



## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ФИЗИОЛОГИЯ

DOI: 10.22363/2313-0245-2018-22-2-171-182

### ДИНАМИКА АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ АНТИРАДИКАЛЬНОЙ ЗАЩИТЫ И ОБЩЕЙ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ ПРИ РАЗВИТИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ИШЕМИЧЕСКИ-РЕПЕРФУЗИОННОГО ПОРАЖЕНИЯ ПЕЧЕНИ

К.А. Попов, И.М. Быков,  
Г.А. Ермакова, И.Ю. Цымбалюк

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования  
«Кубанский государственный медицинский университет»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Краснодар, Россия

*Цель:* изучение изменений активности некоторых ферментов антиоксидантной защиты в динамике развития ишемически-реперфузионного повреждения печени у крыс.

*Материалы и методы:* исследование проведено на 95 белых нелинейных крысах-самцах массой 240—280 грамм, разделенных на группы животных, биологический материал которых забирался в течение 5—20 минут ишемического периода и 5—20 минут реперфузионного периода с интервалом 5 минут. Для оценки изменений антиоксидантной системы определяли активность супероксиддисмутазы и каталазы эритроцитов и гомогената печени, а также общую антиоксидантную активность.

*Результаты:* проведенные исследования показали развитие дисбаланса соотношения активности каталазы и супероксиддисмутазы при развитии ишемически-реперфузионного синдрома со сдвигом данного соотношения в сторону преобладания каталазной активности на системном и супероксиддисмутазной на органном уровнях после восстановления кровотока. Кроме того, отмечается увеличение активности исследуемых ферментов эритроцитарной взвеси до 2-х раз относительно контроля, особенно в ишемический период, и тенденции к прогрессирующему снижению активности этих же ферментов в ткани печени. Общая антиоксидантная активность в ишемически-реперфузионный период снижается уже к 5-й минуте ишемии в 2 раза и сохраняется на том же уровне (0,04—0,05 мг/л витамина С в пересчете на 1 грамм белка гомогената) в течение всего эксперимента.

*Заключение:* полученные результаты показывают возможность оценки функционального состояния системы окислительно-восстановительного гомеостаза животного при ишемически-реперфузионном повреждении печени, а вместе со сниженной общей антиоксидантной активностью указывают на необходимость метаболической поддержки данного звена системы неспецифической резистентности для коррекции развивающихся нарушений.

**Ключевые слова:** печень, ишемия, реперфузия, антиоксидантная система

*Ответственный за переписку:*

Илья Михайлович Быков — доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой фундаментальной и клинической биохимии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 350063, г. Краснодар, ул. Седина, 4, E-mail: [ilya.bh@mail.ru](mailto:ilya.bh@mail.ru)

Попов К.А. ORCID: 0000-0002-3649-1361 SPIN: 9456-9710

Быков И.М. ORCID 0000-0001-7325-536 SPIN-код: 9977-6613

Ермакова Г.А. ORCID 0000-0001-6473-3594 SPIN-код: 9650-6850

Цымбалюк И.Ю. ORCID 0000-0002-5711-6659 SPIN-код: 4493-0738

**Для цитирования:**

Попов К.А., Быков И.М., Ермакова Г.А., Цымбалюк И.Ю. Динамика активности ферментов антирадикальной защиты и общей антиоксидантной активности при развитии экспериментального ишемически-реперфузионного поражения печени // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. 2018. Т. 22. № 2. С. 171—182. DOI: 10.22363/2313-0245-2018-22-2-171-182.

**For citation:**

Popov K.A., Bykov I.M., Ermakova G.A., Tsybalyuk I.Y. (2018). Active dynamics of the enzymes of the antiradical protection and the general antioxidative activity by the development of the experimental ischemic reperfusion of liver. *RUDN Journal of Medicine*, 22 (2), 171—182. DOI: 10.22363/2313-0245-2018-22-2-171-182.

Синдром ишемии-реперфузии печени — это сложный комплекс патологических и адаптивных реакций организма, включающих каскад метаболических, иммунологических и морфологических изменений [1—2], развивающихся в результате редуцирования кровотока в органе с последующим его восстановлением. Прекращение поступления кислорода приводит к инверсии метаболизма с аэробного окисления на гликолиз, являющийся менее энергоэффективным, что сопровождается значительным снижением синтеза АТФ в тканях и накоплением недоокисленных продуктов. Дальнейшая реперфузия печени нередко становится причиной значительного повреждения гепатоцитов, эндотелия капилляров и эпителия желчных протоков.

Ведущим патобиохимическим механизмом развития синдрома ишемии-реперфузии печени является окислительный стресс. Дисбаланс между тканевой потребностью в кислороде и доставкой, а также резкое возрастание его парциального давления в ткани печени после восстановления кровотока создают благоприятные условия для образования свободных радикалов (супероксиданиона, перекиси водорода, гидроксильного радикала). Это в свою очередь приводит к активации процессов перекисного окисления липидов, которое ведет к альтерации клеточных и субклеточных мембранных структур гепатоцитов [3—7]. Представление о механизмах процессов, сопровождающих синдром ишемии-реперфузии печени, может стать основой для разработки новых научно обоснованных методик, позволяющих улучшить качество трансплантационных и других обширных операций на органах гепатобили-

арной системы, а также снизить риск развития послеоперационных осложнений.

