

8. Активность трипсиноподобных протеиназ и деградация коллагена слизистой оболочки кишечника при язвенных заболеваниях желудочно-кишечного тракта / О.Е. Акбашева, В.А. Бурковская, А.Е. Деханд [и др.] // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2010. – Т. XX., №2. – С. 62 – 66.
9. Кубышкин А.В. Эластолитическая активность бронхоальвеолярного лаважа при моделировании воспалительного процесса в легких / А.В. Кубышкин, И.И. Фомочкина // Український біохімічний журнал. – Т. 80, № 1. – С. 89-95.

Резюме

СТАН ПРОТЕЇНАЗ-ІНГІБІТОРНОЇ СИСТЕМИ СИРОВАТКИ КРОВІ І БРОНХОАЛЬВЕОЛЯРНОГО ЗМИВА В ДИНАМІЦІ РОЗВИТКУ РЕПЕРФУЗІЙНОГО СИНДРОМУ УСКЛАДНЕНОГО КРОВОВТРАТОЮ І ПРИ ЛІКУВАННІ АНТИОКСИДАНТАМИ І ІНГІБІТОРАМИ ПРОТЕЇНАЗ

Жукова Г.О.

У статті представлені результати експериментального дослідження реперфузійного синдрому, ускладненого крововтратою і патогенетичної корекції даного стану. Було виявлено, що вживання інгібіторів протеїназ і антиоксидантів для корекції реперфузійного синдрому, уск-

ладненого крововтратою сприяє нормалізації показників протеїназ-інгібіторної системи сироватки крові і бронхоальвеолярного змиву щурів. Ключові слова: реперфузійний синдром, крововтрата, протеїнази, інгібітори протеїназ, антиоксиданти.

Ключові слова: реперфузійний синдром, крововтрата, протеїнази, інгібітори протеїназ, антиоксиданти.

Summary

STATE OF THE PROTEINASE-INHIBITOR SYSTEM OF BLOOD AND BRONCHOALVEOLAR LAVAGE FLUID IN DYNAMICS OF REPERFUSION INJURY COMPLICATED BY BLOOD LOSS AND WITH TREATMENT BY ANTIOXIDANTS AND PROTEASE INHIBITORS

Zhukova A.A.

The results of experimental research of reperfusion injury complicated by blood loss and correction of this state it was presented. Application of protease inhibitors and antioxidants for the correction of reperfusion injury complicated by blood loss cause the normalization of indexes the proteinase-inhibitor system of blood and bronchoalveolar lavage fluid of rats.

Keywords: reperfusion injury, blood loss, protease inhibitors, antioxidants.

Впервые поступила в редакцию 11.05.2013 г. Рекомендована к печати на заседании редакционной коллегии после рецензирования

УДК: 616.381-002:616-08:615.373.3+615.35-(599.323.4)

ПРОТЕОЛИЗ И СВОБОДНО-РАДИКАЛЬНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ИНГИБИТОРОВ ПРОТЕИНАЗ И АНТИОКСИДАНТОВ В ЛЕЧЕНИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ПЕРИТОНИТА

Ермола Ю.А., Кубышкин А.В.

Крымский государственный медицинский университет им. С. И. Георгиевского, г. Симферополь

В статье проведен анализ эффективности сочетанного применения ингибиторов протеиназ и антиоксидантов при моделировании экспериментального перитонита в перитонеальном содержимом, сыворотке крови и бронхоальвеолярном смыве. Установлено, что развивающийся дисбаланс неспецифических протеиназ и их инги-

биторов, активация свободнорадикального окисления, зависит от концентрации вводимого флоггена и может являться факторами генерализации воспалительного процесса в брюшной полости и способствовать развитию органопатологии, а сочетанное введение ингибиторов протеиназ и антиоксидантов способствует восстановлению баланса данных систем.

Ключевые слова: перитонит, протеиназы, ингибиторы протеиназ, антиоксиданты, лечение, воспаление.

Перитонит находится на третьем месте в структуре абдоминальной хирургической патологии. Широкий диапазон колебаний общей и послеоперационной летальности в большинстве случаев обусловлен рядом причин: несвоевременной диагностикой, развивающимися осложнениями, тяжестью заболевания, отсутствием объективных патогенетических критериев выбора лечебной тактики и многообразием используемых методов консервативного и хирургического лечения [2, 4].

