

**Влияние донации оксида азота  
на выраженность митохондриальной  
дисфункции почечной ткани  
при моделировании искусственного  
кровообращения:  
экспериментальное исследование**

М.А. Тё\*<sup>id</sup>, Н.О. Каменщиков<sup>id</sup>, Ю.К. Подоксенев<sup>id</sup>,  
А.В. Мухомедзянов<sup>id</sup>, Л.Н. Маслов<sup>id</sup>, Б.Н. Козлов<sup>id</sup>

*Научно-исследовательский институт кардиологии —  
филиал ФГБНУ «Томский национальный исследовательский  
медицинский центр Российской академии наук», Томск, Россия*

**Реферат**

**АКТУАЛЬНОСТЬ:** Одним из наиболее частых осложнений при кардиохирургических операциях с искусственным кровообращением (ИК) является острое почечное повреждение. Ряд исследований показал, что донация экзогенного оксида азота (NO) уменьшает частоту острого почечного повреждения. Однако субклеточные механизмы реализации нефропротективных свойств NO остаются неизвестными. **ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ:** Изучить безопасность технологии плазмохимического синтеза оксида азота и оценить влияние доставки полученного оксида азота на митохондриальное повреждение почечной ткани при моделировании искусственного кровообращения. **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ:** В эксперимент включили 12 баранов алтайской породы. Животные были разделены на 2 группы: 6 животным моделировали ИК; 6 животным моделировали ИК с доставкой NO. Митохондриальное повреждение оценивалось по кальций-связывающей способности и по трансмембранному потенциалу митохондрий через 1 ч после отлучения от аппарата ИК. Безопасность метода доставки NO по предложенной методике оценивали по концентрации диоксида азота на вдохе, уровню метгемоглобина. Эффективность доставки NO по предложенной методике оценивали по уровню стабильных метаболитов NO: эндогенного нитрита, нитрата, общей концентрации метаболитов NO. **РЕЗУЛЬТАТЫ:** В группе животных, которым проводили доставку NO, статистически значимо выше средний уровень трансмембранного потенциала митохондрий ( $171,66 \pm 20,41$  vs  $126,66 \pm 18,61$ ;  $p = 0,00256$ )

**The effect of nitric oxide donation  
on the severity of mitochondrial  
dysfunction to the renal tissue  
in cardiopulmonary bypass simulation:  
an experimental study**

М.А. Тё\*<sup>id</sup>, N.O. Kamenshchikov<sup>id</sup>, Yu.K. Podoksenov<sup>id</sup>,  
A.V. Mukhomedzyanov<sup>id</sup>, L.N. Maslov<sup>id</sup>, B.N. Kozlov<sup>id</sup>

*Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical  
Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia*

**Abstract**

**INTRODUCTION:** Acute kidney injury is one of the common complications in cardiosurgical operations with cardiopulmonary bypass (CPB). A number of studies have shown that donation of exogenous nitric oxide (NO) reduces episodes of acute kidney injury. However, subcellular mechanisms of realization the nephroprotective properties of NO remain unknown. **OBJECTIVE:** To study the safety of the technology of plasma-chemical synthesis of nitric oxide and to evaluate the effect of the delivery resulting nitric oxide on mitochondrial damage to the renal tissue in the simulation of cardiopulmonary bypass. **MATERIALS AND METHODS:** Experiment included 12 rams of the Altai breed. Animals were divided into 2 groups: 6 animals were modeled CPB; 6 animals were simulated CPB with NO delivery. Mitochondrial damage was assessed by calcium-binding capacity and transmembrane potential of mitochondria 1 h after weaning from the CPB. The safety of the NO delivery according to the proposed method was assessed by the concentration of nitrogen dioxide on inspiration, the level of methemoglobin. The efficiency of NO delivery according to the proposed method was assessed by the level of stable NO metabolites: endogenous nitrite, nitrate and total concentration of NO metabolites. **RESULTS:** In the group of animals with NO delivery the average level of transmembrane potential of mitochondria was ( $171.66 \pm 20.41$  vs  $126.66 \pm 18.61$ ;  $p = 0.00256$ ) and calcium-binding capacity of mitochondria was ( $1466.66 \pm 216.02$  vs  $866.66 \pm 216.02$ ;  $p = 0.000712$ ) of renal parenchyma. Methemoglobin levels above the recommended thresholds in clinical practice were not recorded in the CPB+NO group. The val-

и кальций-связывающей способности митохондрий ( $1466,66 \pm 216,02$  vs  $866,66 \pm 216,02$ ;  $p = 0,000712$ ) почечной паренхимы. Содержание метгемоглобина выше рекомендованных в клинической практике пороговых значений не было зарегистрировано в группе ИК+НО. Показатели общей концентрации метаболитов NO и нитратов статистически значимо выше в группе ИК+НО по сравнению с группой ИК,  $p = 0,00006$ ;  $p = 0,0035$  соответственно. **Выводы:** Плазмохимический синтез оксида азота является безопасной технологией, а применение полученного оксида азота на фоне искусственного кровообращения приводит к снижению выраженности митохондриальной дисфункции в паренхиме почек.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** оксид азота, острое почечное повреждение, митохондрии, искусственное кровообращение

\* *Для корреспонденции:* Тё Марк Артурович — младший научный сотрудник лаборатории медицины критических состояний, Научно-исследовательский институт кардиологии — филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», Томск, Россия; e-mail: marik640213@gmail.com

✉ *Для цитирования:* Тё М.А., Каменщиков Н.О., Подоксенев Ю.К., Мухомедзянов А.В., Маслов Л.Н., Козлов Б.Н. Влияние донации оксида азота на выраженность митохондриальной дисфункции почечной ткани при моделировании искусственного кровообращения: экспериментальное исследование. Вестник интенсивной терапии им. А.И. Салтанова. 2023;4:176–184. <https://doi.org/10.21320/1818-474X-2023-4-176-184>

✉ *Поступила:* 20.03.2023

✉ *Принята к печати:* 04.09.2023

✉ *Дата онлайн-публикации:* 31.10.2023

ues of total concentration of NO metabolites and nitrate in the CPB+NO group compared to the CPB group are statistically significantly higher,  $p = 0.00006$ ;  $p = 0.0035$ , respectively. **CONCLUSIONS:** Plasma-chemical synthesis of nitric oxide is a safe technology, and the use of the resulting nitric oxide in cardiopulmonary bypass leads to a decrease in the severity of mitochondrial dysfunction in the kidney parenchyma.

