

Ключові слова: опікова рана, метилурацилова мазь, наночастки срібла, загоєння.

Summary

WOUND HEALING ACTION OF METHYLURACYLUM OINTMENT WITH SILVER NANOPARTICLES ON THERMAL BURN IN RATS

Zvyagintseva T.V., Mironchenko S.I., Grin I.V.

We investigated the wound healing effectiveness of methyluraculum ointment with silver nanoparticles in thermal burn

model in rats. It is shown that metiluraculum ointment with silver nanoparticles accelerates the healing of burn wounds of the skin, exceeding thereparative effect of methyluraculum ointment.

Key words: thermal burn, methyluraculum ointment, silver nanoparticles, wound healing

Впервые поступила в редакцию 05.05.2014 г. Рекомендована к печати на заседании редакционной коллегии после рецензирования

УДК 616.718+616.005+616-008.64:616-092.4

СОСТОЯНИЕ НЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ ПРОТЕИНАЗ И ИХ ИНГИБИТОРОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ И МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ РЕПЕРФУЗИОННОМ СИНДРОМЕ

Мальченко О.А., Анисимова Л.В., Кубышкин А.В., Харченко В.З.
Крымский медицинский университет имени С. И. Георгиевского, г. Симферополь. E-mail: anisimova.l@patfiz-csmu.net

30

Поведенные исследования показали, что развитие экспериментального синдрома ишемии-реперфузии сопровождается изменением активности неспецифических протеиназ и их ингибиторов в сыворотке крови и мышечной ткани. В мышечной ткани в большей степени активируются протеиназы, обладающие высоким деструктивным потенциалом, а их активация сопровождается угнетением протекторного ингибиторного потенциала, прежде всего за счет снижения активности местносинтезируемых кислотостабильных ингибиторов. На системном уровне реперфузионные нарушения характеризуются активацией в первую очередь трипсиноподобных протеиназ, способных приводить к активации большого количества регуляторных протеолитических систем и запускать каскад системных нарушений. Развивающийся системный дисбаланс протеиназ и их ингибиторов сыворотки крови может играть ключевую роль в прогрессировании патологии и приводить к развитию системных осложнений.

Ключевые слова: реперфузионный синдром, сыворотка крови, мышечная ткань, протеолиз.

Введение

В настоящее время реперфузионный синдром рассматривается как важнейший патофизиологический феномен, который инициирует тяжелые метаболические расстройства гомеостаза, способствует развитию нарушений микроциркуляторного русла и системной гемодинамики, обуславливает развитие по-

лиорганной недостаточности у больных и пострадавших с критическими состояниями [1, 2]. Особенно ярко реперфузионный синдром проявляется в тех случаях, когда ишемии-реперфузии подвергается мышечная ткань, что связано с высокой чувствительностью мышц к гипоксии [3,4]. Причем ключевым патогенетическим звеном при развитии репер-

фузионного синдрома следует считать изменения в ишемизированных тканях, которые приводят к возрастанию тяжести последствий ишемии после восстановления кровотока [1].

Следует отметить, что если изучению системного уровня осложнений уделяется достаточно много внимания [5], то взаимосвязи системных и местных изменений, от которых в первую очередь зависит характер и степень выраженности осложнений, изучаются гораздо менее интенсивно [6]. Среди наиболее существенных факторов повреждения тканей следует выделить неспецифические протеиназы. Избыточная активация протеиназ является важным патогенетическим звеном в развитии ряда деструктивных и воспалительных реакций организма [7, 8]. Таким образом, состояние неспецифических протеиназ и их ингибиторов может оказывать существенное влияние на повреждение мышечной ткани при реперфузионном синдроме, а, следовательно, и на развитие системных осложнений.

Цель работы — установить характер изменений неспецифических протеиназ и их ингибиторов в сыворотке крови и мышечной ткани ранее ишемизированной конечности крыс и их роль в патогенезе реперфузионного синдрома.