Целью настоящего исследования было изучение изменений активности некоторых ферментов антиоксидантной защиты в динамике развития ишемически-реперфузионного повреждения печени у крыс.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проведено на 95 белых нелинейных половозрелых крысах-самцах массой 240—280 грамм. Испытуемые лабораторные животные содержались на базе учебно-производственного отдела (вивария) ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России. Все исследования проводились в соответствии с «Правилами, принятыми в Европейской конвенции по защите позвоночных животных» (Страсбург, 1986) и были одобрены локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России (протокол № 51 от 23.05.2017 г.). Все манипуляции проводились под общей анестезией Золетилом 100 («Virbac», Франция) 10 мг/кг внутримышечно.

Контрольная группа (группа 1) была представлена животными ( $n = 12$ ), у которых забиралась кровь в объеме 150 мкл из каудальной полой вены через 5, 10 и 15 минут после осуществления лапаротомии. 2-я контрольная группа (группа 2) была представлена животными ( $n = 10$ ), у которых забиралась кровь в объеме 150 мкл из каудальной полой вены через 5, 10, 15 и 20 минут спустя 15 минут после осуществления лапаротомии. Животные 3-й группы ( $n = 15$ ) после срединной лапаротомии подвергались пережатию аналога печеночно-двенадцатиперстной связки

(ПДС) на 15 минут с осуществлением забора крови через 5, 10 и 15 минут после начала ишемии в объеме 150 мкл из каудальной полой вены. Животные 4-й группы ( $n=14$ ) подвергались 15-минутному пережатию аналога ПДС с забором крови в объеме 150 мкл из каудальной полой вены через 5, 10, 15 и 20 минут реперфузии. Для оценки изменений на органном уровне были сформированы 4 аналогичные группы, у которых производился забор образца печени массой 0,15—0,20 г. Контрольная группа (группа 1п) была представлена животными ( $n = 10$ ), у которых забирался образец печени через 5, 10, 15 и 20 минут после осуществления лапаротомии. 2-я контрольная группа (группа 2п) была представлена животными ( $n = 10$ ), у которых забирался образец печени через 5, 10, 15 и 20 минут спустя 20 минут после осуществления лапаротомии. Животные 3п группы ( $n = 12$ ) после срединной лапаротомии подвергались пережатию аналога ПДС на 20 минут с осуществлением забора образца печени через 5, 10, 15 и 20 минут ишемии. Животные 4п группы ( $n = 12$ ) подвергались 20-минутному пережатию аналога ПДС с забором участка печени через 5, 10, 15 и 20 минут реперфузии.

Таким образом, были сформированы группы животных, биологический материал которых забирался в течение 5—20 минут ишемического периода и 5—20 минут реперфузионного периода с интервалом 5 минут. Так как кровь и печень неоднократно забиралась у одних и тех животных, для оценки влияния кровопотери и повреждения печени вследствие ее частичной резекции, были сформированы аналогичные группы контрольных крыс.

Для оценки изменений антиоксидантной системы определяли активности супероксиддисмутазы (СОД), каталазы (КАТ) гемолизата эритроцитов и гомогената печени и общую антиоксидантную активность (АОА) в гомогенате печени. Активность КАТ определяли по скорости утилизации пероксида водорода, которую регистрировали по поглощению света при 260 нм [8].

Активность СОД определяли по степени торможения аутоокисления кверцетина [9]. Общую АОА определяли методом FRAP (Ferric Reducing/Antioxidant Power), вводя в избытке ионы  $Fe^{3+}$  и фотометрический реагент — 2,2'-дипиридил [10]. В гомогенате печени определяли концентрацию белка методом Брэдфорд с красителем Кумасси [11], расчет активности ферментов и концентрации глутатиона производили на 1 грамм белка гомогената.

Результаты исследования обрабатывали статистически с использованием системы статистического анализа Stat plus LE. Данные представляли в виде медианы (Me), 25-го и 75-го перцентилей ( $p_{0,25}/p_{0,75}$ ). С учетом критерия Манна-Уитни регистрировали изменения показателей у животных разных групп, критерий Вилкоксона использовали для оценки различий показателей, полученных у животных одной группы, достоверным считали различие при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При анализе полученных данных выявлено наиболее выраженное увеличение каталазной активности эритроцитарной взвеси к 10-й минуте ишемического периода — в 2 раза, по сравнению с периодом 5-минутного пережатия аналога ПДС. При этом в сравнении со значениями контроля каталазная активность при пережатии аналога ПДС в течение 5 минут была снижена на 14%.

Необходимо отметить, что изменения активности рассматриваемого фермента в контрольной группе животных в течение как ишемического периода, так и реперфузионного не отмечалось. Дальнейшее развитие ишемического и реперфузионного периода характеризовалось высокими стабильными значениями каталазной активности эритроцитов на уровне 10—12 ммоль/(л×мин), и только к 20-й минуте восстановления кровотока было определено еще небольшое увеличение ферментативной активности на 10—20%, относительно значений аналогичного показателя при предыдущих заборах крови. Активность супероксиддисмутазы эритроцитов колебалась

в более широких пределах, и ее изменения не всегда были такими однозначными, как изменения активности каталазы.