**KEYWORDS:** nitric oxide, acute kidney injury, mitochondria, cardiopulmonary bypass

\* *For correspondence:* Mark A. Tyo — Research Assistant, Laboratory of Critical Care Medicine, Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences Tomsk, Russia; e-mail: marik640213@gmail.com

✉ *For citation:* Tyo M.A., Kamenshchikov N.O., Podoksenov Yu.K., Mukhomedyanov A.V., Maslov L.N., Kozlov B.N. The effect of nitric oxide donation on the severity of mitochondrial dysfunction to the renal tissue in cardiopulmonary bypass simulation: an experimental study. Annals of Critical Care. 2023;4:176–184. <https://doi.org/10.21320/1818-474X-2023-4-176-184>

✉ *Received:* 20.03.2023

✉ *Accepted:* 04.09.2023

✉ *Published online:* 31.10.2023

DOI: 10.21320/1818-474X-2023-4-176-184

## Введение

Количество кардиохирургических операций в условиях искусственного кровообращения (ИК) увеличивается с каждым годом, внедряются новые технологии периоперационного обеспечения, совершенствуются методики выполнения операций [1]. Несмотря на это частота послеоперационных осложнений остается высокой.

Одним из наиболее частых осложнений кардиохирургических вмешательств с ИК является острое почеч-

ное повреждение (ОПП). Проведение ИК является самостоятельным интраоперационным фактором риска ОПП и связано с активацией нейроэндокринных и метаболических стрессовых реакций, вызванных ишемически-реперфузионным повреждением, системной воспалительной реакцией, окислительным стрессом, гемолизом и снижением почечного перфузионного давления [2–4].

ОПП в послеоперационном периоде диагностируется у 30–52 % больных, при этом от 2 до 5 % требуют проведения заместительной почечной терапии [5]. Даже рутинные в настоящее время операции аортокоронарного

шунтирования могут сопровождаться развитием ОПП в 54 % случаев [6], а при определенных типах вмешательства (мультиклапанная хирургия, реконструктивные вмешательства на аорте) частота ОПП может возрастать до 70 % с потребностью в заместительной почечной терапии в 16 % случаев [7].

ОПП резко ухудшает исходы кардиохирургических интервенций: увеличивает время пребывания пациентов в отделении реанимации, период госпитализации и 30-дневную летальность [8]. Даже легкие формы ОПП ассоциированы с повышенной летальностью [9].

ИК связано с изменениями внутрипочечного кровотока, локальным дефицитом оксида азота (NO) и микроциркуляторной вазоконстрикцией, из-за чего нарушается соотношение между доставкой и потребностью в кислороде и питательных субстратов, что приводит к ишемически-реперфузионному повреждению [2, 10].

Ведется активный поиск фармакологических препаратов и немедикаментозных интервенций для осуществления нефропротекции у кардиохирургических пациентов.

В последнее время большое внимание уделяется методам донации экзогенного NO как средства фармакологического прекондиционирования и органопротекции [11, 12].

В серии рандомизированных клинических исследований периоперационная доставка экзогенного NO снижала количество эпизодов ОПП [7, 13].

Для широкого внедрения в практику необходимо идентифицировать механизмы реализации защитных эффектов NO, а также валидировать новые технологии его синтеза для применения в клинической практике.

## Цель исследования

Изучить безопасность технологии плазмохимического синтеза оксида азота и оценить влияние доставки полученного оксида азота на митохондриальную дисфункцию почечной ткани при моделировании искусственного кровообращения.

## Материалы и методы

В одноцентровое проспективное экспериментальное исследование были включены 12 баранов алтайской породы массой 30–34 кг, содержащихся в условиях конвенционального вивария. Все животные были распределены методом конвертов на 2 равные группы.

- В группу ИК вошли 6 баранов, которым проводили стандартный протокол ИВЛ и ИК.
- В группу ИК+NO вошли 6 баранов, которым доставляли NO в дозировке 80 миллионных долей

(ppm) через модифицированный контур аппарата искусственной вентиляции легких (ИВЛ) и в контур аппарата ИК.

## Методика обеспечения операции

Эксперимент начинали с ингаляционной седации севофлураном. После достижения седативного эффекта устанавливали периферический катетер в большую подкожную вену задней конечности. Внутривенно проводили премедикацию атропином 0,5 мг и хлоропирамином 20 мг. Индукцию анестезии выполняли дробным введением пропофола 1 % в дозе 5 мг/кг. На фоне сохраненного спонтанного дыхания выполняли прямую ларингоскопию и интубацию трахеи эндотрахеальной трубкой № 6,5. После верификации положения эндотрахеальной трубки начинали ИВЛ в режиме Controlled Mandatory Ventilation с управлением по объему 8 мл/кг, частотой дыхательных движений 20 в мин, фракционной концентрацией кислорода во вдыхаемой смеси 50 % и положительным конечно-эксспираторным давлением 5 см вод. ст. Поддержание анестезии на всех этапах осуществляли инфузией пропофола 5 мг/кг/ч. Нервно-мышечная блокада достигалась введением пипекурония бромида 0,1 мг/кг. Хирургическим путем выделяли и катетеризировали общую сонную артерию с целью мониторинга инвазивного давления, контроля газового состава крови, а также внутреннюю яремную вену для проведения инфузионной терапии, забора крови на анализы. На протяжении всего эксперимента использовали расширенный анестезиологический мониторинг: анализ электрокардиографии, капнометрию, пульсоксиметрию, инвазивное измерение артериального давления, чреспищеводную термометрию.

