., Waters W. Transplantation of cryopreserved hepatocytes or liver cytosol injection in the treatment of acute liver failure in rats / / Res. Exp. Med. – 1986. – Vol. 186, № 2. - P. 141-149.
117. Gulati S., Singh A.K., Irazu C. et al. Ischemia-reperfusion injury: biochemical alterations in peroxisomes of rat kidney / / Arch. Biochem. Biophys. – 1992. – Vol. 295, № 1. – P. 90-100.
118. Gupta M., Dobashi K., Greene E.L. et al. Studies on hepatic injury and antioxidant enzyme activities in rat subcellular organelles following in vivo ischemia and reperfusion / / Mol. Cell. Biochem. – 1997. – Vol. 176, № 1-2. – P. 337-347.
119. Ha T.Z. Studies on the effect of liver cytosol on experimental acute hepatic failure in the rat / / Zhonghua Yi Xue Za Zhi. – 1989. – Vol. 69, № 5. – P. 267-270.
120. Haddad J.J., Safieh-Garabedian B., Saade N.E., Lauterbach R. Inhibition of glutathione-related enzymes augments LPS-mediated cytokine biosynthesis: involvement of an IkappaB/NF-kappaB-sensitive pathway in the alveolar epithelium / / Int. Immunopharmacol. – 2002. – Vol. 2, № 11. – P. 1567-1583.
121. Hara H., Uchida S., Yoshimura H. et al. Isolation and characterization of a novel liver-specific gene, hepassocin, upregulated during liver regeneration / / Biochim. Biophys. Acta. – 2000. – Vol. 1492, № 1. – P. 31-44.
122. Hato S., Urakami A., Yamano T. et al. Attenuation of liver and lung injury after hepatic ischemia and reperfusion by a cytokine-suppressive agent, FR167653 / / Eur. Surg. Res. – 2001. – Vol. 33, № 3. – P. 202-209.
123. Hayes J.D., McLellan L.I. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a coordinately regulated defence against oxidative stress / / Free Rad. Res. – 1999. – Vol. 31, № 4. – P. 273-300.

124. He F., Wu C., Tu Q., Xing G. Human hepatic stimulator substance: A product of gene expression of human fetal liver tissue // *Hepatology*. – 1993. – Vol. 17, № 2. – P. 225-229.
125. He Y., Zhou J., Dou K. Autocrine expression of hepatocyte growth factor and its cytoprotective effect on hepatocyte poisoning // *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. – 2002. – Vol. 82, № 4. – P. 275-278.
126. Hernandez-Minor R., Diaz-Munoz M., Lopez V. et al. Balance between oxidative damage and proliferate potential in an experimental rat model of CCl₄-induced cirrhosis: protective role of adenosine administration // *Hepatology*. – 1997. – Vol. 26, № 35. – P. 1100-1110.
127. Hines I.N., Kawachi S., Harada H. et al. Role of nitric oxide in liver ischemia and reperfusion injury // *Mol. Cell Biochem*. – 2002. – Vol. 234-235, № 1-2. – P. 229-237.
128. Hirokawa F., Nakai T., Yamaue H. Storage solution containing fructose-1,6-bisphosphate inhibits the excess activation of Kupffer cells in cold liver preservation // *Transplantation*. – 2002. – Vol. 74, № 6. – P. 779-783.
129. Hoshi H., Kan M., McKeehan W.L. Direct analysis of growth factor requirements for isolated human fetal hepatocytes // *In Vitro Cell Dev. Biol*. – 1987. – Vol. 23, № 10. – P. 723-732.
130. Iredale J.P. Hepatic stellate cell behavior during resolution of liver injury // *Semin. Liver Dis*. – 2001. – Vol. 21, № 3. – P. 427-436.
131. Isfort R.J., Cody D.B., Kerckaert G.A., LeBoeuf R.A. Growth factor responsiveness and alterations in growth factor homeostasis in Syrian hamster embryo cells during in vitro transformation // *Carcinogenesis*. – 1994. – Vol. 15, № 6. – P. 1203-1209.
132. Ishii T., Kim Y.U., Tatsuma T. et al. Immunodepressants ameliorate normothermic ischemia injury to the rat liver by down-regulating tumor necrosis factor, not by alleviation of lipid peroxidative injury // *Transpl. Int*. – 1994. – Vol. 7, № 1. – P. S507-511.
