

УДК 616–74/078+616.24–002+616–085:577.152.34

© И. И. Фомочкина, 2010.

ПАТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ КОРРЕКЦИЯ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ ПРИ РЕПЕРФУЗИОННЫХ РАССТРОЙСТВАХ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

И. И. Фомочкина

*Кафедра патологической физиологии (заведующий кафедрой – профессор А. В. Кубышкин),
Государственное учреждение «Крымский государственный медицинский университет им. С.И. Георгиевского»,
г. Симферополь*

PATHOGENETIC CORRECTION OF METABOLIC CHANGES AT REPERFUSION DISTURBANCES IN EXPERIMENT

I. I. Fomochkina

SUMMARY

Experimental researches were established, that reperfusion disturbances characterized by activation of proteolytic enzymes of blood and decrease level of inhibitors of proteolytic enzymes. Administration of inhibitor of proteolytic enzymes gordox and antioxidant corvutin leads to positive changes in system of proteolysis, and at monotherapy by both drugs more expressed changes in system of proteolysis were after introduction of gordox, that it is possible to explain by direct influence on proteolytic enzymes. However combined administration of drugs was more effective, than their isolated use, which speaks simultaneous influence on the basic links of pathogenesis of reperfusion disturbances. The revealed laws of changes in system of proteolysis at an ischemia-reperfusion syndrome on organism level have allowed to generate the concept about a role of systemic inflammatory response syndrome in development of extreme conditions.

ПАТОГЕНЕТИЧНА КОРЕКЦІЯ МЕТАБОЛІЧНИХ ПОРУШЕНЬ ПРИ РЕПЕРФУЗІЙНИХ ПОРУШЕННЯХ В ЕКСПЕРИМЕНТІ

I. I. Фомочкина

РЕЗЮМЕ

Експериментальними дослідженнями встановлено, що при розвитку реперфузійних порушень спостерігається активація протеолітичних ферментів сироватки крові, а також відбувається зниження показників інгібіторів протеїназ. Вживання інгібітору протеїназ гордоксу і антиоксиданту корвітину коригувало зміни в системі протеоліза сироватки крові, причому при монотерапії обома препаратами більш виражені зміни в системі протеоліза були після введення гордокса, що можна пояснити його прямою дією на показники, що вивчалися. Проте поєднане вживання препаратів було ефективніше, ніж їх ізольоване використання, що, ймовірно, пояснюється одночасною дією на основні ланки патогенезу реперфузійних порушень. Виявлені закономірності змін в протеїназ-інгібіторній системі при синдромі ішемії-реперфузії на організменному рівні дозволили сформулювати концепцію про роль синдрому системної запальної реакції в розвитку екстремальних станів.

Ключевые слова: шок, системное воспаление, протеиназы, ингибиторы протеиназ.

Проблема патогенетической профилактики и терапии постишемических состояний является актуальным вопросом современной медицины, ввиду распространенности и тяжести данной нозологии в экстремальных ситуациях. Увеличение травматизма, как следствие урбанизации современного общества, а также последствия стихийных бедствий, сопровождающих человечество на протяжении всей его истории, приводят к росту шоковых состояний. Результаты лечения реперфузионных состояний остаются неудовлетворительными - летальность составляет 30-75% [4, 9, 15].

В связи с этим современная медицина, располагающая новыми методами диагностики и

лечения, требует и новых подходов к патогенетической профилактике и терапии этих больных [9, 10, 11, 13].

Анализ современной литературы по проблеме показал, что ведущая роль в патогенезе и клинических проявлениях экстремальных состояний, шок принадлежит “гиперэргическому” синдрому системного воспалительного ответа. Синдром системной воспалительной реакции (ССВР) развивается в ответ на системный характер воздействия повреждающего фактора или генерализацию маркеров повреждения: продуктов тканевого распада, протеолитических ферментов, изменения кислотно-щелочного равновесия,

микробных антигенов, аллергенов, и др. В результате ССВР приводит к системным микроциркуляторным расстройствам, микротромбообразованию и чрезмерному накоплению в кровотоке регуляторных медиаторов воспаления: цитокинов, эйкозаноидов, NO и т.д., что существенно увеличивает риск развития синдрома полиорганной недостаточности.

