

УДК 615.811.1:612.128:616-005.4:577.11/12:616-092.4

© А.А. Жукова, А.В. Кубышкин, В.З. Харченко, 2012.

ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЙ ПРОТЕИНАЗ-ИНГИБИТОРНОЙ И ОКИСЛИТЕЛЬНО-АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМ ПРИ РЕПЕРFUЗИОННОМ СИНДРОМЕ, ОСЛОЖНЕННОМ КРОВОПОТЕРЕЙ

А.А. Жукова, А.В. Кубышкин, В.З. Харченко

ГУ «Крымский государственный медицинский университет им. С.И. Георгиевского», кафедра патологической физиологии (зав. кафедрой – профессор А.В. Кубышкин) г. Симферополь.

CHANGES OF PROTEINASES, THEIR INHIBITORS, PROOXIDANTS AND ANTIOXIDANTS IN THE REPERFUSION SYNDROME, COMPLICATED WITH HAEMORRHAGE

A.A. Zhukova, A.V. Kubishkin, V.Z. Kcharchenko

SUMMARY

Experimental studies have established, that the simulation of reperfusion disorders observed activation of proteolytic enzymes and lipid peroxidation, which is accompanied by a decrease in the level of proteinase inhibitors and antioxidant enzyme levels. These data help to establish the role of proteases and their inhibitors, and the state of prooxidant-antioxidant system in the pathogenesis of reperfusion syndrome, complicated by haemorrhage.

ДИНАМІКА ЗМІН ПРОТЕІНАЗ-ІНГІБІТОРНОЇ І ОКИСЛЮВАЛЬНО-АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМ ПРИ РЕПЕРFUЗІЙНОМУ СИНДРОМІ, УСКЛАДНЕНОМУ КРОВОВТРАТОЮ.

Г.О. Жукова, А.В. Кубишкін, В.З. Харченко

РЕЗЮМЕ

Експериментальними дослідженнями встановлено, що при моделюванні реперфузійних порушень спостерігається активація протеолітичних ферментів і перекисного окиснення ліпідів, що супроводжується зниженням рівня інгібіторів протеїназ і антиоксидантних ферментів крові. Отримані дані допомагають встановити роль роль протеїназ та їх інгібіторів, та стану прооксидантно-антиоксидантної системи в патогенезі реперфузійного синдрому, ускладненого крововтратою.

Ключевые слова: реперфузионный синдром, кровопотеря, протеиназы, ингибиторы протеиназ, перекисное окисление липидов, антиоксиданты.

Изучение метаболических механизмов развития реперфузионного синдрома, осложненного кровопотерей, является одним из важнейших направлений современной медицины экстремальных состояний. Это связано с тем, что травмы полученные пострадавшими вследствие сдавления тканей обломками зданий, сооружений, горными породами, относятся к наиболее частым поражениям (20-30%), возникающим при катастрофах [6]. При этом часто пострадавшие длительное время находятся под завалами, что в последующем приводит к развитию реперфузионного синдрома (РС), который часто осложняется кровопотерей. Также реперфузионные повреждения представляют собой одну из наиболее серьезных проблем современной хирургии. Так при реконструктивных операциях на конечностях, процент летальности от развития реперфузионных осложнений в послеоперационный период составляет 7,4% [11].

В основе патогенеза системных реперфузионных нарушений лежит процесс поступления накопившихся в тканях токсических метаболитов, которые попадают в системный кровоток, что может привести к формированию таких тяжелых осложнений как респираторный дистресс синдром, дисфункция печени и почек, тяжелая полиорганная

недостаточность [6, 8]. По мнению исследователей одним из ключевых звеньев патогенеза РС является неконтролируемая активация свободно-радикального окисления, которая сопровождается снижением антиоксидантного потенциала организма. Еще одной системой организма, которая реагирует на различные виды повреждений, является протеиназ-ингибиторная система. Развитие дисбаланса протеиназ – ингибиторной системы, возникающее вследствие действия на организм патологических факторов приводит к повреждению тканей различных органов, нарушению их структуры и функций [1]. Причем острая кровопотеря является фактором, усугубляющим протекание и прогноз РС. При острой кровопотере происходит нарушение кислородтранспортной функции крови, что вызывает уменьшение поступления кислорода в ткани, приводит к их гипоксии и ишемии, является дополнительным фактором активации перекисного окисления липидов (ПОЛ) и протеолиза.