Материалы и методы исследования

Экспериментальные исследования проведены на 59 белых крысах-самцах линии «Вистар» массой 180-210 г в соответствии с принципами биоэтики.

Синдром ишемии-реперфузии моделировали путём наложения резиновых жгутов на обе задние конечности на уровне паховой складки сроком на 6 часов. Ширина пережатия тканей составила 2-3 мм. Показателем правильности наложения жгута являлось отсутствие отёка конечностей и бледность их окраски. Забой животных осуществляли под тиопенталовым наркозом через 6 часов после наложения жгутов, и через 6, 12, 24 и 48 часов после реперфузии.

Материалом для исследования служила сыворотка крови и супернатант гомогената скелетных мышц ранее ишемизированной конечности крыс. Определение активности компонентов протеиназной ингибиторной системы в проводили с использованием энзиматических методов [9] на спектрофотометре «Biomat 5» (Великобритания). Трипсиноподобную активность (ТПА) определяли по скорости отщепления N-бензоил-L-аргинина от синтетического субстрата этилового эфира N-б-Benzoil-L-arginine ethyl ester hydrochloride (BAEE) (Sigma). Определение эластазоподобной активности (ЭПА) проводили на основании изучения скорости гидролиза синтетического субстрата Boc-L-alanine-4-nitrophenil ester (Boc-Ala-ONp) (Sigma). Определение концентрации альфа-1-ингибитора протеиназ (АТА) проводили на основании торможения расщепления трипсином BAEE. Аналогично определялась активность кислотостабильных ингибиторов (КСИ) после предварительной подготовки сыворотки и супернатанта гомогенатов скелетных мышц путём прогревания в кислой среде. Общий белок исследовали спектрофотометрическим методом по Лоури.

Статистическая обработка полученных данных проведена с применением методов вариационной статистики с вычислением средних величин (M), оценкой вероятности расхождений (m), оценкой достоверности изменений с использованием t -критерия Стьюдента. За достоверную принималась разность средних значений при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

При определении протеолитической активности в сыворотке крови и супернатанте гомогенатов скелетных мышц ранее ишемизированной конечности при моделировании синдрома ишемии-реперфузии выявлены изменения, характеризующиеся следующими тенденциями. Активность эластазоподобных протеиназ в сыворотке крови при ишемии-реперфузии характеризовалась

снижением показателя по отношению к контрольной группе после 6 часов ишемии в сыворотке крови происходило незначительное повышение уровня ЭПА, а в гомогенатах скелетных мышц изменений практически не отмечалось (рис. 1).

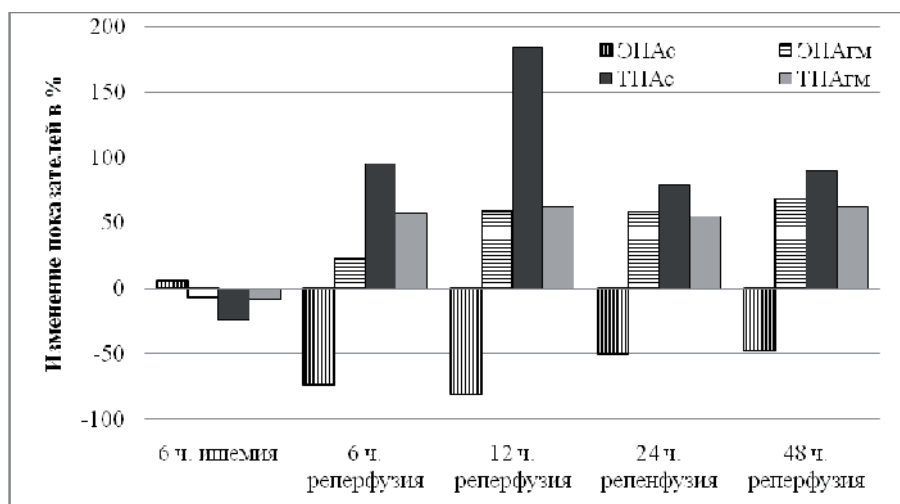


Рис. 1. Активность протеолитических ферментов в сыворотке крови (с) и гомогенатах скелетных мышц ранее ишемизированных конечностей (гм) в условиях моделирования ишемии-реперфузии.