133. Jaeschke H. Preservation injury: mechanisms, prevention and consequences // *J. of Hepatology*. – 1996. – Vol. 25. – P. 774-780.
134. Jaeschke H. Reperfusion injury after warm ischemia or cold storage of the liver: role of apoptotic cell death // *Transplant. Proceed*. – 2002. – Vol. 34, № 7. – P. 2656-2658.

135. Jaeschke H., Ho Y.S., Fisher M.A. et al. Glutathione peroxidase-deficient mice are more susceptible to neutrophil-mediated hepatic parenchymal cell injury during endotoxemia: importance of an intracellular oxidant stress // *Hepatology*. – 1999. – Vol. 29, № 2. – P. 443-450.
136. Kaplowitz M.D. Biochemical and cellular mechanisms of toxic liver injury // *Semin Liver Dis.* – 2002. – Vol. 22, № 2. – P. 137-144.
137. Katayama T., Yokoyama S., Mitomi T., Watanabe K. Alterations in glutathione peroxidase activity following reperfusion injury to rat liver // *Tokai J. Exp. Clin. Med.* – 1997. – Vol. 22, № 2. – P. 33-44.
138. Kayanoki Y., Fujii J., Suzuki K. et al. Suppression of antioxidative enzyme expression by transforming growth factor-beta 1 in rat hepatocytes // *J. Biol. Chem.* – 1994. – Vol. 269, № 22. – P. 15488-15492.
139. Ke B., Shen X.D., Lassman C.R. et al. Interleukin-13 gene transfer protects rat livers from antigen-independent injury induced by ischemia and reperfusion // *Transplantation*. – 2003. – Vol. 75, № 8. – P. 1118-1123.
140. Kehrer J.P., Lund L.G. Cellular reducing equivalents and oxidative stress // *Free Radic. Biol. Med.* – 1994. – Vol. 17, № 1. – P. 65-75.
141. Kerkweg U., Li T., de Groot H., Rauen U. Cold-induced apoptosis of rat liver cells in University of Wisconsin solution: the central role of chelatable iron // *Hepatology*. – 2002. – Vol. 35, № 3. – P. 560-567.
142. Kim K.Y., Choi I., Kim S.S. Progression of hepatic stellate cell activation is associated with the level of oxidative stress rather than cytokines during CCl₄-induced fibrogenesis // *Mol. Cells*. – 2000. – Vol. 10, № 3. – P. 289-300.
143. Kirkman H.N., Ferraris M.R.-A., Gaetani G.F. Mechanisms of protection of catalase by NADPH: kinetics and stoichiometry // *J. Biol. Chem.* – 1999. – Vol. 274, № 20. – P. 13908-13914.
144. Kirsch J.D., Yi A.K., Spitz D.R., Krieg A.M. Accumulation of glutathione disulfide mediates NF-kappaB activation during immune stimulation with CpG DNA // *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* – 2002. – Vol. 12, № 5. – P. 327-340.

145. Kitade H., Kanemaki T., Sakitani K. et al. Regulation of energy metabolism by interleukin-1beta, but not by interleukin-6, is mediated by nitric oxide in primary cultured rat hepatocytes // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1996. – Vol. 1311. – P. 20-26.
146. Kmiec Z. Cooperation of liver cells in health and disease // *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.* – 2001. – Vol. 161, № 3-13. – P. 1-151.
147. Knolle P.A., Gerken G. Local control of the immune response in the liver // *Immunol. Rev.* – 2000. – Vol. 174. – P. 21-34.
148. Kobayashi H., Kurokawa T., Kitahara S. et al. The effects of gamma-glutamylcysteine ethyl ester, a prodrug of glutathione, on ischemia-reperfusion-induced liver injury in rats // *Transplantation.* – 1992. – Vol. 54, № 3. – P. 414-418.
149. Kobayashi H., Nonami T., Kurokawa T. et al. Changes in the glutathione redox system during ischemia and reperfusion in rat liver // *Scand. J. Gastroenterol.* – 1992. – Vol. 27, № 8. – P. 711-716.
150. Kren B.T., Steer C.J. Posttranscriptional regulation of gene expression in liver regeneration: role of mRNA stability // *FASEB J.* – 1996. – Vol. 10, № 5. – P. 559-573.