Реперфузионный синдром сопровождается поступлением в кровь огромного количества биологически активных веществ, при этом выраженная токсемия, системная гипоперфузия, изменения осмотического давления и кислотно-щелочного равновесия крови приводят к чрезмерной активации систем протеолиза [12]. Эти изменения являются одним из главных звеньев патогенеза органопатологии при реперфузионных нарушениях, а также механизмом формирования органопатологии, например “шокового” легкого [2]. Однако особенности ССВР при реперфузионных состояниях остаются до конца не изученными, ограничены также данные об изменениях в системе ограниченного протеолиза, как возможных маркерах течения ССВР.

Поэтому целью настоящего исследования явилось изучение изменений протеиназ-ингибиторной системы сыворотки крови при моделировании реперфузионного синдрома и оценка этих изменений с позиции феномена системной воспалительной реакции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проведены на 89 белых крысах-самцах линии Vistar, массой 180-200 граммов. Реперфузионный синдром моделировали путем наложения резиновых жгутов под эфирным наркозом на обе задние конечности животных на уровне паховой складки. Реваскуляризация конечностей была проведена через 6 часов.

Экспериментальные исследования проводились в соответствии с требованиями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, которые используются в исследовательских и других научных целях» (Strasburg, 18.03.1986) [1]. Кровь для исследований получали путем декапитации наркотизированных крыс. Введение препаратов осуществлялось внутривенно из расчета 10 мл/кг за 30 минут до снятия жгутов. Исследования проводили через 6 и 12 часов после реваскуляризации конечностей.

Животные были разделены на 6 групп: I группа - здоровые животные (n=14), II группа – реперфузионный синдром (длительность реперфузионного периода - 6 часов) без лечения (введение изотонического раствора NaCl), контрольная группа (n=15), III группа – реперфузионный синдром (длительность реперфузионного периода - 12 часов) без лечения (введение изотонического раствора NaCl) (n=15), IV группа - реперфузионный синдром (длительность реперфузионного периода - 6 часов) на фоне

введения гордокса в дозе 10 000 КИЕ/кг массы тела, разведенного в изотоническом растворе NaCl (n=15), V группа - реперфузионный синдром (длительность реперфузионного периода - 6-ть часов) на фоне введения корвитина в дозе 10 мг/кг массы тела, разведенного в изотоническом растворе натрия хлорида, из расчета 2 мл/кг массы (n=15), VI группа - реперфузионный синдром (длительность реперфузионного периода - 6 часов) на фоне сочетанного применения гордокса и корвитина в вышеуказанных дозах (n=15).

Трипсиноподобную активность (ТПА) плазмы крови, измеряли спектрофотометрическим методом, основанном на измерении скорости отщепления N-бензоил-L-аргинина (БА) от синтетического субстрата N-бензоил-L-аргинина этилового эфира (БАЭЭ) (Reanal) [3]. Расчет активности проводили по приросту оптической плотности в пробе за 1 минуту и выражали в мкМолях БА, освобожденного 1 мл биологического материала за 1 мин. Измерение эластазоподобной активности (ЭПА) сыворотки проводили по гидролизу синтетического субстрата N-t-ВОС-аланил-p-нитрофинилового эфира (БАНФЭ) (Reanal) [7]. Определение антитриптической активности (АТА) в сыворотке крови проводили унифицированным методом В.Ф. Нартиковой и Т.С. Пасхиной [6]. Метод основан на определении торможения БАЭЭ – эстеразной активности трипсина разведенной в 50 раз сывороткой крови; гидролиз трипсином измеряли по приросту оптической плотности пробы при 253 нм (DD_{253}). Для определения кислотостабильных ингибиторов (КСИ) в сыворотке крови, пробы предварительно обрабатывали для осаждения кислоталабильных белков: для этого 0,1 мл сыворотки крови, разведенной в 10 раз, смешивали с 0,1 мл 0,05 М Na-ацетатного буфера (рН 4,1) и прогревали на водяной бане при 60°C в течение 20 минут. После охлаждения пробу нейтрализовали 0,5 н раствором NaOH и объем доводили 0,05 М трис-HCl буфером (рН - 8,0) до 1,9 мл [5, 14]. Дальнейшее определение проводили, по методу [6]. Белок определяли методом Лоури [14].