Оперативный доступ проводили путем правосторонней торакотомии в 4–5-м межреберье. Проводили выделение магистральных сосудов, вскрывали полость перикарда.

Для обеспечения гипокоагуляции вводили гепарин в дозе 300 МЕ/кг до достижения целевого времени активированного свертывания > 450 с.

Подключение аппарата ИК осуществляли по схеме «аорта — верхняя полая вена — нижняя полая вена». ИК проводили в условиях нормотермии в непальсирующем режиме с перфузионным индексом 2 л/мин/м<sup>2</sup>. Среднее артериальное давление во время ИК поддерживали на уровне 65 мм рт. ст. В качестве препарата для вазопрессорной поддержки использовали норэпинефрин в дозе 0,05–0,2 мкг/кг/мин. Продолжительность ИК составила 90 мин, после чего экспериментальные животные были отлучены от ИК, забор биопсийного материала (паренхима почки) проводился через 1 ч после перевода экспериментальных животных на спонтанное кровообращение. Так мы смоделировали состояние митохондрий в условиях продленного ИК.

## Методика доставки оксида азота

Подачу NO и мониторинг концентрации NO и диоксида азота ( $\text{NO}_2$ ) в группе ИК+NO на всех этапах проводили с помощью образца установки плазмохимического синтеза оксида азота АИТ-NO-01 «Тианокс» (ФГУП «РФЯЦ-ВНИИЭФ», Россия) (рис. 1).

Аппарат обеспечивает синтез NO-содержащей газовой смеси в разрядной камере в импульсно-периодическом разряде из воздуха непосредственно во время проведения терапии. Синтезированный газ поступает в блок очистки, где происходит химическая адсорбция  $\text{NO}_2$ . Очищенный NO поступает в модифицированные контуры аппаратов ИВЛ и ИК. Для анализа газовой смеси используются электрохимические измерительные датчики NO,  $\text{NO}_2$ .

В группе ИК+NO сразу после интубации трахеи и до начала ИК осуществляли подачу NO в модифициро-

ванный контур ИВЛ в дозе 80 ppm. Для этого на линию вдоха встраивали 2 гидрофобных вирусно-бактериальных фильтра с разъемом Люера: через проксимальный производили подачу NO, через дистальный — анализ NO/ $\text{NO}_2$ .

Сразу после начала ИК и до восстановления сердечной деятельности в группе ИК+NO осуществляли доставку NO в модифицированный контур экстракорпоральной циркуляции в дозе 80 ppm. Для этого в линию подачи газовой смеси встраивали 2 переходника  $\frac{1}{4}$  с разъемом Люера: через проксимальный производили подачу NO, через дистальный — анализ NO/ $\text{NO}_2$ .

После отлучения от ИК в группе ИК+NO подачу NO осуществляли через модифицированный контур ИВЛ в течение 1 ч.

Животные, вошедшие в группу ИК, получали в контуры ИВЛ и оксигенатор аппарата ИК стандартную кислородно-воздушную смесь, не содержащую NO, в течение операции и 1 ч после нее.

## Методика оценки безопасности терапии оксидом азота

Уровень  $\text{NO}_2$  в газовой смеси, доставляемой в контур аппарата ИВЛ и оксигенатор аппарата ИК, контролировали непрерывно на протяжении всего эксперимента.

Уровень метгемоглобина (MetHb) в периферической крови контролировали методом отражающей фотометрии. Получение образцов крови осуществляли после интубации, перед началом ИК, а также через 60 мин после отлучения от аппарата ИК.

## Методика определения концентрации стабильных метаболитов оксида азота

Определение концентрации эндогенного нитрита ( $\text{eNO}_2$ ) и нитрата ( $\text{NO}_3$ ), а также общую концентрацию метаболитов NO (Total NO) производили ферментативным колориметрическим методом сразу после интубации, на старте ИК и через 60 мин после отлучения от ИК.

## Методика определения трансмембранного потенциала митохондрий

После специальной подготовки биоптатов почечной паренхимы трансмембранный потенциал митохондрий ( $\Delta\psi$ ) измеряли с помощью спектрофлуориметра с использованием катионного флуоресцентного зонда этилового эфира тетраметилродамина. О величине  $\Delta\psi$  судили по падению интенсивности флуоресценции после добавления в среду инкубации 100 нмоль/л FCCP (carbonylcyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazine). Величина  $\Delta\psi$  митохондрий представлена как разница интенсивности флуоресценции до и после добавления FCCP (ЕД) в пересчете на единицу массы белка в суспензии митохондрий (мг).



Рис. 1. Образец установки плазмохимического синтеза оксида азота АИТ-NO-01 «Тианокс»

Fig. 1. Equipment for plasma-chemical synthesis of nitric oxide АИТ-NO-01 "Tianox"

**Методика определения кальций-связывающей способности митохондрий**

После специальной подготовки биоптатов почечной паренхимы кальций-связывающую способность (КСС) митохондрий оценивали с использованием спектрофлуориметра и Ca<sup>2+</sup>-чувствительного флуоресцентного красителя CalciumGreen-5N. Длина волны возбуждения составляла λ<sub>Ex</sub> = 555 нм; длина волны излучения λ<sub>Em</sub> = 577 нм.

