

УДК 616 – 092: 616.153.96: 577.11/12: 599.323.4.

© А.А. Жукова, 2012.

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИНГИБИТОРОВ ПРОТЕИНАЗ И АНТИОКСИДАНТОВ ДЛЯ ПАТОГЕНЕТИЧЕСКОЙ КОРРЕКЦИИ РЕПЕРФУЗИОННОГО СИНДРОМА, ОСЛОЖНЁННОГО КРОВОПОТЕРЕЙ

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

### THE USAGE OF PROTEASE INHIBITORS AND ANTIOXIDANTS FOR PATHOGENETIC CORRECTION OF REPERFUSION INJURY COMPLICATED BY BLOOD LOSS

**A.A. Zhukova**

#### SUMMARY

Activation of proteolytic enzymes, lipid peroxidation and deficiency of protease inhibitors and antioxidants in the serum of experimental rats with reperfusion injury complicated by blood loss has been established. Combined use of antioxidants and protease inhibitors contributes to normalization of the protease-inhibitor and prooxidant-antioxidant systems.

### ВИКОРИСТАННЯ ІНГІБІТОРІВ ПРОТЕЇНАЗ І АНТИОКСИДАНТІВ ДЛЯ ПАТОГЕНЕТИЧНОЇ КОРЕКЦІЇ РЕПЕРФУЗІЙНОГО СИНДРОМУ, УСКЛАДНЕНОГО КРОВОВТРАТОЮ

**Г.О. Жукова**

#### РЕЗЮМЕ

При розвитку реперфузійного синдрому, ускладненого крововтратою, відбувається активація протеолізу і ПОЛ сироватки крові на тлі дефіциту інгібіторів протеїназ і антиоксидантів. Одночасне застосування антиоксидантів та інгібіторів протеаз сприяє нормалізації показників протеїназ-інгібіторної та прооксидантно-антиоксидантної систем.

**Ключевые слова:** реперфузионный синдром, кровопотеря, протеиназы, ингибиторы протеиназ, пероксидация липидов, антиоксиданты.

В настоящее время внимание многих исследователей привлекает проблема реперфузионного синдрома (РС). Известно, что РС часто встречается в клинической практике после реконструктивных операций на сосудах, чрескожной транслуминальной баллонной ангиопластике, при пересадке органов, синдроме реплантации конечностей, инфаркте миокарда, синдроме длительного сдавливания, после успешной реанимации и многих других состояниях. При восстановлении кровообращения включается целый ряд механизмов, вызывающих повреждение органов и систем, часто приводящих к гибели организма. К таким механизмам относят чрезмерную активацию протеолиза и перекисного окисления липидов (ПОЛ) [3, 6, 11]. Поэтому одним из важных подходов в решении проблемы профилактики и лечения постинфарктных расстройств является использование препаратов патогенетической коррекции, к которым можно отнести антиоксиданты и ингибиторы протеиназ [9].

В связи с этим, целью нашей работы явилось установление роли процессов протеолиза и перекисного окисления липидов в патогенезе реперфузионного синдрома, осложнённого кровопотерей, и экспериментальное обоснование патогенетической коррекции указанных состояний с помощью сочетан-

ного применения ингибиторов протеиназ и антиоксидантов.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперимент был проведён на 84 белых крысах линии «Wistar» (массой 180-200 граммов). Острую кровопотерю вызывали с помощью забора крови из хвостовой вены из расчета 10% от ОЦК. Непосредственно после острой кровопотери формировали ишемию, путем наложения резиновых жгутов на уровне паховой складки на задние конечности сроком 6 часов под легким эфирным наркозом. РС моделировали путём ревазуляризации ранее ишемизированных конечностей. Забор биологического материала производили через 12 часов после ревазуляризации конечностей. Кровь для исследований получали путем декапитации наркотизированных крыс. Экспериментальные исследования проводились в соответствии с требованиями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, которые используются в исследовательских и других научных целях» (Strasburg, 1986).

Исследуемые животные были разделены на 5 групп: I группа – контрольная, интактные животные (n=12), II группа – РС 12ч, осложнённый кровопотерей, без лечения, с внутрибрюшинным введением изотонического раствора NaCl из расчета 10 мл/кг

(n=12), III группа – РС 12ч, осложнённый кровопотерей, с лечением путём введения корвитина в брюшину в дозе 10мг/кг массы тела (n=12), IV группа – РС 12ч, осложнённый кровопотерей с лечением путём введения гордокса в брюшину в дозе 20000 КИЕД/кг (n=12), V группа – РС 12ч, осложнённый кровопотерей с лечением путём сочетанного введения корвитина и гордокса в брюшину в указанных дозах (n=12).