Ведущим механизмом патофизиологических нарушений при перитоните является развитие воспаления. Среди факторов, участвующих в формировании воспаления и способных в дальнейшем приводить к развитию осложнений, особое внимание привлекает роль протеиназ-ингибиторной системы. Повреждение лизосомальных мембран при воспалении, а также экзоцитоз лейкоцитов и повышение проницаемости клеточных мембран способствуют системной активации протеиназ. Кроме того, активация свободнорадикального окисления при формировании воспалительного процесса не только усиливает клеточную и тканевую деструкцию, но и способно являться фактором подавляющим активность ингибиторов протеиназ. В целом снижение активности ингибиторов, связанное с их инактивацией и усиленным потреблением, а так же ограничение контроля свободнорадикального окисления липидов послужило основанием для применения с лечебной целью препаратов, обладающих способностью подавлять активность протеиназ различного происхождения и стабилизировать окислительно-восстановительные процессы [2]. Однако на настоящий момент лишь незначительное число исследований

посвящено изучению возможности применения ингибиторов протеиназ и антиоксидантов при лечении перитонита [3, 4].

Цель исследования — оценить эффективность сочетанного применения ингибиторов протеиназ и антиоксидантов при развитии экспериментального перитонита.

Материалы и методы исследования

Эксперимент был проведен на 52-х половозрелых крысах линии Вистар массой тела 180 – 200 г.

Животные были разделены на 4 экспериментальные группы: в первой (n = 10) и второй группе (n = 10) осуществляли моделирование перитонита введением 10 % и 15 % фильтрованной каловой взвеси (ФКВ), по 0,5 мл на 100 г массы тела животного, в третьей группе (n = 10) – моделирование перитонита 10 % ФКВ сочеталось с интраперитонеальным введением корвитина в дозе 10 мг/кг массы и гордокса в дозе 20 000 КИЕ/кг массы тела, в четвертой группе (n = 10) сочетанное введение корвитина и гордокса осуществлялось на фоне моделирования перитонита 15 % ФКВ. В качестве контроля использована группа (n = 12) интактных животных. Проведение эксперимента осуществляли с соблюдением принципов Европейской Конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных целей (Страсбург, 1985г). Эвтаназию животных осуществляли под эфирным наркозом путем декапитации с последующим забором материала.

Исследования проводили в перитонеальном смыве, сыворотке крови, бронхоальвеолярном смыве. Кровь для исследований получали из яремной вены. Пе-

ритонеальный смыв получали 5-кратным промыванием брюшной полости 10 мл изотонического раствора NaCl в течение 1 минуты, с последующей аспирацией с помощью шприца. После выделения легочно-сердечного комплекса получали бронхоальвеолярный смыв путем промывания легких через трахею 10 мл физиологического раствора [6].

Компоненты протеиназ – ингибиторной системы определяли с использованием энзиматических методов [6]. Трипсиноподобную активность (ТПА) плазмы крови, измеряли спектрофотометрическим методом, основанном на измерении скорости отщепления N-бензоил-L-аргинина от синтетического субстрата N-бензоил-L-аргинина этилового эфира (БАЭЭ). Измерение эластазоподобной активности (ЭПА) проводили по гидролизу синтетического субстрата N-t-BOC-аланил-p-нитрофинилового эфира (БАНФЭ). Определение антитриптической активности (АТА) проводили по определению торможения БАЭЭ – эстеразной активности трипсина. Для определения кислотостабильных ингибиторов (КСИ) в биологическом материале предварительно инактивировали лабильные ингибиторы прогреванием в кислой среде, и в дальнейшем определение проводили, как для антитриптической активности. Белок во всех образцах определяли методом Лоури.

Интенсивность СРО в сыворотке крови определяли по концентрации ТБК-активных продуктов. Уровень ТБК-АП определяли по цветной реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК) в присутствии ионов Fe^{3+} [8]. Определение антиокислительного потенциала включало исследование пероксидазоподобной (ПА) [7] и каталазоподобной (КА) [5] активностей, оценку основного сывороточного антиоксиданта церулоплазмина (ЦП) [1] и внутриклеточного антиокислительного фермента супероксиддисмутазы (СОД) [9]. Статистическая обработка полученных данных проведена с использованием методов вариационной статистики.

Результаты и обсуждение

Как показали проведенные исследования, при развитии экспериментального перитонита в перитонеальном секрете происходили изменения, характерные для развития воспалительного процесса и проявляющиеся активацией компонентов протеиназ-ингибиторной системы. Причем, степень выраженности изменений нарастала при усилении тяжести перитонита.