151. Kretzschmar M. Regulation of hepatic glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity // *Exp. Toxicol. Pathol.* – 1996. – Vol. 48, № 5. – P. 439-446.
152. Kusumoto K., Morimoto T., Minor T. et al. Allopurinol effects in rat liver transplantation on recovery of energy metabolism and free radical-induced damage // *Eur. Surg. Res.* – 1995. – Vol. 27, № 5. – P. 285-291.
153. Lee S.M., Park M.J., Cho T.S., Clemens M.G. Hepatic injury and lipid peroxidation during ischemia and reperfusion // *Shock.* – 2000. – Vol. 13, № 4. – P. 279-284.
154. Lee Y.G., Lee S.H., Lee S.M. Role of Kupffer cells in cold/warm ischemia-reperfusion injury of rat liver // *Arch. Pharm. Res.* – 2000. – Vol. 23, № 6. – P. 620-625.
155. Lemasters J.J., Thurman R.G. Reperfusion injury after preservation for transplantation // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* – 1997. – № 37. – P. 327-338.
156. Liakos A.A., Mykoniatis M.G., Kokala M.E. et al. Levels of hepatic stimulatory substance in liver regenerating process of partially hepatectomized rats pretreated with a single dose of carbon tetrachloride // *Dig. Dis. Sci.* – 1999. – Vol. 44, № 5. – P. 1046-1053.

157. Lilja H., Blanc P., Demetriou A.A., Rozga J. Response of cultured fetal and adult hepatocytes to growth factors and cyclosporine // *Cell Transplant.* – 1998. – Vol. 7, № 3. – P. 257-266.
158. Liu X., Zhu X.Z., Ji X.Q. Effect of basic fibroblast growth factor on focal ischemic injury and antioxidant enzyme activities // *Zhongguo Yao Li Xue Bao.* – 1999. – Vol. 20, № 3. – P. 227-231.
159. Lopez-Soriano J., Argiles J.M., Lopez-Soriano F.J. Effects of tumour necrosis factor-alpha on the enzymatic activities related to glucose metabolism // *Biochem.Mol. Biol.Int.* – 1993. – Vol. 30, № 1. – P. 21-27.
160. Lu S.C. Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies // *FASEB J.* – 1999. – Vol. 13, № 10. – P. 1169-1183.
161. Marubayashi S., Takenaka M., Dohi K. et al. Adenine nucleotide metabolism during hepatic ischemia and subsequent blood reflow periods and its relation to organ viability // *Transplantation.* – 1980. – Vol. 30, № 4. – P. 294-296.
162. Matsui N., Satsuki I., Morita Y. et al. Xantine oxidase-derived reactive oxygen species activate nuclear factor kappa B during hepatic ischemia in rats // *Jpn. J. Pharmacol.* – 2000. – Vol. 84. – P. 363-366.
163. Mei M.H., An W., Zhang B.H. et al. Hepatic stimulatory substance protects against liver failure induced by carbon tetrachloride poisoning in mice // *Hepatology.* – 1993. – Vol. 17, № 4. – P. 638-644.
164. Mitchell S.J., Churchill T.A., Winslet M.C., Fuller B.J. Energy metabolism following prolonged hepatic cold preservation: benefits of interrupted hypoxia on the adenine nucleotide pool in rat liver // *Cryobiology.* – 1999. – Vol. 39, № 2. – P. 130-137.
165. Miyagawa Y., Imamura H., Soeda J. et al. Fate of hepatocyte and sinusoidal lining cell function and kinetics after extended cold preservation and transplantation of the rat liver // *Liver Transpl.* – 2002. – Vol. 8, № 4. – P. 370-381.
166. Morales A., Garcia-Ruiz C., Miranda M. et al. Tumor necrosis factor increases hepatocellular glutathione by transcriptional regulation of the heavy subunit chain of γ -glutamylcysteine synthetase // *J. Biol. Chem.* – 1997. – Vol. 272, № 48. – P. 30371-30379.

167. Mtango N.R., Varisanga M.D., Dong Y.J. et al. Growth factors and growth hormone enhance in vitro embryo production and post-thaw survival of vitrified bovine blastocysts / / *Theriogenology*. – 2003. – Vol. 59, № 5-6. – P. 1393-1402.