Для оценки степени метаболических нарушений определяли показатели протеиназ-ингибиторной и окислительно-антиоксидантной систем. Активность протеиназ и их ингибиторов исследовали с использованием энзиматических методов [7]. Эластазоподобную активность (ЭПА) определяли по скорости ферментативного гидролиза синтетического субстрата N-т-бок-L-аланил-p-нитрофенилового эфира (BANFE), трипсиноподобную активность (ТПА) – по скорости отщепления бензоил-аргинина от N-α-бензоил-L-аргинин-этилового эфира (BAEE), антитриптическую активность (АТА) и кислотостабильные ингибиторы (КСИ) – по торможению биологическим материалом ферментативного гидролиза трипсином BAEE.

Уровень ТБК-активных продуктов (ТБКАП) в крови оценивали по реакции с тиобарбитуровой кислотой в присутствии ионов Fe<sup>3+</sup>, что характеризовало уровень вторичных активных продуктов ПОЛ [1].

Каталазоподобную активность (КПА) оценивали по остаточному количеству перекиси водорода в реакции с солями молибдена [8]. Пероксидазоподобную активность (ППА) определяли по степени торможения окисления индиготетрасульфата калия пероксидазой сыворотки крови в присутствии перекиси водорода [10]. Уровень церулоплазмينا (ЦП) выявляли по степени расщепления p-фенилендиамина при его инкубации с сывороткой крови [5]. Активность супероксиддисмутазы (СОД) выявляли по степени ингибирования нитросинеготетразолия до гидразинтетразолия, при конкурировании супероксиддисмутазы с нитросинимтетразолием за супероксидные анионы [4].

Все полученные результаты исследований подвергали статистической обработке методами вариационной статистики с использованием критерия достоверности Стьюдента и достоверными считали различия показателей при p<0,05.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные исследования показали, что при развитии РС, осложненного кровопотерей, происходило значительное увеличение ТПА, уровень которой превышал показатель контрольной группы на 67,5% (табл. 1). Данный рост ТПА сопровождался снижением уровня АТА и КСИ на 64,95% и 49,30% соответственно по сравнению с контролем.

Таблица 1

**Динамика изменений протеиназ-ингибиторной системы при РС, осложнённом кровопотерей, и при комбинированном лечении**

Группы животных	Показатели			
	ТПА МкМ/Мл*мин	ЭПА МкМ/мл*мин	АТА ИЕ/мл*мин	КСИ ИЕ/мл*мин
Контроль	0,37±0,05	2,48±0,15	39,26±2,5	11,42±0,14
РС, осложненный кровопотерей, 12 часов	0,62±0,07*	1,78±0,09*	13,76±1,5*	5,79±0,33*
РС, осложненный кровопотерей, 12 часов + корвитин	0,32±0,02**	1,84±0,09*	29,39±0,8***	6,99±0,63*
РС, осложненный кровопотерей 12 часов + гордокс	0,28±0,01**	1,36±0,13**	60,15±2,8***	10,55±0,88**
РС, осложненный кровопотерей 12 часов + корвитин + гордокс	0,26±0,06**	1,28±0,09**	63,42±4,9***	8,03±1,96

Примечание: звёздочками показана достоверность различий (P): \* – по отношению к контролю (P<0,05); \*\* – по отношению к группе с реперфузионным синдромом 12ч, осложнённым кровопотерей без лечения (P<0,05).

Введение корвитина, гордокса и сочетанное применение этих препаратов способствовало нормали-

зации исследуемых показателей. Так, уровень ТПА во всех группах с лечением был ниже контрольных

значений. Введение корвитина приводило к увеличению уровня АТА в 2 раза, а уровня КСИ – на 20,7% по сравнению с нелеченой группой, но уровни обоих ингибиторов оставались ниже контрольных значений. Применение гордокса и сочетанное введение корвитина и гордокса оказалось более эффективным. В этих группах показатели КСИ приблизились к значениям контрольной группы, а показатели АТА даже превысили контрольные значения и увеличились в 3 раза по сравнению с группой без лечения.