К 5-й минуте ишемии активность СОД эритроцитарной взвеси снижалась на 10%, затем аналогично изменению каталазной активности было определено увеличение в 1,9 раза. В дальнейшем отмечался рост активности СОД еще на 20% к 15-й минуте ишемии и относительно низкие значения активности данного фермента в эритроцитарной взвеси к 5-й минуте восстановления кровотока — только в 1,5 раз превышающие контрольные цифры. В целом реперфузионный период характеризовался более низкими значениями активности СОД по сравнению с периодом ишемии и, только к 20-й минуте реперфузии наметилось увеличение активности данного фермента до значений показателя 5-минутной ишемии (табл. 1). Оценка соотношения активности

КАТ/СОД показала поддержание его на уровне, близком к единице в течение всего периода ишемии, что может характеризовать вместе с данными об увеличении активности обоих ферментов в 2 раза адаптивные изменения, направленные на подготовку к развитию окислительного стресса в период активного восстановления кровотока. В какой-то степени такой эффект может быть обусловлен усилением активирующего влияния супероксидного анион-радикала на СОД и пероксида водорода на КАТ ввиду общего относительного увеличения напряжения кислорода в крови при выключении печени из системного кровотока. Период реперфузии характеризуется увеличением соотношения КАТ/СОД до 1,5—1,9 единиц, что свидетельствует о преимущественной генерации пероксида водорода и возможно сниженной резистентности к образованию супероксидного анион-радикала.

Таблица 1

**Изменения активности ферментов антиоксидантной защиты эритроцитов при ишемии-реперфузии печени крыс (Me(p0,25/p0,75))**

Период	Время, мин.	К-КАТ, ммоль/(лЧмин)	КАТ, ммоль/(лЧмин)	К-СОД, отн.ед.	СОД, отн.ед.
Ишемия	5	5,29 (4,86/5,65)	4,56* (4,28/4,89)	30,2 (28,6/32,6)	27,8* (25,4/28,9)
	10	5,08 (4,72/5,44)	10,26*^ (9,18/10,60)	33,0 (31,3/33,7)	51,8*^ (47,0/54,3)
	15	6,02 (5,55/6,34)	10,30* (9,83/10,79)	35,7^ (32,2/36,8)	61,3*^ (55,5/63,9)
Реперфузия	5	5,33 (4,95/5,70)	11,45* (10,57/11,80)	32,4 (30,4/34,0)	47,3*^ (45,6/50,1)
	10	5,25 (4,85/5,5,77)	11,09* (10,78/11,80)	31,1 (30,2/33,5)	40,0*^ (37,4/45,0)
	15	5,40 (5,02/5,82)	11,84* (11,48/12,35)	34,5 (31,6/36,8)	38,9* (37,3/43,5)
	20	5,23 (4,90/5,56)	13,06*^ (12,40/13,85)	33,5 (30,8/34,8)	48,3*^ (44,5/50,4)

*Примечание:* \* — статистически значимые отличия ( $p < 0,05$ ) от соответствующего показателя контрольной группы; ^ — статистически значимые отличия ( $p < 0,05$ ) между двумя показателями, определенными с 5-минутным интервалом ишемии-реперфузии.

*Обозначения:* КАТ, СОД — активность ферментов крыс опытных групп; К-КАТ, К-СОД — активность ферментов контрольных групп.

Ферменты антиоксидантной защиты ткани печени претерпевали в основном изменения в сторону прогрессирующего снижения их активности. Интересно также отметить, что активность КАТ контрольных животных снижалась до зна-

чений почти в 1,5 раза ниже исходных. У крыс, подвергавшихся ишемии-реперфузии, каталазная активность ткани печени снижалась к 10-й минуте ишемического периода на 20% и к 20-й минуте того же периода еще более чем на 20% по срав-

нению с предыдущими значениями рассматриваемого показателя, однако в целом показатели активности каталазы в данный период повреждения печени соответствовали контрольным значениям. Выраженное снижение активности КАТ в среднем в 1,5—2 раза по сравнению с контрольными значениями было определено у животных в период реперфузии.

Активность СОД ткани печени крыс контрольной группы не претерпевала изменений во времени при заборе крови без моделирования ишемии-реперфузии. У животных опытных групп отмечалось снижение активности СОД печени на 15% к 5-й минуте ишемии с дальнейшим снижением активности фермента еще на 15% к 20-й минуте ишемического поражения органа. Период реперфузии характеризовался значениями активности СОД в пределах контрольных цифр в течение 5—15 минут после восстановления кровотока со снижением активности фермента к 20-й

минуте на 25% относительно контроля (табл. 2). Соотношение активности КАТ/СОД гомогената печени в ишемический период характеризовалось значениями, близкими к единице (1,2—1,6 единицы), с небольшим преобладанием каталазной активности. Это, возможно, необходимо для частичного возвращения активных форм кислорода в цепь переноса электронов в условиях сниженного парциального давления кислорода в ишемизированной ткани и обеспечивает более эффективное протекание энергетического метаболизма. В период реперфузии соотношение КАТ/СОД смещается в сторону преобладания активности СОД (0,5—0,8 единиц). В данный период времени резкое увеличение оксигенации печени сопровождается гиперпродукцией свободных радикалов, в первую очередь продукта одноэлектронного восстановления кислорода — супероксидного анион-радикала.