Уже через 6 часов реперфузии ЭПА сыворотки крови существенно снижалась относительно контроля в 3,8 раза ($p < 0,001$), а в гомогенатах мышц данный показатель достоверно увеличился в 1,4 раза ($p < 0,001$). В экспериментальной группе животных перенесших 12 часов реперфузии ЭПА сыворотки крови стала меньше, чем в группе контроля в 5,3 раза ($p < 0,001$), а гомогенатов скелетных мышц — выше в 1,6 раза ($p < 0,001$). У животных, перенесших 24 и 48 часов реперфузии в сыворотке крови происходило не столь выраженное снижение ЭПА, чем в предыдущих группах и ее показатели были меньше контроля в 2 раза ($p < 0,001$), а в гомогенатах скелетных мышц данный показатель прогрессивно увеличился до 1,7 раза ($p < 0,001$).

Исследование ТПА сыворотки крови и гомогенатов скелетных мышц ранее ишемизированных конечностей экспериментальных животных выявило увеличение активности данных протеиназ по отношению к контрольной группе. Так после 6 часов ишемии в сыворотке кро-

ви ТПА снизилась в 1,3 раза, а в гомогенатах скелетных мышц практически не изменялась. В то же время уже через 6 часов после реперфузии ТПА в сыворотке крови увеличилась в 2 раза ($p < 0,001$), а в гомогенатах скелетных мышц

– в 1,6 раза ($p < 0,001$). В группе животных после 12-ти часов реперфузии ТПА сыворотки крови увеличилась в 2,8 раза ($p < 0,001$), а гомогенатов скелетных мышц – в 1,6 раза ($p < 0,001$). В группе животных спустя 24 часа реперфузии ТПА в сыворотке крови статистически досто-

верно увеличилась в 1,8 раза ($p < 0,001$), а в гомогенатах скелетных мышц – в 1,6 раза ($p < 0,01$). ТПА сыворотки крови животных, перенесших 48 часовую реперфузию увеличилась в 1,9 раза ($p < 0,001$), а гомогенатов скелетных мышц конечностей животных — в 1,6 раза ($p < 0,001$).

Исследования ингибиторной активности сыворотки крови и гомогенатов скелетных мышц крыс с моделью синдрома ишемии-реперфузии показали, что у экспериментальных животных наблюдалось разнонаправленная динамика АТА по отношению к контрольной группе. В экспериментальной группе, которую составили животные, перенесшие 6 часов ишемии АТА в сыворотке крови увеличилась всего на 10 %, а в гомогенатах скелетных мышц – в 1,3 раза, однако эти изменения были статистически недостоверны (рис. 2). Кроме того если на уровне тканей повышенная антитриптическая активность превосходила контрольные значения в 2-3 раза во все сроки наблюдения, то в сыворотке крови происходило прогрессивное снижение АТА. Так у животных перенесших 6-ти часовую ре-