Установлено, что уровень трипсиноподобной активности увеличивался с 41,6 % в группе с 10 % ФКВ до 47,9 % в группе с 15 % ФКВ. Более выражено увеличивалась активность эластазоподобных протеиназ, уровень которых в первой группе увеличился на 53,5 %, во второй на 66,4 %. В группах животных с 10 и 15 % ФКВ отмечался незначительный рост АТА и КСИ. Антитриптическая активность увеличивалась на 8 % и 15 % в первой и второй группах, а КСИ на 34 и 12,5 % соответственно.

При моделировании экспериментального перитонита у крыс в сыворотке крови через 24 ч наблюдалась острофазная реакция компонентов протеиназ-ингибиторной системы в ответ на развитие воспаления в брюшной полости. Изучение трипсиноподобной активности показало прогрессивный рост с 14,5 % в первой группе до 23,6 % во второй группе, эластазоподобная активность увеличивалась в первых двух группах от 53,5 % до 66,4 %. Уровень антитриптической активности прогрессивно снижался с 8 % в первой группе до 14 % во второй, кислотостабильных ингибиторов с 12,5 % до 34 % соответственно.

Со стороны компонентов перекисного окисления липидов наблюдался рост ТБК-АП продуктов в сыворотке крови на 13,8 %, а во второй группе на 22,2 % по сравнению с контрольной группой животных. Изменения состояния антиоксидантов, проявляющих свою активность через инактивацию перекиси водорода, характеризовалось снижением их активности в

сыворотке крови. Причем степень снижения зависела от концентрации ФКВ и соответственно тяжести перитонита. Уровень основного внутриклеточного антиоксиданта СОД в сыворотке крови при экспериментальном перитоните достоверно снижался в первой и второй группах на 11 %.

На фоне снижения внутриклеточных антиоксидантов, основной сывороточный антиоксидант церулоплазмин изменялся как острофазный белок, с увеличением от 10 до 24 % по сравнению с контрольной группой.

Изменения в состоянии протеиназ и их ингибиторов на системном уровне могут сказываться на реактивных изменениях в других органах и быть одним из факторов формирования органопатологии. В проведенной работе в качестве органимишени для исследования реакции неспецифических протеиназ и их ингибиторов при формировании перитонита были выбраны легкие с исследованием локальных изменений в бронхоальвеолярном секрете (БАС). Реакция БАС зависела от степени выраженности перитонеальной реакции и степени активации протеиназ в сыворотке крови. Показано, что в бронхоальвеолярном смыве наблюдалось увеличение уровня ТПА на 4,6 %, ЭПА на 17,6 % в первых двух группах. В динамике отмечен рост КСИ с 24 % в первой группе до 31,2 % во второй группе, при изучении антитриптической активности наблюдалась тенденция к её снижению.

Интраперитонеальное введение ингибитора протеиназ и кверцетина приводило к уменьшению степени выраженных изменений в перитонеальном секрете, сыворотке крови и соответственно, в бронхоальвеолярном секрете.

В перитонеальном секрете, в группе животных, которым сочетано вводили гордокс и корвитин, уровень ТПА снижался на 62,5 % и 49 %, уровень ЭПА — на 42,4 % и 54 % в третьей и четвертой группах соответственно и при этом уровень данных показателей практически прибли-

жался к контрольным значениям. В группах с применением препаратов выявлено увеличение уровня АТА и КСИ в интервале от 12 до 58 % (рис. 1).

Сочетанное введение препаратов приводило к снижению уровня ТПА и ЭПА в сыворотке крови до уровня показателей группы контрольных животных. Применение комбинации препаратов также приводило к увеличению уровня АТА и КСИ, хотя их уровень оставался выше контрольных значений (рис. 2). Нормализация показателей протеолиза в крови сопровождалось уменьшением активации перекисного окисления липидов сыворотки крови. На фоне сочетанного применения препаратов в группах животных при экспериментальном перитоните снижался уровень ТБКАП при увеличении активности антиоксидантных ферментов. Только уровень церулоплазмينا в сыворотке крови снижался, что может быть связано с уменьшением воспалительных проявлений в брюшной полости.

Следует отметить, что и в бронхоальвеолярном секрете применение препаратов при экспериментальном перитоните приводило к снижению активации протеиназ и увеличению ингибиторного потенциала.