При изучении состояния прооксидантно-антиок-

сидантной системы в сыворотке крови крыс с РС, осложненным кровопотерей без лечения, выявлена интенсификация процессов ПОЛ, о чем свидетельствует повышение уровня ТБКАП в сыворотке крови на 91,7% по сравнению с контролем. Также в этой группе было выявлено снижение уровня всех исследуемых показателей антиоксидантной системы, причем самым низким оказался уровень СОД, содержание которого упало на 63,5% по сравнению с контролем. Уровень КПА снизился на 25,8%, ППА – на 55,5%, а ЦП – на 57,1% по сравнению с контролем (табл.2).

Таблица 2

**Динамика изменений окислительно-антиоксидантной системы при РС, осложнённом кровопотерей, и при комбинированном лечении**

Группы животных	Показатели				
	ТБК-АП нМ МДА/мл	ЦП мг/л	КПА мМ/гНб•с	ППА мМ/гНб	СОД Ед/мг*Нб
Контроль	88,57 ±18,8	208,63 ±17,1	0,31 ±0,03	6,12 ±0,31	131,53 ±5,2
РС, осложнённый кровопотерей 12 часов	169,78± 7,3*	89,40 ±1,6*	0,23 ±0,02*	2,72 ±0,28*	47,94 ±7,1*
РС, осложнённый кровопотерей 12 часов +корвитин	136,10 ±35,1	290,90 ±13,5***	0,28 ±0,01**	7,36 ±0,8**	186,85 ±10,9***
РС, осложнённый кровопотерей 12 часов +гордокс	143,76 ±24,5	253,97 ±16,7***	0,43 ±0,02***	4,08 ±0,2***	156,75 ±32,67**
РС, осложнённый кровопотерей 12 часов +корвитин +гордокс	130,45 ±14,5**	280,88 ±16***	0,39 ±0,01***	5,10 ±0,23***	414,26 ±5,8***

Примечание: звездочками показана достоверность различий (P): \* – по отношению к контролю (P<0,05); \*\* – по отношению к группе с реперфузионным синдромом 12ч, осложнённым кровопотерей без лечения (P<0,05).

Степень деструктивно-метаболических нарушений в клетках в этих условиях определяется состоянием антиоксидантной системы, в которой важную роль играют ферменты СОД и каталаза, действующие взаимосвязано. Известно, что избыток  $H_2O_2$  при окислительном стрессе вызывает фрагментацию молекулы СОД с дальнейшей потерей ферментативной активности. При этих условиях ключевая роль в защите клетки от активных кислородных радикалов принадлежит каталазе. Возможно, снижение уровня обоих ферментов по сравнению с контролем может свидетельствовать об истощении возможностей антиоксидантной системы организма [2].

Использование препаратов корвитина и гордокса способствовало снижению уровня ТБКАП и увеличению уровня антиоксидантных ферментов. Введение корвитина привело к снижению уровня ТБКАП

в сыворотке крови на 19,8% по сравнению с группой нелеченых животных. Также применение корвитина более существенно повышало активность как внутриклеточных, так и внеклеточных антиоксидантных ферментов. Причём больше всего выросла активность СОД, почти в 4 раза по сравнению с показателем группы без лечения. Уровень ППА вырос почти в 3 раза, ЦП – более чем в 3 раза, КПА – на 21,7% по сравнению с показателями группы без применения препарата. Использование гордокса оказалось менее эффективным и привело к снижению ТБК-АП на 15,3% по сравнению с показателем группы без лечения. Применение гордокса приводило к менее выраженному росту уровня всех ферментов, так, было выявлено увеличение уровня СОД и ЦП почти в 3 раза, ППА в 1,5 раза, КПА – практически в 2 раза по сравнению с нелеченой группой. Наиболее эффективным

оказалось сочетанное применение корвитина и гордокса, вызвавшее снижение содержания ТБК-АП на 23,1% по сравнению с группой крыс без лечения. При сочетанном применении корвитина и гордокса наблюдалась сходная, но еще более выраженная динамика изменений. Больше всего выросла активность СОД, более чем в 8 раз по сравнению с группой без применения препаратов. Уровень ЦП вырос в 3 раза, ППА и КПА больше чем в 1,5 раза по сравнению с нелеченой группой.