Таблица 2

**Изменения активности ферментов антиоксидантной защиты печени крыс при ее ишемии-реперфузии (Me(p0,25/p0,75))**

Период	Время, мин.	К-КАТ ммоль/(л×мин×г белка)	КАТ, ммоль/(л×мин×г белка)	К-СОД, отн.ед./г белка	СОД, отн.ед./г белка
Ишемия	5	2,71 (2,35/2,90)	2,52 (2,30/2,78)	12,5 (11,8/12,8)	10,7* (10,2/11,1)
	10	2,17^ (2,02/2,42)	2,01^ (1,79/2,20)	11,6 (11,4/12,0)	9,0*^ (8,4/9,6)
	15	1,88 (1,60/2,03)	2,39 (2,00/2,48)	12,0 (11,7/12,4)	9,7* (9,2/10,0)
	20	1,88 (1,59/2,02)	1,72^ (1,54/1,95)	11,8 (11,5/12,3)	9,1* (8,8/9,4)
Реперфузия	5	2,31 (2,01/2,56)	1,41*^ (1,23/1,59)	11,7 (11,3/12,1)	12,4^ (11,7/12,8)
	10	2,17 (2,00/2,41)	1,61* (1,43/1,72)	11,8 (11,5/12,1)	11,8 (11,5/12,2)
	15	1,83^ (1,60/1,97)	0,80*^ (0,73/1,05)	12,0 (11,6/12,3)	12,2 (11,8/12,5)
	20	1,94 (1,64/2,10)	1,23* (0,95/1,36)	11,5 (11,3/11,9)	8,5*^ (8,0/9,0)

Примечание: \* — статистически значимые отличия ( $p < 0,05$ ) от соответствующего показателя контрольной группы; ^ — статистически значимые отличия ( $p < 0,05$ ) между двумя показателями, определенными с 5-минутным интервалом ишемии-реперфузии.

Обозначения: КАТ, СОД — активность ферментов крыс опытных групп; К-КАТ, К-СОД — активность ферментов контрольных групп.

Исследование общей антиоксидантной активности гомогената печени контрольных животных показало сохранение ее в течение всего эксперимента на уровне 0,08—0,10 мг/л вита-

мина С (принятого за стандарт) в пересчете на 1 грамм белка гомогената. В ишемически-реперфузионный период общая антиоксидантная активность снижается уже к 5-й минуте ишемии

в 2 раза и сохраняется на уровне 0,04—0,05 мг/л витамина С в пересчете на 1 грамм белка гомогената в течение всего эксперимента. В момент реперфузии можно было бы ожидать существенных изменений, однако вероятно, что усиление в этот период свободнорадикальных процессов уравновешивалось снабжением антиоксидантами из крови.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты подробно описывают изменения активности ферментов первых линий антиоксидантной защиты и общей антиоксидантной активности на системном и органном уровнях в течение 20 минут ишемического повреждения печени и в ранний реперфузионный период.

20-минутное пережатие ПДС с целью выключения печени из системного кровотока при оперативных вмешательствах или прекращение кровоснабжения данного органа вследствие других причин в течение 20—30 минут являются наиболее актуальными временными промежутками изучения фундаментальных и клинических аспектов ишемически-реперфузионного повреждения печени. В это время орган сохраняет жизнеспособность, и еще возможно его сохранение при восстановлении кровотока, а путем метаболического воздействия на наиболее чувствительные звенья патогенеза возможно предотвращение развития печеночной недостаточности в поздние сроки реперфузии. Результаты настоящего исследования показали роль изменений активности каталазы и супероксиддисмутазы крови и печени в течение рассматриваемого патологического процесса. Так, показано развитие дисбаланса соотношения активности КАТ/СОД при развитии ишемически-реперфузионного синдрома со сдвигом данного соотношения в сторону преобладания каталазной активности на системном и супероксиддисмутазной на органном уровнях после восстановления кровотока. Кроме того, отмечается увеличение активности исследуемых ферментов эритроцитарной взвеси, особенно в ишемический

период, и тенденции к прогрессирующему снижению активности этих же ферментов в ткани печени. Это указывает на возможность оценки функционального состояния системы окислительно-восстановительного гомеостаза животного при ишемически-реперфузионном повреждении печени, а вместе со сниженной общей антиоксидантной активностью показывает необходимость метаболической поддержки данного звена системы неспецифической резистентности.

### ФИНАНСИРОВАНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

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

### БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. *Donadon M., Molinari A.F., Corazzi F., Rocchi L., Zito P., Cimino M., Costa G., Raimondi F., Torzilli G.* Pharmacological modulation of ischemic-reperfusion injury during Pringle maneuver in hepatic surgery. A prospective randomized pilot study // *World Journal of Surgery.* 2016. V. 40. № 9. P. 2202—2212.
2. *Guan L.-Y., Fu P.-Y., Li P.-D., Liu H.-Y., Xin M.-G., Li W.* Mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and protective effects of nitric oxide // *World Journal of Gastrointestinal Surgery.* 2014. V. 6. № 7. P. 122—128.
3. *Ходосовский М.Н.* Коррекция окислительных повреждений при синдроме ишемии-реперфузии печени // *Журн. ГрГМУ.* 2016. № 4. С. 20—25.
4. *Басов А.А., Быков И.М.* Изменение антиоксидантного потенциала крови экспериментальных животных при нутриционной коррекции окислительного стресса // *Вопросы питания.* 2013. № 6. С. 75—81.
5. *Басов А.А., Быков И.М.* Сравнительная характеристика антиоксидантного потенциала и энергетической ценности некоторых пищевых продуктов // *Вопросы питания.* 2013. № 3. С. 77—80.
6. *Bykov M.I., Basov A.A.* Change of parameters in prooxidant-antioxidant bile system in patients with the obstruction of bile-excreting ducts // *Medical news of North Caucasus.* 2015. V. 10 (2). P. 131—135.
7. *Li J., Li R.J., Lv G.Y., Liu H.Q.* The mechanisms and strategies to protect from hepatic ischemiareperfusion injury // *European Review for Medical and Pharmacological Sciences.* 2015. V. 19. № 11. P. 2036—2047.