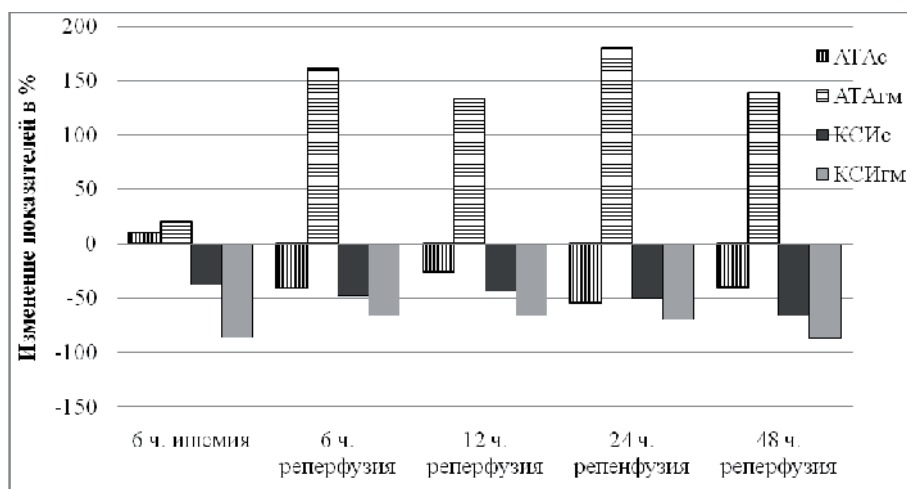


Рис. 2. Активность ингибиторов протеолитических ферментов в сыворотке крови (с) и гомогенатах скелетных мышц (гм) ранее ишемизированных конечностей в условиях моделирования ишемии-реперфузии.

реперфузию АТА в сыворотке крови уменьшилась в 1,7 раза ($p < 0,001$), тогда как в гомогенатах скелетных мышц увеличилась в 2,7 раза ($p < 0,001$). В группе экспериментальных животных спустя 12 часов реперфузии АТА сыворотке крови снизилась в 1,3 раза ($p < 0,001$), гомогенатов скелетных мышц конечностей выросла в 2,4 раза ($p < 0,001$). АТА сыворотки крови у группы после 24-х часовой реперфузией уменьшилась в 2,2 раза ($p < 0,001$), гомогенатов скелетных мышц конечностей увеличилась в 2,9 раза ($p < 0,001$). А у животных из группы, перенесших 48 часов реперфузии АТА сыворотки крови снизилась в 1,7 раза ($p < 0,001$), в гомогенатах скелетных мышц увеличилась в 2,4 раза ($p < 0,001$).

Активность КСИ в сыворотке крови и в гомогенатах скелетных мышц экспериментальных животных с моделью синдрома ишемии-реперфузии снижалась относительно животных, составивших контрольную группу. Так у животных через 6 часов после ишемии активность КСИ снижалась в сыворотке крови в 1,6 раза ($p < 0,001$), а гомогенатах скелетных мышц – в 2,7 раза ($p < 0,001$). В группе экспериментальных животных после 6-ти часовой реперфузии активность КСИ сыворотки крови была в 1,9 раза ($p < 0,001$) ниже, а в гомогенатах скелетных мышц — в 2,9 раза ($p <$

0,001). После 12-ти часов реперфузии уровень активности КСИ в сыворотке крови снизился в 1,8 раза ($p < 0,001$), а в гомогенатах скелетных мышц данный показатель был практически аналогичен группе экспериментальных животных с 6-ти часовой реперфузией. У животных, перенесших 24 часа репер-

фузии активность КСИ сыворотки крови снизилась в 2 раза ($p < 0,001$), гомогенатов скелетных мышц – в 3,3 раза ($p < 0,001$). В экспериментальной группе после 48 часов реперфузии активность КСИ сыворотки крови была в 2,9 раза ($p < 0,001$) ниже, а в гомогенатах скелетных мышц – в 8 раз ($p < 0,001$).

Проведенные нами исследования состояния протеиназ-ингибиторной системы в сыворотке крови и гомогенатах скелетных мышц ранее ишемизированных конечностей у крыс с моделью синдрома ишемии-реперфузии выявили, что максимальное угнетение ЭПА сыворотки крови наблюдалось у животных с 12-ти часовой реперфузией на фоне максимального увеличения ТПА. В гомогенатах скелетных мышц максимальное увеличение ЭПА происходило у крыс перенесших 48-ми часовую реперфузию, а ТПА максимально увеличивалась уже после 12-ти часов реперфузии. Наибольшее угнетение антитриптической активности в сыворотке крови по сравнению с группой контроля наблюдалось у животных после 24-х часов реперфузии, а максимальный дефицит КСИ сыворотки крови относительно контрольной группы был у группы животных с 48-ми часовой реперфузией. В гомогенатах скелетных мышц наибольшее увеличение антитриптической активности наблюдалось после 24-х часов реперфузии, а максимальный де-

фицит КСИ отмечен у животных с 48-ми часовой реперфузией.