Таким образом, в ходе проведенной работы выявлено, что при развитии экспериментального перитонита в перитонеальном содержимом происходила активация процессов протеолиза, выраженность которых зависела от концентрации введенной каловой взвеси. На фоне роста активности протеиназ наблюдалась фазная реакция в состоянии ингибиторов. Изменения на локальном уровне подключали системный уровень воспалительного процесса, который проявлялся в сыворотке крови развитием острофазной реакции компонентов протеиназ-ингибиторного потенциала а так же активацией процессов перекисидации липидов. Низкая активность ингибиторов протеиназ в сыворотке крови может быть маркером нарушений, приводящих к развитию органопатологии. В частности, снижение ингиби-

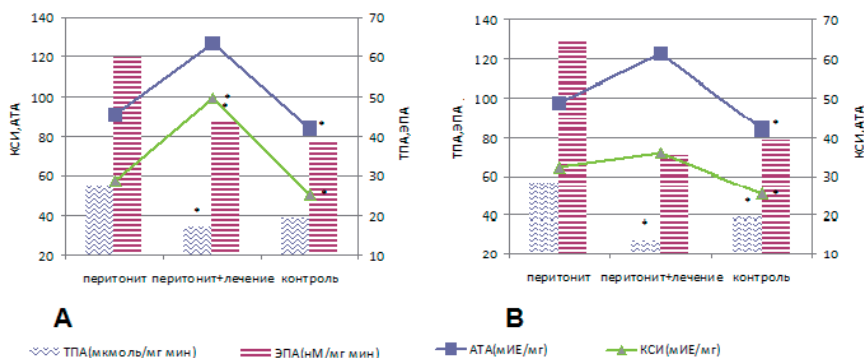


Рис. 1. Динамика показателей системы протеолиза в перитонеальном смыве при экспериментальном перитоните 10 % (А) и 15 % (В) (звездочками на всех рисунках показана достоверность различий ($p < 0,05$) по отношению к контролю).

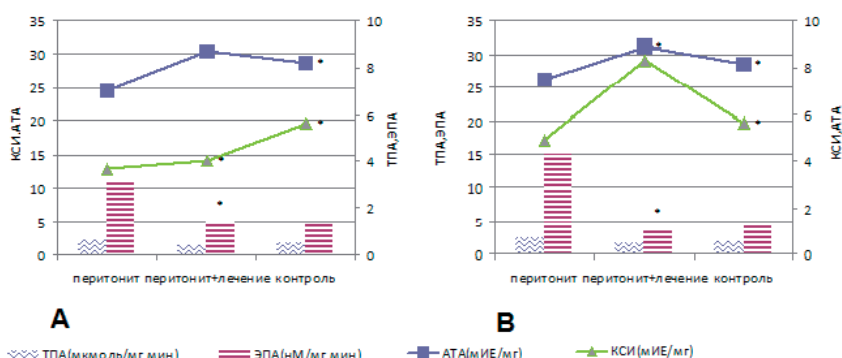


Рис. 2. Динамика показателей системы протеолиза в сыворотке крови при экспериментальном перитоните 10 % (А) и 15 % (В).

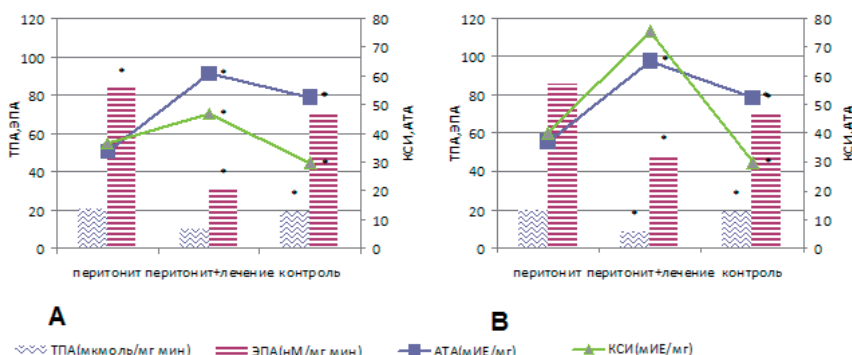


Рис. 3. Динамика показателей системы протеолиза в бронхоальвеолярном смыве при экспериментальном перитоните 10 % (А) и 15 % (В).