8. *Карпищенко А.И.* Медицинские лабораторные технологии. Справочник. СПб.: Интермедика, 2002. 600 с.
9. *Костюк В.А., Потапович А.И., Ковалева Ж.И.* Простой и чувствительный метод определения супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина // Вопросы медицинской химии. 1990. № 2. С. 88—91.
10. *Benzie I.F.F., Strain J.J.* The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay // *Anal. Biochem.* 1996. V. 239. № 1. P. 70—76.
11. *Bradford M.M.* A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.* 1976. V. 72. P. 248—254.

Поступила 25.04.2018  
Принята 31.05.2018

DOI: 10.22363/2313-0245-2018-22-2-171-182

## ACTIVE DYNAMICS OF THE ENZYMES OF THE ANTIRADICAL PROTECTION AND THE GENERAL ANTIOXIDATIVE ACTIVITY BY THE DEVELOPMENT OF THE EXPERIMENTAL ISCHEMIC REPERFUSION OF LIVER

K.A. Popov, I.M. Bykov, G.A. Ermakova, I.Y. Tsymbalyuk

Kuban State Medical University of the Ministry of Health of Russia,  
Krasnodar, Russia

**Abstract.** *The purpose of the study:* to research the active changes in several enzymes of the antioxidative protection within the dynamical development of the liver reperfusion in rats.

*Materials and methods:* the study has been performed on 95 white non-lineal male rats with the mass of 240—280 g divided into groups, the biological material of which has been sampled within 5—20 minutes of the ischemic period and 5—20 minutes of the reperfusion period with the interval of 5 minutes. To evaluate the changes of the antioxidative system the activity of the superoxide dismutase, the erythrocyte catalase and the liver homogenate as well as the general antioxidative activity have been determined.

*Results:* the performed study has demonstrated the imbalance development for the relation between the activity of catalase and superoxide dismutase by the development of the ischemic reperfusion syndrome with the change of this relation to the prevalence of the catalase activity on the systemic level and the superoxide dismutase activity on the organic level after the circulatory restoration. Besides the increase in activity of the studied enzymes from the erythrocyte, meal by 2 times in comparison with the control group has been determined especially at the ischemic period as well as the tendencies to the progressive activity decrease of the same enzymes in the liver tissue. The general antioxidative activity in the period of ischemic reperfusion has been decreasing to the fifth minute of ischemia by 2 times and has lasted on the same level (0.04—0.05 mg/l of vitamin C in terms of 1 gram of homogenate protein) during the entire experiment.

*Conclusion:* the received results have demonstrated the possibility for the evaluation of the functional state for the system of oxidative restorative homeostasis in an animal by ischemic reperfusion of the liver against the background of the lowered general antioxidative activity. It was marked also the necessity of the metabolic support of this link within the system of non-specific resistance for the correction of the developing disorders.

**Key words:** liver, ischemia, reperfusion, antioxidative system

*Correspondence Author:*

Iliya Mikhaylovich Bykov — PhD, MD, Head of the department of Fundamental and Clinical Biochemistry of The Kuban State Medical University of the Ministry of Health of Russia, 350063, Krasnodar, ul.Sedina, 4, E-mail: [ilya.bh@mail.ru](mailto:ilya.bh@mail.ru)  
ORCID: 0000-0002-3649-1361

The hepatic ischemia-reperfusion syndrome is a complex of pathological and adaptive reactions of an organism including a variety of metabolic, immu-

nological and morphological changes developing as a result of the reduced blood circulation within an organ with its further restoration [1—2]. The cessa-

tion of the oxygen supply leads to the metabolic inversion from aerobic oxidation to glycolysis, which is less energy efficient; the change is accompanied by the sufficient decrease of the ATP synthesis in tissues and the accumulation of the under-oxidized products. The further liver reperfusion is often a cause to the considerable damage of hepatocytes, capillary endothelium and epithelium of the bile ducts.

The leading pathobiochemical development mechanism of the ischemia-reperfusion syndrome of liver is the oxidative stress. The imbalance between the tissue necessity in oxygen and its delivery as well as the rapid increase of its partial pressure in the liver tissue after the circulative restoration provides favorable conditions for the formation of free radicals (superoxide anion, hydrogen peroxide, and hydroxyl radical). In its turn that leads to the activation of processes concerning the peroxide oxidation of lipids which causes the alteration of cellular and subcellular membrane structures of hepatocytes [3—7]. The idea of processes accompanying the ischemic reperfusion of liver may become the basis for developing new scientifically justified methods, which allow improve quality of transplant and other general operations on the organs of the hepatobiliary system and also lowering the risk of postoperative complications.

The purpose of the present research is to study the active changes in several enzymes of the anti-oxidative protection within the dynamical development of the liver reperfusion in rats.

## MATERIALS AND METHODS

The study has been performed on 95 white non-lineal adult male rats with the mass of 240—280 g. The test animals have been captivated at the educational training-and-production department (vivarium) of the Kuban State Medical University of the Ministry of Health of Russia. All studies have been performed in accordance with “The Rules Accepted in the European Convention on the Protection of

Vertebrate Animals” (Strasbourg, 1986) and has been approved by the local ethical committee of the Kuban State Medical University of the Ministry of Health of Russia. (protocol N 51 of 23.05.2017). All manipulations have been performed under the general anesthesia by means of Zoletil 100 remedy (“Virbac”, France) in proportion of 10 mg/kg intramuscular.