Статистическая обработка полученных данных проведена с использованием методов вариационной статистики с вычислением средних величин (M) и оценкой вероятности расхождений (m), достоверными считали показатели при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

У контрольной группы животных, которым после восстановления кровотока в ранее ишемизированных тканях вводили изотонический раствор NaCl, происходило резкое увеличение ТПА и ЭПА сыворотки крови на фоне снижения АТА (табл. 1).

При этом максимальный подъем ТПА и ЭПА наблюдался через 12 часов после реваскуляризации. Уровень КСИ через 6 часов после реваскуляризации был на 61,5 % выше контрольных значений, однако к

12-ти часам ревазуляризации имело место выраженное снижение кислотостабильных ингибиторов.

Таблица 1

Состояние ограниченного протеолиза у белых крыс при реперфузионном синдроме

Показатель		Абсолютные значения показателей и их отклонения							
		в \pm % от контроля							
		ТПА		ЭПА		АТА		КСИ	
		мкМ/мл•мин		мкМ/мл•мин		ИЕ/ мл•мин		ИЕ/ мл•мин	
Серия		Абс.	\pm %	Абс.	\pm %	Абс.	\pm %	Абс.	\pm %
Контроль	M	0,39		2,37		38,89		4,03	
	$\pm m$	0,04		0,12		2,19		0,21	
Реперфузионный синдром 6 часов	M	0,55	+41,0	1,97	-16,88	26,84	-30,98	6,51	+61,54
	$\pm m$	0,03		0,05		2,27		0,28	
	P		<0,01		<0,01		<0,01		<0,01
Реперфузионный синдром 12 часов	M	0,67	+71,7	3,22	+35,8	21,50	-44,72	2,72	-32,51
	$\pm m$	0,04		0,11		2,33		0,31	
	P		<0,01		<0,01		<0,01		<0,01

Введение корвитина приводило к уменьшению значений ТПА сыворотки крови к 12 часам токсемии на 14,5% по сравнению с нелеченной группой (табл. 2). Применение гордокса было более эффективным - ТПА снижалась на 21,8%, а сочетанное использование гордокса и корвитина к 6 часам наблюдения практически нормализовало показатели ТПА сыворотки крови. При введении корвитина ЭПА снизилась на 17,8%, при

введении гордокса - на 20,3%, а комбинация обоих препаратов привела к еще большему снижению эластазоподобной активности при реперфузионном синдроме в течение 6-ти часов. Сходная динамика ЭПА наблюдалась и при 12-ти часовом реперфузионном синдроме, комбинированное использование ингибиторов протеиназ и антиоксидантов способствовало нормализации значений эластазоподобной активности.

Таблица 2

Изменения уровня ТПА и ЭПА при ССВР у белых крыс после предварительного введения гордокса, корвитина и их комбинации

Показатель		ТПА		ЭПА	
		мкМ/мл•мин		мкМ/мл•мин	
		Время после снятия жгутов, час			
Серия		6	12	6	12
Контрольная группа	M $\pm m$	0,39 \pm 0,04		2,37 \pm 0,12	
Реперфузионный синдром	M	0,55	0,67	1,97	3,22
	$\pm m$	0,03	0,04	0,05	0,11
	P ₁	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Реперфузионный синдром + гордокс	M	0,43	0,52	1,57	2,76
	$\pm m$	0,04	0,02	0,06	0,14
	P ₁	>0,5	<0,01	<0,01	<0,05
	P ₂	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01

Таблица 2. (Продолжение).