Как видно из представленных данных, развитие экспериментального синдрома ишемии-реперфузии сопровождается изменением активности неспецифических протеиназ и их ингибиторов в сыворотке крови и мышечной ткани. В мышечной ткани в большей степени активируются протеиназы, обладающие высоким деструктивным потенциалом, а их активация сопровождается угнетением протекторного ингибиторного потенциала, прежде всего за счет снижения активности местносинтезируемых КСИ. На системном уровне реперфузионные нарушения характеризуются активацией в первую очередь трипсиноподобных протеиназ, способных приводить к активации большого количества регуляторных протеолитических систем и запускать каскад системных нарушений. Развивающийся системный дисбаланс протеиназ и их ингибиторов сыворотки крови может играть ключевую роль в прогрессировании патологии и приводить к развитию системных осложнений, включающих ДВС-синдром и синдром полиорганной недостаточности.

Выводы

1. Экспериментальная шестичасовая ишемия нижних конечностей крыс приводит к угнетению синтеза и секреции кислотостабильных ингибиторов протеиназ на системном и локальном уровнях, но не сопровождается активацией трипсино- и эластазоподобных протеиназ.
2. Реперфузия мышечной ткани после ишемии приводит к выраженной активации неспецифических протеиназ и угнетению местносинтезируемых ингибиторов, которые зависят от срока формирования реперфузии.
3. Системный дисбаланс с нарастанием протеиназной активности в сыворотке крови, зависящий от степени локального повреждения ткани, может способствовать прогрессированию

патологии и формированию системных осложнений, включающих развитие синдрома полиорганной недостаточности.

Литература

1. Гринев М.В. Цитокин-ассоциированные нарушения микроциркуляции (ишемически-реперфузионный синдром) в генезе критических состояний /М.В. Гринев, К.М. Гринев // Хирургия. — 2010. — №12.- С.70-76.
2. Вазопротекторный эффект классического ишемического прекодиционирования / Л.Н. Маслов, А.В. Крылатов, А.С. Горбунов [и др.] //Сибирский медицинский журнал. — 2012. — № 1.- С.9-17.
3. Новикова Н.А. Возможности реперфузионной терапии при остром коронарном синдроме с подъемом сегмента ST /А.Н. Новикова, М.Ю. Гиляров, А.Л. Сыркин // Болезни сердца и сосудов. — 2011.- № 3.- С.8-10.
4. Ультраструктура гладких миоцитов мышечного слоя кишечника экспериментальных животных с моделированной гипоксией / В.В. Бойко, В.Г. Грома, В.П. Невзоров // Экспериментальна і клінічна медицина.-2011.- №3.-С. 22-25.
5. Соколова О.В. Нарушения функции печени при синдроме полиорганной недостаточности у кардиохирургических больных /О.В. Соколова // Вестник Национального медико-хирургического Центра им. Н.И. Пирогова.-2012.-№2.-С.127-132.
6. Determinants of microvascular damage recovery after acute myocardial infarction: results from the acute myocardial infarction contrast imaging (AMICI) multicentre study/ S. Funaro, L. Galiuto, F. Vocolini [et al.]// Eur. J. Echocardiogr. — 2011. — Vol. 12, No. 4. — P. 306–312
7. Патогенетическое значение протеолитических и цитокиновых механизмов при реперфузионном синдроме / М.И. Федосов, И.И. Фомочкина, А.В. Кубышкин [и др.] // Таврический медико-биологический вестник. — 2012. — № 3. — С. 354-357.
8. Анисимова Л.В. Роль активации неспецифических протеиназ сыворотки крови в формировании синдрома полиорганной недостаточности /Л.В. Анисимова / Вестник неотложной и восстановительной медицины.-2013.-т.14, №2.-С.193-195.