The control group (Group 1) has been presented by animals ( $n = 12$ ) that have been sampled blood in volume of 150 mcl from the caudal vena cava in 5, 10 and 15 minutes after the performed laparotomy. The second control group (Group 2) has been made up of animals ( $n = 10$ ) that have been sampled blood in volume of 150 mcl from the caudal vena cava in 5, 10, 15 and 20 minutes after 15-minutes-period after the performed laparotomy. The animals of the 3rd group ( $n = 15$ ) after the median laparotomy have been undergone the clamping of hepatoduodenal ligament (HDL) analogue for 15 minutes including the blood sampling in 5, 10 and 15 minutes after the ischemia beginning in volume of 150 mcl from the caudal vena cava. The animals of the 4th group ( $n = 14$ ) have been undergone the clamping of HDL analogue for 15 minutes including the blood sampling in volume of 150 mcl from the caudal vena cava in 5, 10, 15 and 20 minutes of reperfusion. To evaluate the changes on the organic level 4 groups have been formed that have been sampled the liver tissue in mass of 0,15—0,20 g. The control group (Group 1p) has been presented by animals ( $n = 10$ ), that has been sampled the liver tissue in 5, 10, 15 and 20 minutes after the performed laparotomy. The second control group (Group 2p) has been presented by animals ( $n=10$ ), that has been sampled the liver tissue in 5, 10, 15 and 20 minutes after 20 minutes after the performed laparotomy. The animals of the 3<sup>rd</sup> group ( $n = 12$ ) after the median laparotomy have been undergone the clamping of HDL analogue for 20 minutes including the blood sampling in 5, 10, 15 and 20 minutes of ischemia. The animals of the 4<sup>th</sup> group ( $n=12$ ) have been undergone the clamping



of HDL analogue for 20 minutes including the liver sampling in 5, 10, 15 and 20 minutes of reperfusion. Thus the biological material of the groups of animals have been formed has been sampled within the period of ischemia from 5 to 20 minutes and within the period of reperfusion from 5 to 20 minutes with the 5-minute interval. Since blood and liver have been sampled many times from the same animals, so for further evaluation of the influence of the blood loss and liver damage because of its partial resection the analogical control groups of rats have been formed.

To evaluate the changes of antioxidative system the activity of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), erythrocyte hemolysate and liver homogenate as well as the general antioxidative activity (AOA) in the liver homogenate have been determined. The CAT activity has been determined in accordance to the utilization of hydrogen peroxide that has been registered according to the absorption of light by 260 nm [8]. The SOD activity has been determined in accordance to the slowdown of the quercetin self-oxidation [9]. The general AOA has been determined by means of the FRAP method (Ferric Reducing/Antioxidant Power) including the excessive injections of  $\text{Fe}^{3+}$  ions and the photometric reagent, namely 2,2'-dipyridyl [10]. In the liver homogenate, the protein concentration has been determined in accordance with the Bradford protein assay including Coomassie dyes (Coomassie Brilliant Blue G-250) [11], the calculation of enzyme activity and glutathione concentration have been performed to 1 gram of protein homogenate.

The results of the study have been statistically processed by means of the system of statistical analysis Stat plus LE. The received data have been presented in form of a median (Me), 25<sup>th</sup> and 75<sup>th</sup> percentile ( $p_{0,25}/p_{0,75}$ ). Against the background of the Mann-Whitney U-test the index changes have been registered in animals of different groups while the Wilcoxon signed-rank test has been used for evaluation of the difference in indices received from animals of the same group, the difference by  $p < 0,05$  has been considered to be reliable.

## RESULTS AND DISCUSS

By the analysis of the received data, the most expressed increase of the catalase activity in the erythrocyte meal to the 10<sup>th</sup> minute of the ischemic period has been revealed by 2 times in comparison with the period of 5-minute-clamping of the HDL analogue. Besides, during the comparison with the control indices the catalase activity by the clamping of the HDL analogue for 5 minutes has been lowered by 14%. It is necessary to underline that the changes in activity of the observed enzyme in the control group of animals both during the ischemic and reperfusion period have been not detected. The further development of the ischemic and reperfusion period has been characterized by the high stable indices of the catalase activity of erythrocytes on the level of 10—12 mmol/(l x min). Only to the 20<sup>th</sup> minute of the restored circulation the small increase of the enzymatic activity by 10—20% has been observed in comparison with the same indices by the previous samplings. The activity of superoxide dismutase of erythrocytes has varied within the greater limits and its changes have not been that definite as by the changes of catalase activity. To the 5<sup>th</sup> minute of ischemia the SOD activity of the erythrocyte meal has decreased by 10%, then similarly to the changes in the catalase activity the increase by 1,9 times has been detected. In what follows the increase of the SOD activity by more 20% to the 15<sup>th</sup> minute of ischemia has been detected as well as the relatively low activity indices of this enzyme in the erythrocyte meal to the 5<sup>th</sup> minute of the restored blood circulation which has been higher than the control indices by 1,5 times. In general, the reperfusion period has been characterized by the lower values of SOD activity in comparison with the ischemic period and only to the 20<sup>th</sup> minute of reperfusion the increase in activity of this enzyme to the values of the 5-minute ischemia has manifested itself (Table 1).