торного потенциала в крови параллельно с увеличением активности эластазоподобных протеиназ в сыворотке крови может являться одним из основных факторов вовлечения легких в патологический процесс. При тяжелой форме экспериментального перитонита в бронхоальвеолярном секрете отмечалась реактивная активация эластазоподобных и трипсиноподобных протеиназ с снижением анти-триптической активности и кислотостабильных ингибиторов протеиназ. Форми-

рование дисбаланса на локальном уровне, может являться дополнительным фактором, способствующим повреждению лёгких при развитии тяжелых форм перитонита.

Комбинированное применение ингибиторов протеиназ и антиоксидантов способствовало блокированию процессов протеолиза и ПОЛ, что предотвращало возможное участие данных механизмов в процессах генерализации патологического процесса. Так, сочетанное применение препаратов приводило к увеличению уровня ингибиторов протеиназ, снижению протеолитической активности и предупреждало развитие локального дисбаланса между протеиназами и их ингибиторами в перитонеальном секрете. В сыворотке крови применение данных препаратов способствовало уменьшению активности протеиназ-ингибиторной системы. По-видимому, их подавление способствовало уменьшению реакции протеиназ и их ингибиторов в бронхоальвеолярном смыве, что обеспечивало протекцию легких и уменьшало риск их вовлечения в патологический процесс.

Выводы

1. Моделирование экспериментального перитонита сопровождается активацией процессов протеолиза в перитонеальном секрете, причем по мере

Таблица

Динамика показателей перекисного окисления липидов при моделировании экспериментального перитонита

Группы	ТБК-АП нМ МДА/мл	КА мМ/гHb·с	ПА мкМ/гHb·с	СОД Ед/мл	ЦП мг/л
контр. группа (n = 12)	31,0 ± 0,4	0,59 ± 0,1	5,0 ± 0,3	4,6 ± 0,2	424,5 ± 10,3
1 группа (n = 10)	35,3 ± 0,3*	0,46 ± 0,1*	4,0 ± 1,0*	4,2 ± 0,5	525,2 ± 16,2*
2 группа (n = 10)	37,9 ± 0,3*	0,52 ± 0,09*	4,1 ± 0,6*	4,1 ± 0,2	464,8 ± 11,4*
3 группа (n = 10)	33,1 ± 0,7**	0,56 ± 0,1**	4,5 ± 0,6	4,5 ± 0,2	256,9 ± 13,6***
4 группа (n = 10)	32,3 ± 0,49***	0,60 ± 0,13***	5,8 ± 0,35***	4,8 ± 0,48	291,0 ± 9,5****

Примечание. Звездочками показана достоверность различий (p < 0,05): * — показана достоверность различий по отношению к контролю, ** - показана достоверность различий 3 группы по отношению к 1 группе, *** — показана достоверность 4 группы по отношению к 2 группе.

усиления тяжести развивающегося экспериментального перитонита отмечается более выраженный дисбаланс протеиназ-ингибиторной системы с увеличением активности протеиназ и снижением уровня ингибиторов. Сочетанное интраперитонеальное применение ингибитора протеиназ гордокса и антиоксиданта корвитина приводило к уменьшению активации показателей системы протеолиза.

- В сыворотке крови развитие экспериментального перитонита проявлялось острофазной реакцией компонентов протеиназ-ингибиторной системы, дисбалансом окислительного-антиоксидантного гомеостаза, что проявлялось увеличением уровня ТБК активных продуктов и снижением антиокислительных ферментов. Применение антиоксиданта корвитина и ингибитора протеиназ гордокса снижало степень активации протеиназ и способствовало увеличению ингибиторного потенциала, нормализации показателей системы перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты в сыворотке крови экспериментальных животных.
- Развитие перитонита сопровождается реактивными изменениями в состоянии протеиназ-ингибиторной си-

стемы бронхоальвеолярного секрета лёгких, которые проявляются активацией эластазоподобных и трипсиноподобных протеиназ с снижением антитриптической активности и кислотостабильных ингибиторов протеиназ. На фоне сочетанного применения гордокса и корвитина степень выраженности реактивных

изменений в бронхоальвеолярном секрете нивелируется.