9. Методи визначення активності неспецифічних протеїназ і їх інгібіторів у сироватці крові і біологічних рідинах (методичні рекомендації) / А.В. Кубишкін, В.З. Харченко, П.Ф. Семенець [та ін.] – Київ 2010 — 28с.

References

1. Grinyov M.V. Cytokine-associated microcirculatory disorders (ischemia-reperfusion syndrome) in the genesis of critical states / M.V. Grinyov, K.M. Grinyov / Surgery. — 2010. — №12.- P.70-76.
2. Vasoprotective effect of classic ischemic preconditioning /L.N. Maslov, A.V. Krylatov, A.S. Gorbunov [et ai.] //The Siberian Medical Journal. — 2012. — № 1.- С.9-17.
3. Novikov N.A. Possibility of reperfusion therapy with acute coronary syndrome with elevation segment ST / A.N Novikova, M. Yu. Gilyarov A.L. Sirkin // Heart disease and vessels. — 2011.- № 3.- P.8-10.
4. Ultrastructure of smooth muscle cells of the muscular layer of the intestine in experimental animals with simulated hypoxia / V.V. Boiko, V.G. Thunder V.P. Nevzorov // Experimental and Clinical Medicine.-2011.- №3.-P. 22-25.
5. Sokolova O.V. Liver function abnormalities in the syndrome of multiple organ failure in cardiosurgical patients /O.V. Sokolova // Bulletin of Pirogov national medical-surgical center.-2012.-№2.-P.127-132.
6. Determinants of microvascular damage recovery after acute myocardial infarction: results from the acute myocardial infarction contrast imaging (AMICI) multicentre study/ S. Funaro, L. Galiuto, F. Voccalini [et al.]// Eur. J. Echocardiogr. – 2011. – Vol. 12, No. 4. – P. 306–312
7. Pathogenetic significance of proteolytic and cytokine mechanisms in reperfusion syndrome / M.I. Fedosov, I.I. Fomochkina, A.V. Kubyshkin [et al.] // Tavrichesky medicobiological vestnik. — 2012. — № 3. — P. 354-357.
8. Anisimova L.V. The role of the activation non-specific serum proteases in forming of multiple organ dysfunction syndrome /L.V. Anisimova // Bulletin of urgent and recovery medicine.-2013.-Vol. 14, №2.-P.193-195.
9. Methods of determination of non-specific proteases and their inhibitors in serum and biological fluids (methodical recommendations) / A.V. Kubyshkin V.Z. Kharchenko, P.F. Semenech [et al.] – Kiev.-

2010.- 28р.

Резюме

СТАН НЕСПЕЦИФІЧНИХ ПРОТЕЇНАЗ ТА ЇХ ІНГІБІТОРІВ У СИРОВАТЦІ КРОВІ ТА М'ЯЗОВІЙ ТКАНИНІ ЩУРІВ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ РЕПЕРФУЗІЙНОМУ СИНДРОМУ

Мальченко О.О., Анисимова Л.В., Кубишкін А.В., Харченко В.З.

Поведені дослідження показали, що розвиток експериментального синдрому ішемії — реперфузії супроводжується зміною активності неспецифічних протеїназ та їх інгібіторів у сироватці крові і м'язовій тканині. У м'язовій тканині більшою мірою активуються протеїнази, що володіють високим деструктивним потенціалом, а їх активація супроводжується пригніченням протекторного інгібіторного потенціалу, насамперед за рахунок зниження активності кіслотостабільних інгібіторів, що синтезуються місцево. На системному рівні реперфузійні порушення характеризуються активацією в першу чергу трипсиноподібних протеїназ, здатних призводити до активації великої кількості регуляторних протеолітичних систем і запускати каскад системних порушень. Такий системний дисбаланс протеїназ та їх інгібіторів сироватки крові може відігравати ключову роль у прогресуванні патології і приводити до розвитку системних ускладнень.