Реперфузионный синдром + корвитин	M	0,47	0,58	1,62	2,94
	$\pm m$	0,04	0,01	0,11	0,10
	P ₁	>0,25	<0,01	<0,01	<0,01
	P ₂	>0,25	<0,05	<0,01	<0,05
Реперфузионный синдром + гордокс + корвитин	M	0,40	0,43	1,34	2,43
	$\pm m$	0,03	0,02	0,04	0,12
	P ₁	>0,5	>0,5	<0,01	>0,5
	P ₂	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01

Примечание. P₁ – показатель достоверности изменений в опытных группах по отношению к контролю, P₂ – показатель достоверности изменений в группах без применения препаратов по отношению к данным в группах с использованием гордокса, корвитина или их комбинации.

Наиболее эффективным было сочетанное применение гордокса и корвитина в отношении изменения показателей АТА: к 12 часам токсемии ее значения на 44,7 % были ниже по сравнению с группой здоровых животных и достоверно увеличивались по отношению к нелеченной группе животных на 35,8 % и 49,8 % к 6 и 12 часам соответственно (табл. 3).

Таблица 3

Изменения уровня АТА и КСИ при ССВР у белых крыс после предварительного введения гордокса, корвитина и их комбинации

Показатель		АТА		КСИ	
		ИЕ/ мл·мин		ИЕ/ мл·мин	
		Время после снятия жгутов, час			
Серия		6	12	6	12
Контрольная	M $\pm m$	38,89 \pm 2,19		4,03 \pm 0,21	
Реперфузионный синдром	M	26,84	21,50	6,51	2,72
	$\pm m$	2,27	2,33	0,28	0,31
	P ₁	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Реперфузионный синдром + гордокс	M	32,46	28,93	5,58	3,84
	$\pm m$	1,43	1,26	0,29	0,22
	P ₁	<0,01	<0,01	<0,01	>0,5
	P ₂	<0,05	<0,01	<0,01	<0,01
Реперфузионный синдром + корвитин	M	29,49	31,03	5,43	3,77
	$\pm m$	1,15	1,74	0,21	0,30
	P ₁	<0,01	<0,01	<0,01	>0,5
	P ₂	>0,5	<0,01	<0,01	<0,01
Реперфузионный синдром + гордокс + корвитин	M	36,37	32,21	5,67	4,19
	$\pm m$	1,38	1,22	0,35	0,23
	P ₁	>0,5	<0,01	<0,01	>0,5
	P ₂	<0,01	<0,01	<0,05	<0,01

Примечание. P_1 – показатель достоверности изменений в опытных группах по отношению к контролю, P_2 – показатель достоверности изменений в группах с без применения препаратов по отношению к данным в группах с использованием гордокса, корвитина или их комбинации.

Убедительным доказательством эффективности антиоксидантов при реперфузионных расстройствах сочетанного применения ингибиторов протеиназ и служит выживаемость животных (табл. 4).

Таблица 4
Выживаемость крыс при моделировании ССВР и после предварительного введения гордокса, корвитина и их комбинации

Модель	6 ч репер-фузии	24 ч (1 сут) репер-фузии	48 ч (2 сут) репер-фузии	72 ч (3 сут) репер-фузии	96 ч (4 сут) репер-фузии
Реперфузионный синдром, после 6 час ишемии	10% (1 кр)	40% (4 кр)	70% (7 кр)	80% (8 кр)	100% (10 кр)
Реперфузионный синдром, после 6 час ишемии + КОРВИТИН	10% (1 кр)	20% (2 кр)	30% (3 кр)	40% (4 кр)	70% (7 кр)
Реперфузионный синдром, после 6 час ишемии + ГОРДОКС	-	10% (1 кр)	20% (2 кр)	30% (3 кр)	40% (4 кр)
Реперфузионный синдром, после 6 час ишемии + ГОРДОКС+КОРВИТИН	-	-	10% (1 кр)	-	20% (2 кр)

Необходимо отметить, что внутрибрюшинное введение гордокса и корвитина за 30 минут до реваскуляризации конечностей без дополнительной терапии приводило к 80 % выживаемости животных к 96 часам шока, в то время как в группе нелеченных животных имела место 100 % их гибель в этот же период наблюдения.