168. Murdoch B., Gallacher L., Chadwick K. et al. Human embryonic-derived hematopoietic repopulating cells require distinct factors to sustain in vivo repopulating function / / *Exp. Hematol.* – 2002. – Vol. 30, № 6. – P. 598-605.
169. Muriel P., Alba N., Perez-Alvarez V.M. et al. Kupffer cells inhibition prevents hepatic lipid peroxidation and damage induced by carbon tetrachloride / / *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* – 2001. – Vol. 130, № 2. – P. 219-226.
170. Nagai H., Matsumaru K., Feng G., Kaplowitz N. Reduced glutathione depletion causes necrosis and sensitization to tumor necrosis factor- α -induced apoptosis in cultured mouse hepatocytes / / *Hepatology*. – 2002. – Vol. 36, № 1. – P. 55-64.
171. Natsume M., Tsuji H., Harada A. et al. Attenuated liver fibrosis and depressed serum albumin level in carbon tetrachloride-treated IL-6-deficient mice / / *J. Leukoc. Biol.* – 1999. – Vol. 66, № 4. – P. 601-608.
172. Neveux N., De Bandt J.P., Chaumeil J.C., Cynober L. Hepatic preservation, liposomally entrapped adenosine triphosphate and nitric oxide production: a study of energy state and protein metabolism in the cold-stored rat liver / / *Scand. J. Gastroenterol.* – 2002. – Vol. 37, № 9. – P. 1057-1063.
173. Nishida K., Ohta Y., Kongo M., Ishiguro I. Gamma-glutamylcysteinylester attenuates progression of carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice / / *Toxicology*. – 1998. – Vol. 126, № 1. – P. 55-63.
174. Nichihira J., Kuriyama T., Sakai M. et al. The structure and physicochemical properties of rat liver macrophage migration inhibitory factor / / *Biochim. Biophys. Acta.* – 1995. – Vol. 1247, № 1. – P. 159-162.
175. Ohkohchi N., Sakurada M., Koyamada M. et al. The importance of prevention of sinusoidal endothelial cell injury during cold preservation of liver graft / / *Tohoku J. Exp. Med.* – 1994. – Vol. 174, № 4. – P. 317-331.

176. Ohta Y., Kongo M., Sasaki E. et al. Therapeutic effect of melatonin on carbon tetrachloride-induced acute liver injury in rats // J. Pineal. Res. – 2000. – Vol. 28, № 2. – P. 119-126.
177. Okatani Y., Wakatsuki A., Shinohara K. et al. Melatonin stimulates glutathione peroxidase activity in human chorion // J. Pineal Res. – 2001. – Vol. 30, № 4. – P. 199-205.
178. Olthoff K.M. Molecular pathways of regeneration and repair after liver transplantation // World J. of Surg. – 2002. – Vol. 26, № 7. – P. 831-837.
179. Otte K., Engstrom W. Insulin-like growth factor 2 in the horse: determination of cDNA nucleotide sequence and expression in fetal and adult tissue // Gen. Comp. Endocrinol. – 1994. – Vol. 96, № 2. – P. 270-275.
180. Otto G., Wolff H., Hacker R. Glycolysis during hypothermic storage preservation of the liver // Z. Exp. Chir. – 1981. – Vol. 14, № 4. – P. 175-181.
181. Padbury R.T.A., Attard A., Mirza D.E. et al. Extended preservation of the liver with UW solution – is it justifiable? // Transplantation. – 1994. – Vol. 57, № 10. – P. 1490-1493.
182. Pandolfi P.P., Sonati F., Rivi R. et al. Targeted disruption of the housekeeping gene encoding glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD): G6PD is dispensable for pentose synthesis but essential for defence against oxidative stress // EMBOJ. – 1995. – Vol. 14, № 21. – P. 5209-5215.
183. Peng J., Jones G.L., Watson K. Stress proteins as biomarkers of oxidative stress: effects of antioxidant supplements // Free Rad. Biol. Med. – 2000. – Vol. 28, № 11. – P. 1598-1606.
184. Peristeris P., Clark B.D., Gatti S. et al. N-acetylcysteine and glutathione as inhibitors of tumor necrosis factor production // Cell Immunol. – 1992. – Vol. 140, № 2. – P. 390-399.