**Статистический анализ**

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием пакета программ STATISTICA 10. Проверку согласия с нормальным законом проводили с помощью критерия Шапиро—Уилка. При описании количественных показателей использовали среднее значение (M) и стандартное отклонение (SD). Для выявления статистически значимых различий количественных показателей в независимых и зависимых группах использовали критерий Стьюдента для независимых и зависимых групп. Все результаты статистического анализа считали статистически значимыми при пороговом уровне значимости *p* = 0,05. Сравнение непрерывных данных для трех групп осуществляли с помощью повторных измерений ANOVA, апостериорные сравнения выполняли с учетом поправки Бонферрони.

**Результаты исследования**

При применении NO в дозе 80 ppm по описанной методике в группе ИК+NO не отмечено повышение концентрации NO<sub>2</sub> выше допустимых значений в доставляемой в контур аппарата ИВЛ и оксигенатор аппарата ИК газовой смеси. Средняя концентрация NO<sub>2</sub> в груп-

пе ИК+NO на протяжении всего периода эксперимента составила 1,0 ± 0,17 (min = 0,8, max = 1,3).

Содержание MetHb выше рекомендованных пороговых значений не было зарегистрировано в группе ИК+NO ни на одном из этапов экспериментального исследования. Средняя концентрация MetHb в группе ИК+NO на 60 мин после отлучения от ИК составила 2,20 ± 0,34 (min = 1,8, max = 2,6).

Данные по уровням eNO<sub>2</sub>, Total NO, NO<sub>3</sub> на этапах исследования представлены в табл. 1.

Статистически значимых различий по уровню eNO<sub>2</sub> между группами ИК и ИК+NO на каждом из трех этапов наблюдения нет.

Значения показателя Total NO в группе ИК+NO по сравнению с группой ИК статистически значимо выше на каждом из трех этапов наблюдения, *p* = 0,00006. Между этапами «интубация», «начало ИК» и «60 мин после отлучения от ИК» в группе ИК статистически значимых различий по показателю Total NO нет. В группе ИК+NO показатель Total NO статистически значимо выше между этапами «интубация» и «начало ИК», *p* = 0,01076 (рис. 2).

Значения показателя NO<sub>3</sub> в группе ИК+NO по сравнению с группой ИК статистически значимо выше на каждом из трех этапов наблюдения, *p* = 0,0035. Между этапами «интубация», «начало ИК» и «60 мин после отлучения от ИК» в группе ИК статистически значимых различий по показателю NO<sub>3</sub> нет. В группе ИК+NO показатель NO<sub>3</sub> статистически значимо выше между этапами «интубация» и «начало ИК», *p* = 0,014; между этапами «интубация» и «60 мин после отлучения от ИК», *p* = 0,00517 (рис. 3).

Показатели Δψ митохондрий в биоптатах почек через 60 мин после отлучения от ИК составляли в группе ИК 126,66 ± 18,61 ЕД/мг белка vs 171,66 ± 20,41 ЕД/мг белка в группе ИК+NO. В группе ИК+NO статистически значимо выше уровень Δψ митохондрий, *p* = 0,00256, мощность вывода о различиях — 84,5%.

**Таблица 1.** Концентрация eNO<sub>2</sub>, Total NO, NO<sub>3</sub> в группах ИК и ИК+NO на этапах экспериментального исследования, M ± SD

**Table 1.** The concentration of eNO<sub>2</sub>, Total NO, NO<sub>3</sub> in the CPB and CPB + NO groups at the stages of the experimental study

Этап исследования	eNO <sub>2</sub> , мкмоль/л ИК	eNO <sub>2</sub> , мкмоль/л ИК+NO	NO <sub>2</sub> total, мкмоль/л ИК	NO <sub>2</sub> total, мкмоль/л ИК+NO	NO <sub>3</sub> , мкмоль/л ИК	NO <sub>3</sub> , мкмоль/л ИК+NO
Интубация трахеи	5,97 ± 0,671	6,92 ± 1,686	24,21 ± 1,797	43,92 ± 15,281	18,21 ± 1,591	37,02 ± 14,435
Начало ИК	6,07 ± 0,624	6,89 ± 0,736	28,21 ± 1,491	64,10 ± 14,733	22,21 ± 1,797	57,21 ± 14,885
60 мин после отлучения от ИК	6,78 ± 1,486	7,31 ± 1,138	25,09 ± 2,179	55,88 ± 9,177	18,376 ± 2,098	45,85 ± 9,402

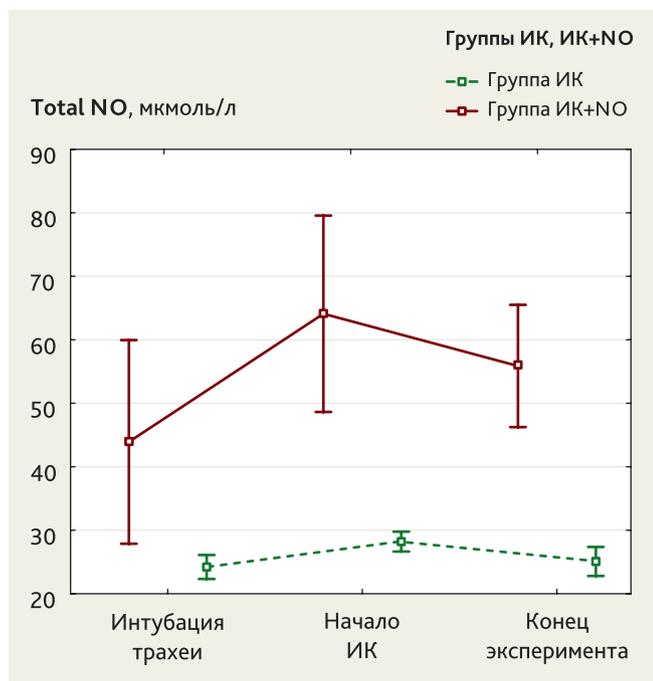


Рис. 2. Диаграмма средних значений и их 95 % доверительных интервалов для показателя Total NO (мкмоль/л) в группах ИК, ИК+НО

Fig. 2. Diagram of means and their 95 % confidence intervals for Total NO ( $\mu\text{mol/l}$ ) in the CPB, CPB+NO groups

Межгрупповые различия  $\Delta\psi$  митохондрий (ЕД/мг белка) в группах ИК, ИК+НО представлены на рис. 4.