В связи с этим, целью нашей работы явилось установление роли протеиназ и их ингибиторов и состояния прооксидантно-антиоксидантной системы в патогенезе реперфузионного синдрома, осложненного кровопотерей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования были проведены на 46 белых крысах линии «Vistar» (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 обе задние конечности сроком 6 часов под легким эфирным наркозом. РС моделировали путем 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» (Strasbourg, 18.03.1986).

Исследуемые животные были разделены на 4 группы: I группа – контрольная, интактные животные (n=12), II группа – ишемия 6ч, без реперфузии, (n=10), III группа – РС 12ч, (n=12), IV группа – РС 12ч, осложненный кровопотерей (n=12).

Для оценки степени метаболических нарушений определяли следующие показатели протеиназ-ингибиторной и окислительно-антиоксидантной систем.

Активность протеиназ и их ингибиторов исследовали с использованием энзиматических методов [4]. Эластазоподобную активность (ЭПА) определяли по скорости ферментативного гидролиза синтетического субстрата N-т-бок-L-аланил-п-нитрофенилового эфира (БАНФЭ), трипсиноподобную активность (ТПА) по скорости отщепления бензоил-аргинина от N- α -бензоил-L-аргинин-этилового эфира (БАЭЭ), антитриптическую активность (АТА) и кислотостабильные ингибиторы (КСИ) по торможению биологическим материалом ферментативного гидролиза трипсином БАЭЭ.

Уровень ТБК активных продуктов (ТБКАП) в крови оценивали по реакции с тиобарбитуровой кислотой в присутствии ионов Fe³⁺, что характеризовало уровень вторичных активных продуктов ПОЛ [3]. Каталазоподобную активность (КПА) оценивали по остаточному количеству перекиси водорода в реакции с солями молибдена [5]. Пероксидазоподобную активность (ППА) определяли по степени торможения окисления индиготетрасульфата калия пероксидазой сыворотки крови в присутствии перекиси водорода [7]. Уровень церулоплазмينا (ЦП) выявляли по степени расщепления p-фенилендиамина при его инкубации с сывороткой крови [7]. Активность супероксиддисмутазы (СОД) выявляли по степени ингибирования нитросинего тетразолия до гидразинтетразолия, при конкурировании супероксиддисмутазы с нитросинимтетразолием за супероксидные анионы [2].

Все полученные результаты исследований подвергали статистической обработке методом вариационной статистики, с выведением критерия достоверности Стьюдента, достоверными считали показатели при p<0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты проведенных исследований показали, что у животных II группы, у которых моделировалась ишемия, а ревазуляризация не проводилась происходило снижение уровня ТПА на 29,7% и ЭПА на 18,5 % по сравнению с контрольной группой животных. При этом у крыс данной группы было выявлено незначительное увеличение уровня АТА на 12,4% и значительное снижение уровня КСИ на 62,3%. У крыс с РС и РС, осложненным кровопотерей происходило увеличение уровня ТПА на фоне снижения количества АТА и КСИ (табл. 1).

Причем более выраженное повышение активности трипсиноподобных протеиназ сыворотки крови на 67,5% и снижение уровня б1-ингибитора протеиназ на 64,9%, кислотостабильных ингибиторов – на 49,2% по сравнению с контрольной группой наблюдалось при РС, осложненном кровопотерей.