185. Pigeolet E., Corbisier P., Houbion A. et al. Glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and catalase inactivation by peroxides and oxygen derived free radicals // Mech. Ageing Dev. – 1990. – Vol. 51, № 3. – P. 283-297.

186. Porte R.J., Ploeg R.J., Hansen B. et al. Long-term graft survival after liver transplantation in the UW era: late effects of cold ischemia and primary dysfunction. European Multicentre Study group // *Transpl. Int.* – 1998. – Vol. 11, № 1. – P. S164-167.
187. Puskas F., Gergely P. Jr., Banki K., Perl A. Stimulation of the pentose phosphate pathway and glutathione levels by dehydroascorbate, the oxidized form of vitamin C // *FASEB J.* – 2000. – Vol. 14, № 10. – P. 1352-1361.
188. Ramadori G., Armbrust T. Cytokines in the liver // *Eur. Jour. Gastroenterol. Hepatol.* – 2001. – Vol. 13, № 7. – P. 777-784.
189. Rashed S.M., Patel T.B. Regulation of hepatic energy metabolism by epidermal growth factor // *Eur. J. Biochem.* – 1991. – Vol. 197, № 3. – P. 805-813.
190. Renard P., Delaive E., Van Steenbrugge M. et al. Is the effect of interleukin-1 on glutathione oxidation in cultured human fibroblasts involved in nuclear factor-kappaB activation? // *Antioxid. Redox Signal.* – 2001. – Vol. 3, № 2. – P. 329-340.
191. Rhee J.-E., Jung S.-E., Shin S.-D. et al. The effects of antioxidants and nitric oxide modulators on hepatic ischemia-reperfusion injury in rats // *J. Korean Med. Sci.* – 2002. – Vol. 17. – P. 502-506.
192. Rudack D., Chisholm E.M., Holten D. Rat liver glucose 6-phosphate dehydrogenase // *J. Biol. Chem.* – 1971. – Vol. 246. – P. 1249-1254.
193. Saiki S., Yamaguchi K., Chijiwa K. Phosphoenolpyruvate prevents the decline in hepatic ATP and energy charge after ischemia and reperfusion injury in rats // *J. Surg. Res.* – 1997. – Vol. 73, № 1. – P. 59-65.
194. Sakakura Y., Kaibori M., Oda M. Recombinant human hepatocyte growth factor protects the liver against hepatic ischemia and reperfusion injury in rats // *J. Surg. Res.* – 2000. – Vol. 92, № 2. – P. 261-266.
195. Salvemini F., Franze A., Lervolino A. et al. Enhanced glutathione level and oxidoresistance mediated by increased glucose-6-phosphate dehydrogenase expression // *J. Biol. Chem.* – 1999. – Vol. 274, № 5. – P. 2750-2757.
196. Sass G., Koerber K., Tiegs G. TNF tolerance and cytotoxicity in the liver: the role of interleukin-1beta, inducible nitric oxide-synthase and heme oxygenase-1 in D-galactosamine-sensitized mice // *Inflamm. Res.* – 2002. – Vol. 51, № 5. – P. 229-235.

197. Sato B., Tanaka A., Mori S. et al. Cold preservation-induced changes in oxygen radical generation between parenchymal and nonparenchymal cells in rat liver // Res. Exp. Med. – 1995. – Vol. 195, № 6. – P. 343-354.
198. Sato M., Sasaki M., Hojo H. Antioxidative roles of metallothionein and manganese superoxide dismutase induced by tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 // Arch. Biochem. Biophys. – 1995. – Vol. 316, № 2. – P. 738-744.
199. Scales W.E., Campbell D.A., Green M.E., Remick D.G. Hepatic ischemia/reperfusion injury: importance of oxidant/tumor necrosis factor interactions // Am. J. Physiol. – 1994. – Vol. 276, № 6. – P. G1122-1127.
200. Schemmer P., Connor H.D., Arteel G.E. et al. Reperfusion injury in livers due to gentle in situ organ manipulation during harvest involves hypoxia and free radicals // J. Pharmacol. Exp. Ther. – 1999. – Vol. 290, № 1. – P. 235-240.
201. Selzner N., Selzner M., Tian Y. et al. Cold ischemia decreases liver regeneration after partial liver transplantation in the rat: A TNF-alfa/IL-6-dependent mechanism // Hepatology. – 2002. – Vol. 36, № 4. – P. 812-818.