Показатели КСС митохондрий в биоптатах почек через 60 мин после отлучения от ИК составляли в группе ИК  $866,66 \pm 216,02$  Нмоль  $\text{CaCl}_2/\text{мг}$  белка vs  $1466,66 \pm 216,02$  Нмоль  $\text{CaCl}_2/\text{мг}$  белка в группе ИК+НО. В группе ИК+НО статистически значимо выше уровень КСС митохондрий,  $p = 0,000712$ , мощность вывода о различиях — 96,8 %.

Межгрупповые различия в КСС митохондрий (Нмоль  $\text{CaCl}_2/\text{мг}$  белка) в биоптатах почек через 60 мин после отлучения от ИК в группах ИК, ИК+НО представлены на рис. 5.

## Обсуждение

Для подачи NO и мониторинга концентрации NO/NO<sub>2</sub> мы использовали новый образец установки плазмохимического синтеза NO АИТ-NO-01 «Тианокс». Несмотря на то что мы использовали допустимую и общепринятую в клинической практике дозу NO [14], большое внимание уделили безопасности проводимой терапии. NO является крайне реактогенным соединением и в присутствии кислорода вступает с ним в химическую реакцию с образованием NO<sub>2</sub> — чрезвычайно токсичного газа, допустимый уровень которого не должен превышать 3 ppm [15].

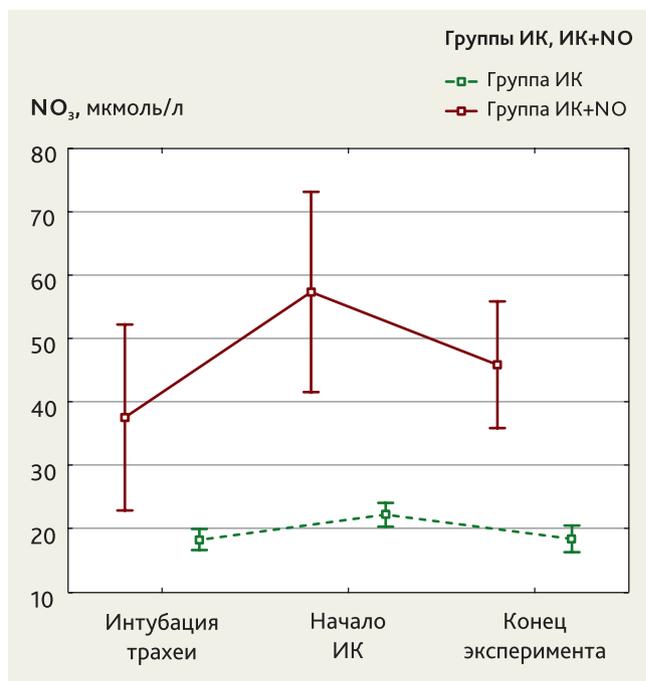


Рис. 3. Диаграмма средних значений и их 95 % доверительных интервалов для показателя NO<sub>3</sub> (мкмоль/л) в группах ИК, ИК+НО

Fig. 3. Diagram of means and their 95 % confidence intervals for NO<sub>3</sub> ( $\mu\text{mol/l}$ ) in the CPB, CPB+NO groups

Нами не отмечено повышение концентрации NO<sub>2</sub> более 1,3 ppm в доставляемой в контур аппарата ИВЛ и оксигенатор аппарата ИК газовой смеси.

NO относится к метгемоглобинообразователям, поэтому для исключения отравления необходим тщательный мониторинг уровня MetHb в крови [16]. Максимальный уровень MetHb должен поддерживаться на уровне менее 5 % от общей концентрации гемоглобина. Доставка NO по указанной методике не приводила к повышению содержания MetHb выше рекомендованных пороговых значений.

Таким образом, применение NO-кондиционирования с использованием образца установки плазмохимического синтеза NO при моделировании ИК является безопасной методикой.

Для непрямого определения NO в крови используются стабильные метаболиты NO — Total NO, eNO<sub>2</sub> и NO<sub>3</sub>. На всех этапах исследования между группами ИК и ИК+НО получены статистически значимые различия в концентрации Total NO и NO<sub>3</sub> с увеличением данных показателей в группе ИК+НО. Это указывает на эффективность возмещения периоперационного дефицита эндогенного NO с применением экзогенного NO, полученного методом плазмохимического синтеза.

Для широкого внедрения в клиническую практику необходимо идентифицировать субклеточные механизмы

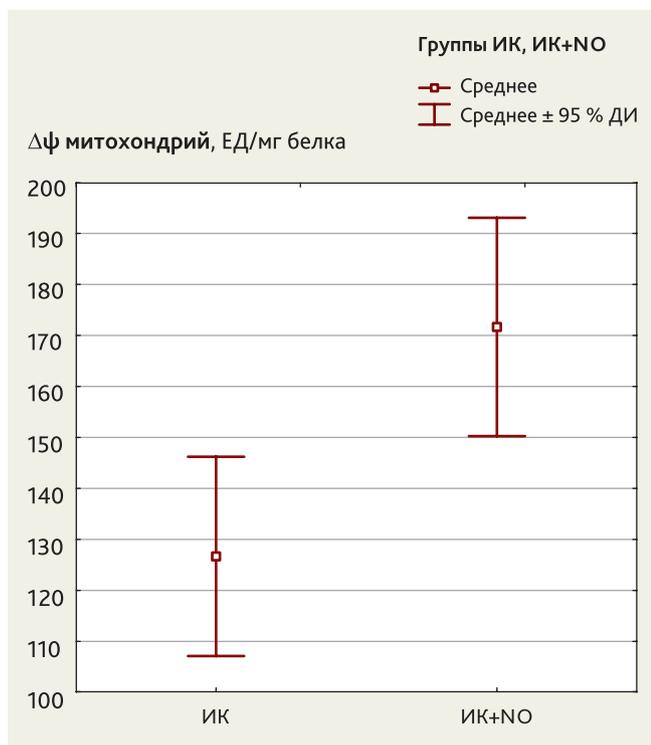


Рис. 4. Диаграмма средних значений и их 95 % доверительных интервалов для показателя Δψ митохондрий (Ед/мг белка) в группах стандартного ИК, ИК+НО