Литература

- Бабенко Г. О. Визначення активності церулоплазміну в сироватці крові / Г. О. Бабенко // Біосфера, антропогенез і здоров'я.- 1999.- С. 160-162.
- Гринёв М. В. Патогенетические аспекты критических состояний в неотложной хирургии / М. В. Гринёв // Вестник хирургии им. И. И. Грекова. -2009. — Т. 168, № 1.- С. 9-13.
- Дементьева И. И. Апротинин: безопасность применения в хирургической практике/ И. И. Дементьева, М. А. Парная, Ю. А. Морозов // Анестезиология и реаниматология. — 2007. — № 2. — С. 71-75.
- Деркачевская В. В. Корвитин – потенциальное средство фармакотерапии калового перитонита / В. В. Деркачевская // Вісник ВНМУ.- 2008. – Т.12, №1 – С. 342.
- Королюк М. А. / Метод определения активности каталазы // М. А.Королюк, Л. И. Иванова, И. Г. Майорова // Лабораторное дело. — 1988. — № 1. – С.16-19.
- Кубишкін А. В, Харченко В. З., Семениць П. Ф. та інш. Методи визначення активності неспецифічних протеїназ та їх інгібіторів у сироватці крові і біо-

- логічних рідинах. // Методичні рекомендації.- Київ.- 2010. – С.27.
7. Левицкий А. П. Определение пероксидазной активности в биологическом материале / А. П. Левицкий, Е. К. Гукевич, Р. Д. Барабаш // Украинский биохимический журнал. – 1979. – Т. 51, № 3. – С.289-292.
 8. Стальная И. Д. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты / И. Д. Стальная, Т. Д. Горишвили // Современные методы в биохимии. М.: Медицина, 1977. С. 66-68.
 9. Чевари С. А. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологических материалах / С. А. Чевари, И. Чаба, Й. Секей // Лабораторное дело.–1985.– №11. — С. 678-681.

Резюме

ПРОТЕОЛІЗ І ВІЛЬНО-РАДИКАЛЬНЕ
ОКИСЛЕННЯ ПРИ ВИКОРИСТАННІ
ІНГІБІТОРІВ ПРОТЕЇНАЗ І
АНТИОКСИДАНТІВ В ЛІКУВАННІ
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ПЕРИТОНИТУ

Єрмола Ю.А., Кубишкін А.В.

У статті проведений аналіз ефективності поєданого застосування інгібіторів протеїназ і антиоксидантів при моделюванні експериментального перитоніту в перитонеальному вмісті, сироватці крові та бронхоальвеолярному змиві. Встановлено, що розвивається дисбаланс неспецифічних протеїназ та їх інгібіторів, активація вільнорадикального окислення, залежить від концентрації введеного флого-

гена і може бути чинниками генералізації запального процесу в черевній порожнині і сприяти розвитку органопатології, а поєдане введення інгібіторів протеїназ і антиоксидантів сприяє відновленню балансу даних систем.

Ключові слова: перитоніт, протеїнази, інгібітори протеїназ, антиоксиданти, лікування, запалення.

Summary

PROTEOLYSIS AND FREE RADICAL
OXIDATION PROTEINASE THE USE OF
INHIBITORS AND ANTIOXIDANTS IN THE
TREATMENT OF EXPERIMENTAL
PERITONITIS

Ermola Yu.A., Kubishkin A.V.

The analysis of the effectiveness of combined use of protease inhibitors and antioxidants in the modeling of experimental peritonitis in peritoneal contents, serum and bronchoalveolar washout. Found that the growing imbalance of non-specific proteases and their inhibitors, the activation of free radical oxidation is dependent on the concentration of the input flogogena and can be factors of generalization of the inflammatory process in the abdominal cavity and promote organopatologii, and combined administration of protease inhibitors and antioxidants helps to restore the balance of these systems.

Key words: peritonitis, proteinases, proteinase inhibitors, antioxidants, treatment, and inflammation.

*Впервые поступила в редакцию 06.05.2013 г.
Рекомендована к печати на заседании
редакционной коллегии после рецензирования*

УДК 615.225.3:616.151.4

ДОСЛІДЖЕННЯ КАРДІОПРОТЕКТОРНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ПРЕПАРАТУ «ЛАТИРОН» НА МОДЕЛІ АДРЕНАЛІНОВОГО МІОКАРДИТУ

*Волковой В.А., Шахватова Н.М., Барабаш В.В., Фоміна Г.П.,
Карabut Л.В., Гнатюк В.В.*

Національний фармацевтичний університет м. Харків

На моделі гострого міокардиту, викликаного адреналіном у щурів, проведено порівняльне вивчення кардіопротекторної активності нових рослинних антиоксидантів (комплекс біофлавоноїдів) латірон і корвитин. Встановлено, що більш виражена тера-