The evaluation of the activity proportion for CAT/SOD has revealed it's maintaining on the level close to the one during the entire ischemia period which may characterize (including the data of the

Table 1

**The changes in the activity of enzymes of the antioxidative protection of erythrocytes by the ischemia-reperfusion of rat's liver (Me(p0,25/p0,75))**

Period	Time, min.	C-CAT, mmol/(l×min)	CAT, mmol/(l×min)	C-SOD, rel.u.	SOD, rel.u.
Ischemia	5	5,29 (4,86/5,65)	4,56* (4,28/4,89)	30,2 (28,6/32,6)	27,8* (25,4/28,9)
	10	5,08 (4,72/5,44)	10,26** (9,18/10,60)	33,0 (31,3/33,7)	51,8** (47,0/54,3)
	15	6,02 (5,55/6,34)	10,30* (9,83/10,79)	35,7^ (32,2/36,8)	61,3** (55,5/63,9)
Reperfusion	5	5,33 (4,95/5,70)	11,45* (10,57/11,80)	32,4 (30,4/34,0)	47,3** (45,6/50,1)
	10	5,25 (4,85/5,5,77)	11,09* (10,78/11,80)	31,1 (30,2/33,5)	40,0** (37,4/45,0)
	15	5,40 (5,02/5,82)	11,84* (11,48/12,35)	34,5 (31,6/36,8)	38,9* (37,3/43,5)
	20	5,23 (4,90/5,56)	13,06** (12,40/13,85)	33,5 (30,8/34,8)	48,3** (44,5/50,4)

Note: \* — statistically significant differences ( $p < 0,05$ ) in comparison with the indices of the control group; ^ — statistically significant differences ( $p < 0,05$ ) between two indices determined with the 5-minute-interval of ischemia-reperfusion. Abbreviations: CAT, SOD — the enzyme activity in rats of the test groups; C-CAT, C-SOD — the enzyme activity of the control groups.

activity increase in both enzymes by 2 times) the adaptive changes aimed at the preparation for the development of oxidative stress during the period of active restoration of the blood circulation. To a certain degree such effect may be caused by the increase in the activating influence of the superoxide anion-radical on SOD and the hydrogen peroxide — on CAT against the background of the general relative increase of the oxygen pressure in blood by the liver release out of the systemic blood stream. The reperfusion period is characterized by the increase of the CAT/SOD proportion to 1,5—1,9 units which indicates the primary generation of hydrogen peroxide and the possibly lowered resistance to the formation of superoxide anion-radical.

The enzymes of the antioxidative protection in the liver tissue have undergone changes mainly to the progressive decrease of its activity. It's interesting to underline that the CAT activity in control animals has lowered nearly to the indices by 1,5 time less than the initial. In rats that have undergone ischemia-reperfusion the catalase activity of the liver tissue has decreased by 20% to the 10<sup>th</sup> minute of the ischemic period and by more than 20% to the 20<sup>th</sup> minute of the same period in comparison with the previous value of the studied index. In gene-

ral, the indices of the catalase activity at this period of the liver damage have corresponded with the control indices.

The expressed lowering of CAT activity in average by 1,5—2 times in comparison with the control indices has been revealed in animals at the reperfusion period. The SOD activity in the liver tissue of rats from the control group has not changed in time by blood sampling without the modeling of ischemia-reperfusion. In animals of the test groups the lowering of the SOD activity of the liver has been determined by 15% to the 5<sup>th</sup> minute of ischemic damage of the organ. The reperfusion period has been characterized by the indices of SOD activity within the limits of control indices in 5—15 minutes after the restoration of blood stream including the lowered enzyme activity to the 20<sup>th</sup> minute by 25% in comparison with the control indices (Table 2). The proportion of CAT/SOD activity of liver homogenate at the ischemic period has been characterized by the values close to one (1,2—1,6 units) including the unreliable prevalence of the catalase activity. It may be necessary to the partial return of active oxygen forms to the link of the electron transference in conditions of the lowered partial oxygen pressure in the ischemic tissue and provides the more effec-

tive running of energetic metabolism. At the reperfusion period, the CAT/SOD proportion has changed towards the prevalence of the SOD activity (0.5—0.8 units). At this period, the acute increase of the

liver oxygenation has been accompanied by the hyperproduction of free radicals, first of all — of the product of monoelectronic oxygen restoration, namely the superoxide anion-radical.

Table 2

**The changes in the activity of enzymes of the antioxidative protection of rat's liver by its ischemia-reperfusion (Me(p0,25/p0,75))**

Period	Time, min	C-CAT, mmol/(l×min×g of protein)	CAT, mmol/(l×min×g of protein)	C-SOD, rel.u./g of protein	SOD, rel.u./g of protein
Ischemia	5	2,71 (2,35/2,90)	2,52 (2,30/2,78)	12,5 (11,8/12,8)	10,7* (10,2/11,1)
	10	2,17^ (2,02/2,42)	2,01^ (1,79/2,20)	11,6 (11,4/12,0)	9,0*^ (8,4/9,6)
	15	1,88 (1,60/2,03)	2,39 (2,00/2,48)	12,0 (11,7/12,4)	9,7* (9,2/10,0)
	20	1,88 (1,59/2,02)	1,72^ (1,54/1,95)	11,8 (11,5/12,3)	9,1* (8,8/9,4)
Reperfusion	5	2,31 (2,01/2,56)	1,41*^ (1,23/1,59)	11,7 (11,3/12,1)	12,4^ (11,7/12,8)
	10	2,17 (2,00/2,41)	1,61* (1,43/1,72)	11,8 (11,5/12,1)	11,8 (11,5/12,2)
	15	1,83^ (1,60/1,97)	0,80*^ (0,73/1,05)	12,0 (11,6/12,3)	12,2 (11,8/12,5)
	20	1,94 (1,64/2,10)	1,23* (0,95/1,36)	11,5 (11,3/11,9)	8,5*^ (8,0/9,0)

Note: \* — statistically significant differences (p < 0,05) in comparison with the indices of the control group; ^ — statistically significant differences (p < 0,05) between two indices determined with the 5-minute-interval of ischemia-reperfusion.