Реперфузионный синдром на фоне сочетанного применения гордокса и корвитина характеризовался также иной картиной поведенческих реакций у крыс после реваскуляризации. Фазность развития

реперфузионных расстройств была сходной с таковой у нелеченных животных, но тяжесть общего состояния была значительно меньшей, имело место укорочение сроков адаптации животных к экстремальному состоянию. Так, к 24 часам наблюдения оставшиеся в живых крысы активно передвигались по клетке, пили воду, некоторые принимали пищу. Их общее состояние было средней степени тяжести.

Таким образом, сочетанное применение ингибитора протеиназ гордокса и антиоксиданта

корвитина способствовало более лёгкому течению реперфузионного синдрома, что отражалось на динамике поведенческих реакций крыс в течение всего периода наблюдения.

Рассматривая реперфузионный синдром как процесс, в основе которого лежит дезорганизация кровообращения, гипоксемия с нарушением обмена веществ и повреждением клеток, возникающий в ответ на действие экзогенных и эндогенных при чрезмерной активации систем ограниченного протеолиза, закономерно приходим к выводу о возможном значении дисбаланса в системе ферментов протеолиза и их ингибиторов в патогенезе реперфузионных расстройств факторов [8, 11].

Полученные экспериментальные данные, а также анализ литературы, свидетельствует о том, что ССВР может занимать ключевое значение в патогенезе реперфузионных расстройств, шоковых состояний различной этиологии.

В настоящее время вопрос определения качественных уровней синдрома системной воспалительной реакции в целях обеспечения принятия клинического решения является весьма актуальным. Наиболее перспективными маркерами системной воспалительной реакции являются уровни гистогормонов белковой природы – цитокинов, которые следует отнести к информационным клеточным продуктам, их ключевое значение – обеспечение взаимодействия между отдельными клетками воспалительной реакции.

Одновременно с продукцией цитокинов имеет место выработка большого количества эффекторных факторов, непосредственно участвующих в процессах альтерации при воспалении. К таким факторам следует отнести протеиназы гранулоцитов, которые являются одним из ключевых звеньев патогенеза воспаления.

Следует отметить, что наличие мощной системы эндогенных ингибиторов протеиназ позволяет рассматривать данные взаимоотношения в качестве единой протеиназ-ингибиторной системы, что значительно увеличивает диагностическую ценность определения ее компонентов. Данные об изменениях в протеиназ-ингибиторной системе, полученные в эксперименте по моделированию реперфузионного синдрома, позволяют рассматривать протеиназы гранулоцитов, как один из наиболее диагностически значимых эффекторных факторов и, соответственно, критериев течения ССВР.

Эффективность сочетанного применения поливалентного ингибитора протеиназ гордокса и антиоксиданта корвитина для коррекции дисбаланса в протеиназ-ингибиторной системе имеет большое значение для их возможного использования для профилактики и терапии реперфузионных расстройств и ССВР.

ВЫВОДЫ

Таким образом, выявленные закономерности изменений в протеиназ-ингибиторной системе при синдроме ишемии-реперфузии на организменном уровне позволили сформировать концепцию о роли синдрома системной воспалительной реакции в развитии экстремальных ситуаций.