Fig. 4. Diagram of means and their 95 % confidence intervals for mitochondrial Δψ (Ed/mg protein) in the groups CPB, CPB+NO

реализации защитных эффектов NO. Основным источником энергии в большинстве клеток являются митохондрии, исключение составляют эритроциты. Митохондрии являются основным источником энергии в виде молекул аденозинтрифосфата (АТФ), принимают непосредственное участие в поддержании ионного гомеостаза в клетке, осуществляют генерацию активных форм кислорода, а также могут быть триггерами апоптоза [17, 18].

Митохондрии преобразуют химическую энергию, образовавшуюся в процессе окислительного фосфорилирования, в протонный электрохимический потенциал на внутренней мембране путем переноса протонов (H<sup>+</sup>) из матрикса в межмембранное пространство. Таким образом, наружная часть внутренней мембраны заряжается положительно, а внутренняя отрицательно, так формируется Δψ митохондрий. При достижении определенного протонного градиента происходит активация фермента АТФ-синтазы, в ней открывается канал, через который протоны возвращаются в матрикс из межмембранного пространства. Выделившаяся энергия используется для синтеза АТФ [19].

Митохондрии наравне с саркоплазматическим ретикулом являются одной из основных буферных систем для Ca<sup>2+</sup>. Они обладают способностью переносить высокие концентрации Ca<sup>2+</sup> в митохондриальный матрикс, где

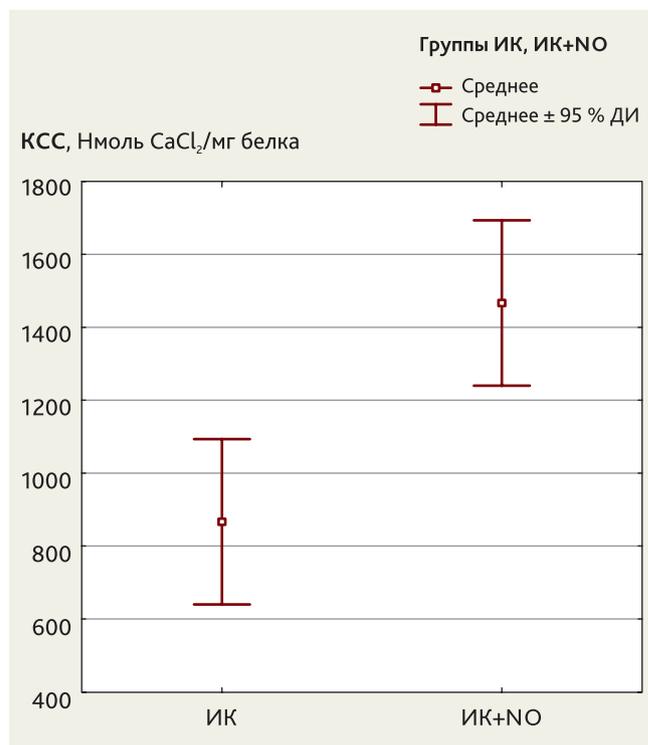


Рис. 5. Диаграмма средних значений и их 95 % доверительных интервалов для показателя КСС (Нмоль CaCl<sub>2</sub>/мг белка) в группах стандартного ИК, ИК+НО

Fig. 5. Diagram of means and their 95 % confidence intervals for CBC (Nm CaCl<sub>2</sub>/mg protein) in the CPB, CPB+NO groups

этот ион образует комплексы с неорганическими и другими фосфатами. Транспорт ионов Ca<sup>2+</sup> внутрь митохондрий осуществляется Ca<sup>2+</sup>-унипортером за счет энергии Δψ митохондрий, т.е. без участия АТФ. Выброс Ca<sup>2+</sup> из митохондрий осуществляет Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-обменник [20].

При ишемически-реперфузионном органном повреждении, ассоциированном с ИК [2–4], происходит снижение эффективности окислительного фосфорилирования за счет нарушения соотношения между доставкой и потребностью в кислороде и субстратах. АТФ-синтаза митохондрий, в норме перекачивающая протоны из межмембранного пространства в матрикс органелл, при ишемии начинает работать в обратном направлении для поддержания Δψ, синтез АТФ митохондриями снижается или прекращается [21].

Активация анаэробного гликолиза, лактатацидоз, а также гидролиз АТФ во время ишемии-реперфузии приводят к значительному снижению внутриклеточного рН. Накопление H<sup>+</sup> активирует Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-антипортер, это приводит к увеличению содержания внутриклеточных ионов Na<sup>+</sup>. Накопление Na<sup>+</sup> также обусловлено снижением активности Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-АТФ-азы из-за снижения внутриклеточной концентрации АТФ. Увеличение содержания Na<sup>+</sup> вызывает инверсию работы Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-антипортера и способствует подъему концентрации Ca<sup>2+</sup>

внутри клетки [22]. Образующийся при ишемии-реперфузии избыток  $\text{Ca}^{2+}$  в саркоплазме захватывается митохондриями. Поглощение избытка  $\text{Ca}^{2+}$  митохондриями позволяет компенсировать перегрузку данными ионами цитоплазмы во время ишемии. Вместе с тем известно, что избыток ионов  $\text{Ca}^{2+}$  во время реперфузии усугубляет ишемически-реперфузионное повреждение (кальциевый парадокс) — это связано с наличием в митохондриях МРТ-пор, чувствительных к концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  [23]. Открытие МРТ-поры приводит к падению  $\Delta\psi$  и прекращению синтеза АТФ митохондриями, что в конечном итоге ведет к гибели клетки с высокими потребностями в АТФ, например, клеток почечной ткани [24].