Abbreviations: CAT, SOD — the enzyme activity in rats of the test-groups; C-CAT, C-SOD — the enzyme activity of the control groups.

The research of the general antioxidative activity of the liver homogenate in control animals has revealed its restoration during the entire experiment on the level of 0.08—0.10 mg/l of vitamin C (taken as standard) for 1 gram of homogenate protein. At the period of ischemic reperfusion the general antioxidative activity has lowered already to the 5<sup>th</sup> minute of ischemia by two times and has been maintained on the level of 0.04—0.05 mg/l of vitamin C for 1 gram of homogenate during the entire experiment. At the moment of reperfusion the significant changes could be expected but it is possible that the increase of free-radical processes at that period is balanced by the supply of antioxidants from blood.

### CONCLUSION

The received data describes the changes in the enzyme activity of the first lines of the antioxidant protection and the general antioxidative activity on systemic and organic level in details during 20 minu-

tes of ischemic liver damage and at the early reperfusion period. 20-minute clamping of HDL to exclude the liver out of the systemic blood circulation by surgical interventions or the break of blood supply of the organ as a result of other reasons for 20—30 minutes are the most urgent time periods for studying the fundamental and clinical aspects of ischemic reperfusion of liver. At that time, the organ maintains its viability and it is still possible to preserve it by the circulatory restoration; by the metabolic influence on the most sensible pathogenic links the prevention of the developing liver insufficiency at late stages of reperfusion. The results of the present study have demonstrated the role of changes in the activity of catalase and superoxide dismutase of blood and liver during the observed pathological process. So the development of imbalance of CAT/SOD activity proportion by the development of the ischemic reperfusion syndrome with the change of the proportion towards the prevalence of the catalase activity on the systemic level and of the superoxide

dismutase on the organic level after the restoration of blood circulation. Besides the increase in activity of the studied enzymes in the erythrocyte meal especially at the ischemic period has been determined as well as the tendency to the progressive activity decrease of the same enzymes in the liver tissue. This proves the possible evaluation of the functional systemic state of the system of the oxidative-restorative homeostasis in animals by the ischemic reperfusion of liver; against the background of the lowered general antioxidative activity it presents the necessity of the metabolic support of this link in the system of the non-specific resistance.

#### FINANCING

The State Task of the Ministry of Health of the Russian Federation supported this work by state assignment (28.01.2015, part 1, chapter 1).

#### REFERENCES

1. Donadon M., Molinari A.F., Corazzi F., Rocchi L., Zito P., Cimino M., Costa G., Raimondi F., Torzilli G. Pharmacological modulation of ischemic-reperfusion injury during Pringle maneuver in hepatic surgery. A prospective randomized pilot study. *World Journal of Surgery*. 2016. V. 40. № 9. P. 2202—2212.
2. Guan L.-Y., Fu P.-Y., Li P.-D., Liu H.-Y., Xin M.-G., Li W. Mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and protective effects of nitric oxide. *World Journal of Gastrointestinal Surgery*. 2014. V. 6. № 7. P. 122—128.
3. Khodosovskii M.N. Correction of oxidative damage in the ischemiareperfusion syndrome of the liver. *Zhurn GrGMU*. 2016. № 4. P. 20—25.
4. Basov A.A., Bykov I.M. Change of blood antioxidant capacity of experimental animals during nutritional correction under oxidative stress. *Voprosy Pitaniia*. 2014. V. 82 (6). P. 75—81.
5. Basov A.A., Bykov I.M. Comparative characteristic of antioxidant capacity and energy content of some foods. *Voprosy Pitaniia*. 2013. V. 82 (3). P. 77—80.
6. Bykov M.I., Basov A.A. Change of parameters in prooxidant-antioxidant bile system in patients with the obstruction of bile-excreting ducts. *Medical news of North Caucasus*. 2015. V. 10 (2). P. 131—135.
7. Li J., Li R.J., Lv G.Y., Liu H.Q. The mechanisms and strategies to protect from hepatic ischemiareperfusion injury. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 2015. V. 19. № 11. P. 2036—2047.
8. Karpishchenko A.I. Handbook. Medical Laboratory Technology. Sankt-Petersburg: Intermedika, 2002.
9. Kostyuk V.A., Potapovich A.I., Kovaleva Zn.V. A simple and sensitive method of determination of superoxide dismutase activity based on the reaction of quercetin oxidation. *Voprosy meditsinskoy khimii. Problems of Medical Chemistry*. 1990;2:88—91.
10. Benzie I.F.F., Strain J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Anal. Biochem*. 1996. V. 239. № 1. P. 70—76.
11. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*. 1976. V. 72. P. 248—254.

Received 25.04.2018

Accepted 31.05.2018