202. Sennikov S., Krysov S., Silkov A. Production of IL-10, TNF-alpha, IFN-gamma, TGF-beta1 by different populations of erythroid cells derived from human embryonal liver // Cytokine. – 2002. – Vol. 17, № 4. – P. 221-225.
203. Serracino-Inglott F., Habib N.A., Mathie R.T. Hepatic ischemia-reperfusion injury // Am. J. Surg. – 2001. – Vol. 181, № 2. – P. 160-166.
204. Serteser M., Koken T., Kahraman A. et al. Changes in hepatic TNF-alpha levels, antioxidant status, and oxidation products after renal ischemia/reperfusion injury in mice // Jour. Surg. Res. – 2002. – Vol. 107, № 2. – P. 234-240.
205. Sewerynek E., Reiter R.J., Melchiorri D. et al. Oxidative damage in the liver induced by ischemia-reperfusion: protection by melatonin // Hepatogastroenterology. – 1996. – Vol. 43, № 10. – P. 898-905.
206. Shi Z.Z., Osei-Frimpong J., Kala G. et al. Glutathione synthesis is essential for mouse development but not for cell growth in culture // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2000. – Vol. 97, № 10. – P. 5101-5106.

207. Shibuya H., Ohkohchi N., Seya K., Satomi S. Kupffer cells generate superoxide anions and modulate reperfusion injury in rat livers after cold preservation // *Hepatology*. – 1997. – Vol. 25, № 2. – P. 356-360.
208. Shito M., Wakabayashi G., Ueda M. et al. Interleukin 1 receptor blockade reduces tumor necrosis factor production, tissue injury, and mortality after hepatic ischemia-reperfusion in the rat // *Transplantation*. – 1997. – Vol. 63, № 1. – P. 143-148.
209. Sileri P., Schena S., Morini S. et al. Pyruvate inhibits hepatic ischemia-reperfusion injury in rats // *Transplantation*. – 2001. – Vol. 72, № 1. – P. 27-30.
210. Simeonova P.P., Gallucci R.M., Hulderman Y. et al. The role of tumor necrosis factor- α in liver toxicity, inflammation, and liver fibrosis induced by carbon tetrachloride // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* – 2001. – Vol. 177, № 2. – P. 112-120.
211. Sindram D., Rudiger H.A., Upadhy A.G. et al. Ischemic preconditioning protects against cold ischemic injury through an oxidative stress dependent mechanism // *J. Hepatol.* – 2002. – Vol. 36, № 1. – P. 78-84.
212. Singh I., Gulati S., Orak J.K. et al. Expression of anyioxidant enzymes in rat kidney during ischemia-reperfusion injury // *Mol. Cell Biochem.* – 1993. – Vol. 125, № 2. – P. 97-104.
213. So P.W., Fuller B.J. Enhanced energy metabolism during cold hypoxic organ preservation: studies on rat liver after pyruvate supplementation // *Cryobiology*. – 2003. – Vol. 46, № 3. – P. 295-300.
214. Somerset D.A., Jauniaux E., Strain A.J. et al. Hepatocyte growth factor concentration in maternal and umbilical cord blood samples and expression in fetal liver // *J. Soc. Gyn. Invest.* – 2000. – Vol. 7, № 6. – P. 333-337.
215. Spolarics Z. Endotoxemia, pentose cycle, and the oxidant\antioxidant balance in the hepatic sinusoid // *J. Leucoc. Biol.* – 1998. – Vol. 63, № 5. – P. 534-541.
216. Spolarics Z., Wu J.X. Tumor necrosis factor α augments the expression of glucose-6-phosphate dehydrogenase in rat hepatic endothelial and Kupffer cells // *Life Sci.* – 1997. – Vol. 60, № 8. – P. 565-571.

217. Stanton R.C., Seifter J.L. Epidermal growth factor rapidly activates the hexose monophosphate shunt in kidney cells // *Am. J. Physiol.* – 1988. – Vol. 254, № 2. – P. C267-271.
218. Strain A.J., Frazer A., Hill D.J., Milner R.D. Transforming growth factor beta inhibits DNA synthesis in hepatocytes isolated from normal and regenerating rat liver // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1987. – Vol. 145, № 1. – P. 436-442.