Таким образом, в ходе проведенных исследований выявлено, что при РС, осложненном кровопотерей, происходит активация протеолитических ферментов, сопровождающаяся снижением активности ингибиторов протеиназ. Протеолиз, включающий согласованное взаимодействие протеиназ и их ингибиторов, является особой системой поддержания гомеостаза в организме. Дисбаланс этой системы является мощным повреждающим фактором и может привести к активации деструктивных процессов, приводящих к разрушению белков, выполняющих как структурные (компоненты клеточных мембран), так и транспортные функции [9]. Кроме того, формирование дисбаланса протеиназ-ингибиторной системы сопровождается интенсификацией процессов ПОЛ и снижением активности антиоксидантных ферментов, что свидетельствует о неполной компенсации свободнорадикальных процессов, вызывая нарушение целостности клеточных мембран, их деструкции и гибели клеток [2, 10]. Проведенные исследования с патогенетической коррекцией РС, осложненного кровопотерей, показали, что применение антиоксиданта корвитина оказалось более эффективным в отношении нормализации показателей прооксидантно-антиоксидантной системы. Корвитин способствует инактивации свободных радикалов и повышает эффективность антиоксидантной защиты. В свою очередь, ингибитор протеиназ гордокс оказался более эффективным для коррекции показателей протеиназ-ингибиторной системы. Наибольший эффект был достигнут при сочетанном применении корвитина и гордокса. Применение этих двух препаратов для патогенетической коррекции РС, осложненного кровопотерей, способствовало наиболее выраженному снижению активности процессов липопероксидации и протеолиза, уменьшало истощение локальных и системных механизмов антиоксидантной и антипротеазной защиты организма.

#### ВЫВОДЫ

1. Развитие реперфузионного синдрома, осложненного кровопотерей, приводит к выраженной системной активации протеолитических процессов и ПОЛ в сыворотке крови на фоне развивающегося дефицита ингибиторов протеиназ и антиоксидантов.
2. Применение антиоксиданта корвитина у крыс с реперфузионным синдромом, осложненным кровопотерей, оказывает коррегирующее действие пре-

имущественно на показатели прооксидантно-антиоксидантной системы, а применение ингибитора протеиназ гордокса способствует в большей степени нормализации показателей протеиназ-ингибиторной системы.

3. Сочетанное применение корвитина и гордокса при реперфузионном синдроме, осложненном кровопотерей, обеспечивает наиболее выраженную нормализацию показателей как протеиназ-ингибиторной системы, так и прооксидантно-антиоксидантного потенциала, что с патогенетической точки зрения обосновывает целесообразность их совместного использования при лечении критических состояний.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Гаврилов В.Б. Спектрофотометрическое определение содержания гидроперекисей липидов в плазме крови / В.Б. Гаврилов, М.И. Мешкорудая // Лабораторное дело. – 1983. – № 3. – С. 33-36.
2. Гоженко А.И. Биотрансформация экзогенных окислителей в организме человека и животных / А.И. Гоженко, Н.И. Андрейцова, О.Б. Квасницкая // Актуальные проблемы транспортной медицины. – 2009. – №4(18). – С. 8-18.
3. Гринёв М.В. Цитокин-ассоциированные нарушения микроциркуляции (ишемически-реперфузионный синдром) в генезе критических состояний / М.В. Гринёв, К.М. Гринёв // Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова. – 2010. – №12. – С. 45-49.
4. Дубинина Е.Е. Активность и изоферментный спектр супероксиддисмутазы эритроцитов и плазмы крови человека / Е.Е. Дубинина, Л.А. Сальникова, Л.Ф. Ефимова // Лабораторное дело. – 1983. – №10. – С. 30-33.
5. Колб В. Г. Справочник по клинической химии / В.Г. Колб, В.С. Камышников. – Минск: 1982. – С.290-291.
6. Малова И.Ю. Оценка влияния гепастерила А на течение реперфузионного синдрома / И.Ю. Малова // Фундаментальные и прикладные проблемы медицины и биологии. – 2007. – №8. – С.77-80.
7. Метод визначення активності неспецифічних протеїназ і їх інгібіторів у сироватці крові і біологічних рідинах: методичні рекомендації / [А.В. Кубишкін, В.З. Харченко, П.Ф. Семенець П.Ф. та ін.]. – Київ, 2010. Гринев М.В. Цитокин-ассоциированные – 28с.
8. Метод определения активности каталазы / Королук М. А. , Иванова Л. И. , Майорова И.Б. и др. // Лабораторное дело. – 1988. – № 1. – С. 16-19.
9. Молекулярные механизмы развития экстремальных состояний и их коррекция / [В.З. Харченко, А.В. Кубишкін, И.И. Фомочкина и др.]. – Симферополь: Доля, 2011. – 155с.
10. Попов Т. Метод определения пероксидазной активности крови / Т. Попов, Г. Нейковская // Гигиена и санитария. – 1971. – № 10. – С. 89-91.
11. Makam P. BTK Stenting in Critical Limb Ischemia / Endovascular Today. – September, 2010. – P.69-72.