NO является важным сигнальным фактором в реализации цитопротекции при ишемически-реперфузионном повреждении. При воздействии на клетку ишемии и дальнейшей реперфузии активируются аутокоидные рецепторы, встроенные в плазматическую мембрану клетки, что приводит к образованию NO с помощью фермента NO-синтазы. NO активирует гуанилатциклазу, которая образует циклический гуанозинмонофосфат, приводящую к открытию митохондриальных  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -каналов, образованию активных форм кислорода, активации протеинкиназы C, увеличению  $\Delta\psi$  и цитопротекции [25]. NO, регулируя деятельность коннексинов, также контролирует и внутримитохондриальный  $\text{Ca}^{2+}$  гомеостаз [26], препятствует открытию МРТ-пор и запуску апоптоза. ИК связано с дефицитом NO, что лишает клетку естественной защиты и усугубляет ишемически-реперфузионное повреждение [2, 10].

Устраняя эндогенный дефицит NO экзогенной доставкой, мы уменьшаем выраженность ишемически-реперфузионного повреждения за счет снижения митохондриального повреждения.

Повышение  $\Delta\psi$  в группе ИК+NO говорит об увеличении эффективности синтеза АТФ, а повышение КСС митохондрий говорит о лучшей выживаемости клеток в неблагоприятных условиях.

### Ограничения исследования

Исследование имеет ряд ограничений, которые стоит учитывать. Мы не моделировали кардиохирургическую операцию, не производили пережатие аорты и не выполняли кардиоплегию.

Наше исследование обеспечивает основу для дальнейших клинических и фундаментальных исследований.

### ORCID авторов:

Тё М.А. — 0000-0003-2672-6136

Каменщиков Н.О. — 0000-0003-4289-4439

Подоксенов Ю.К. — 0000-0002-8939-2340

## Заключение

Плазмохимический синтез NO является безопасной технологией, а применение полученного NO на фоне искусственного кровообращения приводит к снижению выраженности митохондриальной дисфункции в паренхиме почек.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Disclosure.** The authors declare that they have no competing interests.

**Вклад авторов.** Все авторы в равной степени участвовали в разработке концепции статьи, получении и анализе фактических данных, написании и редактировании текста статьи, проверке и утверждении текста статьи.

**Author contribution.** All authors according to the ICMJE criteria participated in the development of the concept of the article, obtaining and analyzing factual data, writing and editing the text of the article, checking and approving the text of the article.

**Этическое утверждение.** Проведение исследования было одобрено локальным этическим комитетом «Научно-исследовательский институт кардиологии» ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», протокол № 230 от 28.06.2022.

**Ethics approval.** This study was approved by the local Ethical Committee of Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center (reference number: 230-28.063.2022).

**Информация о финансировании.** Грант Министерства высшего образования и науки на создание новой лаборатории «Лаборатория медицины критических состояний» (Распоряжение Минобрнауки России МН-8/1284 от 24.10.2022).

**Funding source.** Grant of the Ministry of Higher Education and Science for the creation of a new laboratory “Laboratory of Critical Care Medicine” (Decree of the Ministry of Education and Science of Russia MN-8/1284 dated 10/24/2022).

**Декларация о наличии данных.** Данные, подтверждающие выводы этого исследования, можно получить у корреспондирующего автора по обоснованному запросу.

**Data Availability Statement.** The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Мухомедзянов А.В. — 0000-0003-1808-556X