Экспериментальными исследованиями установлено, что при развитии реперфузионных нарушений наблюдается активация протеолитических ферментов сыворотки крови, а так же происходит снижение показателей ингибиторов протеиназ сыворотки крови. Применение ингибитора протеиназ гордокса и антиоксиданта корвитина корригировало изменения в системе протеолиза сыворотки крови, причем при монотерапии обоими препаратами более выраженные изменения в системе протеолиза были после введения гордокса, что можно объяснить его прямым воздействием на изучаемые показатели. Однако сочетанное применение препаратов было эффективнее, чем их изолированное использование, что, вероятно, объясняется одновременным воздействием на основные звенья патогенеза реперфузионных повреждений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Європейська конвенція про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей / Страсбург, 18 березня 1986 року: Збірка договорів Ради Європи: Українська версія // Є.М. Вишневецький (пер. та ред.). — К. : Парламентське видавництво, 2000. — 654 с.
2. Горохова Н.Ю. Ингибиторы протеиназ, антиоксиданты и сурфактант в коррекции повреждений легких при турникетном шоке: Автореф. дис. канд. мед. наук: 14.03.04 / Терноп. гос. мед. акад. им. И.Я. Горбачевского МЗ Украины; Тернополь: 2003. - 20 с.
3. Кринская А.В., Пасхина Т.С. Количественное определение калликреина и калликреиногена в сыворотке (плазме) крови человека // Современные методы биохимии. – М.: Медицина, 1977. - С. 163-170.
4. Малова И.Ю. Оценка влияния гепастерила А на течение реперфузионного синдрома // Фундаментальные исследования. – 2007. – № 8 – С. 77-80.
5. Нартикова В.Ф., Пасхина Т.С. Очистка и свойства кислотостабильного ингибитора трипсина из сыворотки крови кролика // Биохимия. - 1969. - № 2. - С. 282-292.
6. Нартикова В.Ф., Пасхина Т.С. Определение антитриптической активности в сыворотке крови человека // Современные методы в биохимии. - М.: Медицина, 1977. - С.188-191.
7. Активность протеиназ гранулоцитов и уровень кислотостабильных ингибиторов протеиназ в бронхоальвеолярном секрете детей с бронхопатиями различной этиологии /О.Г. Оглобина, Л.В. Платонова, Л.В. Мясникова и др. // Вопросы мед. химии. - 1980. -

№ 3. -С. 387-392.

8. Andrews K., Mowlavi A., Neumeister M.W., Russell R.C. Ischemia-reperfusion injury: a multicellular phenomenon // *Plast. Reconstr. Surg.* – 2000. - N. 106., V. 7. – P. 1664-1665.

9. Barie P.S., Hydo L.J., Pieracci F.M. et al. Multiple organ dysfunction syndrome in critical surgical illness // *Surg. Infect. (Larchmt).* – 2009. – N. 10., V. 5. – P. 369-377.

10. Beyersdorf F., Schlensak C. Controlled reperfusion after acute and persistent limb ischemia // *Semin. Vasc. Surg.* – 2009. – N. 22., V. 1. – P. 52-57.

11. Eliason J.L., Wakefield T.W. Metabolic consequences of acute limb ischemia and their clinical implications // *Semin. Vasc. Surg.* – 2009. – N. 22, V. 1. - P. 29-33.

12. Gando S., Kameue T., Nanzaki S. et al. Increased neutrophil elastase, persistent intravascular coagulation and decreased fibrinolytic activity in patients with posttraumatic acute respiratory distress syndrome // *J. Trauma.* 1997. - N. 42, V. 6. - P. 1068-1072.

13. Landis C. Pharmacologic strategies for combating the inflammatory response // *J. Extra. Corpor. Technol.* – 2007. – N. 39, V. 4. – P. 291-295.

14. Lowry O., Rosenbrough U., Farr A. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* - 1951. - Vol. 193, № 1. - P. 265-275.

15. Paugam-Burtz C., Kavafyan J., Merckx P. et al. Postreperfusion syndrome during liver transplantation for cirrhosis: outcome and predictors // *Liver Transpl.* – 2009. – N. 15, V. 5. – P. 522-529.