219. Streetz K.L., Luedde T., Manns M.P., Trautwein C. Interleukin 6 and liver regeneration // *Gut.* – 2000. – Vol. 47. – P. 309-312.
220. Sun F., Hamagawa E., Tsutsui C. et al. Evaluation of oxidative stress during apoptosis and necrosis caused by carbon tetrachloride in rat liver // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2001. – Vol. 1535, № 2. – P. 186-191.
221. Sussman N.L., Lake J.R. Treatment of hepatic failure – 1996: current concepts and progress toward liver dialysis // *Am. J. Kidney Dis.* – 1996. – Vol. 27, № 5. – P. 605-621.
222. Suzuki M., Fukuhara K., Unno M. et al. Correlation between plasma and hepatic phosphatidylcholine hydroperoxide, energy charge, and total glutathione content in ischemia/reperfusion injury of rat liver // *Hepatogastroenterology.* – 2000. – Vol. 47, № 34. – P. 1082-1089.
223. Suzuki S., Toledo-Pereyra L.H. Interleukin 1 and tumor necrosis factor production as the initial stimulants of liver ischemia and reperfusion injury // *J. Surg. Res.* – 1994. – Vol. 57, № 2. – P. 253-258.
224. Taguchi T., Fukuda M., Ohashi M. Differences in DNA synthesis in vitro using isolated nuclei from regenerating livers of young and aged rats // *Mech. Ag. Dev.* – 2001. – Vol. 122, № 2. – P. 141-155.
225. Takeda Y., Arai S., Kaido T. et al. Morphologic alteration of hepatocytes and sinusoidal endothelial cells in rat fatty liver during cold preservation and the protective effect of hepatocyte growth factor // *Transplantation.* – 1999. – Vol. 67, № 6. – P. 820-828.
226. Takeishi T., Hirano K., Kobayashi T. et al. The role of Kupffer cells in liver regeneration // *Arch. Histol. Cytol.* – 1999. – Vol. 62, № 5. – P. 413-422.
227. Tan M., Li S., Swaroop M. et al. Transcriptional activation of the human glutathione peroxidase promoter by p53 // *J. Biol. Chem.* – 1999. – Vol. 274. – P. 12061-12066.

228. Tanaka J., Malchesky P.S., Omokawa S. et al. Effects of prostaglandin I₂, superoxide dismutase, and catalase on ischemia-reperfusion injury in liver transplantation // *ASAIO Trans.* – 1990. – Vol. 36, № 3. – P. M600-603.
229. Teruel M., Smith R., Catalano R. Growth factors and embryo development // *Biocell.* – 2000. – Vol. 24, № 2. – P. 107-122.
230. Tian W.-N., Braunstein L.D., Pang J. et al. Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity for cell growth // *J. Biol. Chem.* – 1998. – Vol. 273, № 17. – P. 10609-10617.
231. Tietz A., Ochoa, S. "Fluorokinase" and pyruvic kinase // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1958. – Vol. 78. – P. 477-493.
232. Tomiya T., Ogata I., Fujiwara K. Transforming growth factor alpha levels in liver and blood correlate better than hepatocyte growth factor with hepatocyte proliferation during liver regeneration // *Am. J. Pathol.* – 1998. – Vol. 153, № 3. – P. 955-961.
233. Tresco P.A., Biran R., Noble M.D. Cellular transplants as sources for therapeutic agents // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2000. – Vol. 42, № 1-2. – P. 3-27.
234. Tsuchihashi S., Tamaki T., Tanaka M. et al. Pyrrolidine dithiocarbamate provides protection against hypothermic preservation and transplantation injury in the rat liver: the role of heme oxygenase-1 // *Surgery.* – 2003. – Vol. 133, № 35. – P. 556-567.
235. Turecky L. Liver ischaemia/reperfusion injury // *Bratisl. Lek. Listy.* – 1999. – Vol. 100, № 1. – P. 36-40.
236. Ursini M.V., Parrella A., Rosa G. et al. Enhanced expression of glucose-6-phosphate dehydrogenase in human cells sustaining oxidative stress // *Biochem. J.* – 1997. – Vol. 323, № 3. – P. 801-806.
237. Vairetti M., Griffini P., Pietrocola G. et al. Cold-induced apoptosis in isolated rat hepatocytes: protective role of glutathione // *Free Rad. Biol. Med.* – 2001. – Vol. 31, № 8. – P. 954-961.