Маслов Л.Н. — 0000-0002-6020-1598

Козлов Б.Н. — 0000-0002-0217-7737

Литература/References

- [1] Бокерия Л.А. Современные тенденции развития сердечно-сосудистой хирургии (20 лет спустя). *Анналы хирургии*. 2016; 21(1–2): 10–9. DOI: 10.18821/1560-9502-2016-21-1-10-18 [Bockeria L.A. Modern trends in the development of cardiovascular surgery. *Annals of Surgery, Russian journal*. 2016; 21(1–2): 10–9. DOI: 10.18821/1560-9502-2016-21-1-10-18 (In Russ)]
- [2] Kumar A.B., Suneja M., Riou B. Cardiopulmonary bypass-associated acute kidney injury. *Anesthesiology*. 2011; 114(4): 964–70. DOI: 10.1097/aln.0b013e318210f86a
- [3] Huen S.C., Parikh C.R. Predicting acute kidney injury after cardiac surgery: A systematic review. *Ann Thorac Surg*. 2012; 93(1): 337–47. DOI: 10.1016/j.athoracsur.2011.09.010
- [4] Billings F.T., Pretorius M., Schildcrout J.S., et al. Obesity and oxidative stress predict AKI after cardiac surgery. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2012; 23(7): 1221–8. DOI: 10.1681/asn.2011090940
- [5] O'Neal J.B., Shaw A.D., Billings F.T. Acute kidney injury following cardiac surgery: Current understanding and future directions. *Crit Care*. 2016; 20(1): 187. DOI: 10.1186/s13054-016-1352-z
- [6] Kertai M.D., Zhou S., Karhausen J.A., et al. Platelet counts, acute kidney injury, and mortality after coronary artery bypass grafting surgery. *Anesthesiology*. 2016; 124(2): 339–52. DOI: 10.1097/aln.0000000000000959
- [7] Lei C., Berra L., Rezoagli E., et al. Nitric oxide decreases acute kidney injury and stage 3 chronic kidney disease after cardiac surgery. *Am J Respir Crit Care Med*. 2018; 198(10): 1279–87. DOI: 10.1164/rccm.201710-2150oc
- [8] Bedford M., Stevens P.E., Wheeler T.W.K., Farmer C.K.T. What is the real impact of acute kidney injury? *BMC Nephrol*. 2014; 15(1): 95. DOI: 10.1186/1471-2369-15-95
- [9] Hobson C.E., Yavas S., Segal M.S., et al. Acute kidney injury is associated with increased long-term mortality after cardiothoracic surgery. *Circulation*. 2009; 119(18): 2444–53. DOI: 10.1161/circulationaha.108.800011
- [10] Bellomo R., Auriemma S., Fabbri A., et al. The pathophysiology of cardiac surgery-associated acute kidney injury (CSA-AKI). *Int J Artif Organs*. 2008; 31(2): 166–78. DOI: 10.1177/039139880803100210
- [11] Al-Otaibi K.E., Al Elaiwi A.M., Tariq M., et al. Simvastatin attenuates contrast-induced nephropathy through modulation of oxidative stress, proinflammatory myeloperoxidase, and nitric oxide. *Oxid Med Cell Longev*. 2012; 2012: 1–8. DOI: 10.1155/2012/831748
- [12] Andrade L., Campos S.B., Seguro A.C. Hypercholesterolemia aggravates radiocontrast nephrotoxicity: Protective role of L-arginine. *Kidney Int*. 1998; 53(6): 1736–42. DOI: 10.1046/j.1523-1755.1998.00906.x
- [13] Kamenshchikov N.O., Anfinogenova Y.J., Kozlov B.N., et al. Nitric oxide delivery during cardiopulmonary bypass reduces acute kidney injury: A randomized trial. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2022; 163(4): 1393–403. DOI: 10.1016/j.jtcvs.2020.03.182
- [14] Göthberg S., Edberg K.E. Inhaled nitric oxide to newborns and infants after congenital heart surgery on cardiopulmonary bypass: A dose-response study. *Scand Cardiovasc J*. 2000; 34(2): 154–8. DOI: 10.1080/14017430050142161
- [15] Miller C., Miller M., McMullin B., et al. A phase I clinical study of inhaled nitric oxide in healthy adults. *J Cyst Fibros*. 2012; 11(4): 324–31. DOI: 10.1016/j.jcf.2012.01.003
- [16] Young J.D., Dyar O., Xiong L., Howell S. Methaemoglobin production in normal adults inhaling low concentrations of nitric oxide. *Intensive Care Medicine*. 1994; 20(8): 581–4. DOI: 10.1007/bf01705726
- [17] Lehninger A.L. *Biochemistry: The Molecular Basis of Cell Structure and Function (Second Edition)*. New York: Worth Publishers. 1978; 1104 p.
- [18] Сенокосова Е.А., Крутицкий С.С., Груздева О.В. и др. Исследование антиоксидантного эффекта митохондриально-направленного антиоксиданта SkQ1 на модели изолированного сердца крысы. *Общая реаниматология*. 2022; 18(4): 36–44. DOI: 10.15360/1813-9779-2022-4-36-44 [Senokosova E.A., Krutitsky S.S., Gruzdev O.V., et al. The Antioxidant Effect of Mitochondrially Targeted Antioxidant SkQ1 on the Isolated Rat Heart Model. *General Reanimatology*. 2022; 18(4): 36–44. DOI: 10.15360/1813-9779-2022-4-36-44 (In Russ)]
- [19] Северин Е.С. *Биологическая химия*. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. 624 с. [Severin E.S. *Biologicheskaya himiya*. М.: GEOTAR-Media, 2011. 624 p. (In Russ)]
- [20] Белослудцев К.Н., Дубинин М.В., Белослудцева Н.В., Мирнова Г.Д. Транспорт ионов Ca<sup>2+</sup> митохондриями: механизмы, молекулярные структуры и значение для клетки. *Биохимия*. 2019; 84(6): 759–75. DOI: 10.1134/s0320972519060022 [Belosludcev K.N., Dubinin M.V., Belosludceva N.V., Mironova G.D. Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> transport: mechanisms, molecular structures, and a significance for cells. *Biochemistry (Moscow)*. 2019; 84(6): 759–75. DOI: 10.1134/s0320972519060022 (In Russ)]
- [21] Nicholls D.G., Ferguson S.J. *Bioenergetics Fourth Edition*. New York: Academic Press, 2013. 434 p. ISBN 9780123884251
- [22] Piper H.M., Balsler C., Ladilov Y.V., et al. The role of NA<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange in ischemia-reperfusion. *Basic Res Cardiol*. 1996; 91(3): 191–202. DOI: 10.1007/bf00788905
- [23] Murphy E., Steenbergen C. Mechanisms underlying acute protection from cardiac ischemia-reperfusion injury. *Physiol Rev*. 2008; 88(2): 581–609. DOI: 10.1152/physrev.00024.2007
- [24] Naryzhnaya N.V., Maslov L.N., Oeltgen P.R. Pharmacology of mitochondrial permeability transition pore inhibitors. *Drug Dev Res*. 2019; 80(8): 1013–30. DOI: 10.1002/ddr.21593
- [25] Shvedova M., Anfinogenova Y., Popov S.V., Atochin D.N. Connexins and nitric oxide inside and outside mitochondria: Significance for cardiac protection and adaptation. *Frontiers in Physiology*. 2018; 9(479). DOI: 10.3389/fphys.2018.00479
- [26] Guo R., Si R., Scott B.T., Makino A. Mitochondrial Connexin40 regulates mitochondrial calcium uptake in coronary endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2017; 312(4): 398–406. DOI: 10.1152/ajpcell.00283.2016