Ключові слова: реперфузійний синдром, сироватка крові, м'язова тканина, протеоліз.

Summary

THE STATE OF NONSPECIFIC PROTEINASES AND THEIR INHIBITORS IN BLOOD SERUM AND MUSCULAR TISSUE OF RATS UNDER EXPERIMENTAL REPERFUSION INJURY.

Malchenko O.A., Anisimova L.V., Kubyshkin A.V.

The provided research has shown, that the progress of experimental reperfusion injury is accompanied by changes of nonspecific proteinases' and

their inhibitors' activity both in the blood serum and muscular tissue. In the muscular tissue the proteinases with high destructive potential are activated; their activation is accompanied by inhibition of protective inhibitory potential, first of all due to the reduction of locally synthesized acid-stable inhibitors' activity. On the system level the reperfusion malfunctions are characterized, in the first instance, by activation of tripsin-like proteinases, which are able to activate numerous regulatory proteolytic systems

and launch the cascade of systemic disorders. The increased systemic imbalance of proteinases and their inhibitors in the blood serum can have a key part in the progress of pathology and lead to systemic complications.

Keywords: reperfusion syndrome, blood serum, muscle tissue proteolysis.

*Вперше постуила в редакцію 05.05.2014 г.
Рекомендована к печати на заседании редакционной коллегии после рецензирования*

УДК:616.24 – 002 – 008.6 – 056.3 – 092] 612.35 – 014 – 015.11] – 08

ЗРУШЕННЯ ФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ ОКРЕМИХ ПОКАЗНИКІВ АНТИОКСИДАНТНОЇ ТА ПРООКСИДАНТНОЇ СИСТЕМ В ПЕЧІНКОВІЙ ТКАНИНІ ТВАРИН НА ФОНІ РОЗВИТКУ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АЛЕРГІЧНОГО АЛЬВЕОЛІТУ ТА ЇХ КОРЕКЦІЯ

Семенців Н.Г.

Кафедра патологічної фізіології, Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, м. Львів, Україна; nsen@online.ua

36

В даній роботі висвітлено, що за умов розвитку експериментального алергічного альвеоліту в печінковій тканині морських свинок відбувається активація процесів перекисного окислення ліпідів (ПОЛ), що проявляється підвищенням рівня малонового діальдегіду (МДА), та дієнового кон'югату (ДК). Досліджено, що показники антиоксидантної системи (АОС) – супероксиддисмутази (СОД) та каталаза зростають на 34 добу ЕАА, а починаючи із 44 дня досліджень спостерігаємо зниження активності ферментів антиоксидантної системи, що може свідчити про її виснаження. Після введення ретаболілу з лікувальною метою спостерігали зниження показників прооксидантної системи та зростання рівня антиоксидантів, що може свідчити про позитивний ефект даного препарату на стан ПОЛ та АОС.

Ключові слова: експериментальний алергічний альвеоліт, антиоксидантна система (АОС), перекисне окислення ліпідів(ПОЛ).

Вступ

Екзогенний алергічний альвеоліт (ЕАА) є одним з імунно-алергічних захворювань легень, що характеризується дифузним ураженням альвеол та термінальних бронхіол, які виникають внаслідок інгаляції дрібнодисперсних частинок органічного порошку. [7, 8]. Недосконало вивчений патогенез хвороби, зокрема роль процесів перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) та активності ферментів антиоксидантної системи (АОС), зокрема

в печінковій тканині при даній патології. Відомо, що при сенсibiliзації організму пошкоджується багато органів. Одним з найбільш ранимих є печінка. Активація ПОЛ і висока активність протеолізу створює сприятливі умови для розвитку запального процесу в легенях. Крім цього продукти ПОЛ підвищують проникливість лізосомальних мембран легеневої тканини, що призводить до виходу з лізосом протеолітичних ферментів, які викликають пошкоджуючу дію на клітини [12].