238. Valentini G., Chiarelli L.R., Fortin R. et al. Structure and function of human erythrocyte pyruvate kinase. Molecular basis of nonspherocytic hemolytic anemia // *J. Biol. Chem.* – 2002. – Vol. 277, № 26. – P. 23807-23814.

239. Van der Hoeven J.A., Lindell S., van Schilfgaarde R. et al. Donor brain death reduces survival after transplantation in rat livers preserved for 20 hr // *Transplantation*. – 2001. – Vol. 72. – P. 1632-1636.
240. Vreugdenhil P.K., Ametani M.S., Haworth R.A., Southard J.H. Biphasic mechanism for hypothermic induced loss of protein synthesis in hepatocytes // *Transplantation*. – 1999. – Vol. 67, № 11. – P. 1468-1473.
241. Vreugdenhil P.K., Rankin M.A., Southard J.H. Cold storage sensitizes hepatocytes to oxidative stress injury // *Transpl. Int.* – 1997. – Vol. 10, № 5. – P. 379-385.
242. Webster D., Bignell A.H., Attwood E.C. An assessment of the suitability of bromocresol green for the determination of serum albumin // *Clin. Chim. Acta*. – 1974. – Vol. 53, № 1. – P. 101-108.
243. Wheeler M.D., Katuna M., Smutney O.M. et al. Comparison of the effect of adenoviral delivery of three superoxide dismutase genes against hepatic ischemia-reperfusion injury // *Hum. Gene Ther.* – 2001. – Vol. 12. – P. 2167-2177.
244. Wu B., Wang C.W., Xu J.R., Zhu J.Q. Effect of epidermal growth factor on cultured rat hepatocytes poisoned by CCl₄ // *Zhongguo Yao Li Xue Bao*. – 1997. – Vol.18, № 2. – P. 176-179.
245. Xu W., Wang S., Wang G. et al. Identification and characterization of differentially expressed genes in the early phase during liver regeneration // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2000. – Vol. 278, № 2. – P. 318-325.
246. Yabe Y., Kobayashi N., Nishihashi T. et al. Prevention of neutrophil-mediated hepatic ischemia/reperfusion injury by superoxide dismutase and catalase derivatives // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* - 2001. – Vol. 298, № 3. – P. 894-899.
247. Yamada Y., Fausto N. Deficient liver regeneration after carbon tetrachloride injury in mice lacking type 1 but not type 2 tumor necrosis factor receptor // *Am. J. Pathol.* – 1998. – Vol. 152, № 6. – P. 1577-1589.
248. Yamaoka M., Hirata K., Ogata I. et al. Enhancement of albumin production by hepatocyte growth factor in rat hepatocytes: distinction in mode of action from stimulation of DNA synthesis // *Liver*. – 1998. – Vol. 18, № 1. – P. 52-59.

249. Yasminen W.G., Parkin J.L., Caspers J.I., Theologides A. Tumor necrosis factor/cachectin decreases catalase activivty of rat liver // *Cancer Research*. – 1991. – Vol. 51, № 15. – P. 3990-3995.
250. Yoshidome H., Kato A., Edwards M.J., Lentsch A.B. Interleukin-10 supresses hepatic ischemia/reperfusion injury in mice: implications of a central role for nuclear factor kappaB // *Hepatology*. – 1999. – Vol. 30, № 1. – P. 203-208.
251. Yoshidome H., Kato A., Miyazaki M. et al. IL-13 activates STAT6 and inhibits liver injury induced by ischemia/reperfusion // *Am. J. Pathol.* – 1999. – Vol. 155, № 4. – P. 1059-1064.
252. Zhu W., Fung P.C. The roles played by crucial free radicals like lipid free radicals, nitric oxide, and enzymes NOS and NADPH in CCl₄-induced acute liver injury of mice // *Free Rad. Biol. Med.* – 2000. – Vol. 29, № 9. – P. 870-880.
253. Zou Y., Gong D.Z., Mei M.H., Zhang W.Q. Protective effect of hepatocyte growth factor on hepatocyte poisoning by carbon tetrachloride and related gene expression in rats // *Sheng Li Xue Bao*. – 2000. – Vol. 52, № 1. – P. 59-63.