Таблица 1

Динамика изменений протеиназ-ингибиторной системы крови при РС, осложненном кровопотерей

Показатель серия	ТПА	ЭПА	АТА	КСИ
	Мк/Мл*мин	МкМ/мл*мин	ИЕ/мл*мин	ИЕ/мл*мин
Контроль	0,37±0,05	2,48±0,15	39,3±2,54	11,4±0,14
Ишемия 6часов	0,26±0,01	2,02±0,19	44,1±1,47	4,3±0,69
Реперфузионный синдром 12часов	0,56±0,05	0,89±0,03	22,4±1,98	3,03±0,50
РС, осложненный кровопотерей, 12часов	*		*	*
	0,62±0,07	1,78±0,09	13,8±1,53	5,8±0,33

Примечание: * – показана достоверность различий (P) по отношению к контролю (P<0,05).

При исследовании прооксидантно-оксидантной системы у крыс с моделью ишемии было выявлено недостоверное повышение содержания ТБКАП на 11,3%, которое сопровождалось незначительным снижением уровня ЦП на 15%, и увеличением количества остальных антиоксидантных ферментов: КПА на 83,8%, ППА на 74,3%, СОД на 86 % (табл.2). У крыс с моделями РС и РС, осложненного кровопотерей происходило увеличение содержания ТБКАП, которое сопровождалось снижением уровня

как сывороточных антиоксидантов (церулоплазмин), так и внутриклеточных антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутаза, каталаза, пероксидаза). Наиболее выраженный рост содержания ТБКАП в сыворотке крови на 91,7% ($P<0,001$), а также снижение пероксидазоподобной активности на 42,8% ($P<0,001$), активности супероксиддисмутаза – на 63,5% ($P<0,001$), а церулоплазмينا – на 57,1% ($P<0,001$) по сравнению с контролем наблюдается при РС, осложненном кровопотерей.

Таблица 2

Динамика изменений окислительно-антиоксидантной системы крови при РС, осложненном кровопотерей

Показатель	ТБК-АП нМ МДА/мл	ЦП мг/л	КПА мМ/gHb•с	ППА мМ/gHb	СОД Ед/мг*Hb
серия					
Контроль	88,6±18,9	208,6±17,17	0,31±0,03	6,12±0,31	131,5±5,18
Ишемия 6 часов	98,6±8,4	172,2±17,40	0,57±0,04	10,67±0,44	244,7±21,69
Реперфузионный синдром 12 часов	160,2±10,1	110,1±5,21	0,37±0,05	3,32±0,10	62,5±3,22
РС, осложненный кровопотерей 12 часов	169,8±7,32	89,4±1,62	0,23±0,02	2,72±0,28	47,9±7,09

Примечание: * – показана достоверность различий (P) по отношению к контролю ($P<0,05$).

Следует отметить, что характер изменений протеиназ-ингибиторного потенциала и процессов перекисного окисления липидов коррелировал с выживаемостью животных при моделировании ишемии-реперфузии. Шестичасовая ишемия задних конечностей крыс ни в одном из случаев не приводила к летальному исходу. В группе с развитием реперфузионного синдрома в течение 12 часов реперфузии погибло 17 % животных, тогда как при РС, осложненном кровопотерей, летальность составила уже 34%, что свидетельствует о более тяжелом протекании РС, осложненном кровопотерей.

Таким образом, в ходе проведенных исследований было выявлено, что при моделировании ишемии задних конечностей у крыс происходит повышение антитриптической активности и снижение трипсиноподобной активности крови. По-видимому, снижение протеолитической активности вызвано активацией антипротеазной системы, что является отражением «острофазной» реакции организма и носит защитный характер. Также при моделировании ишемии наблюдается увеличение активности антиоксидантных ферментов крови на фоне незначительного увеличения уровня ТБКАП крови, что также может свидетельствовать об активации защитных сил организма на действие повреждающего фактора.

При моделировании РС и РС, осложненного кровопотерей происходит увеличение ТПА, которое сопровождалось снижением уровня обоих

ингибиторов протеиназ. Причем при РС, осложненном кровопотерей наблюдалось более выраженное увеличение ТПА и более выраженное снижение уровня ингибиторов протеиназ, что по-видимому отражает силу действия повреждающих факторов и состояние защитных сил организма. Также при моделировании РС и РС, осложненного кровопотерей, происходит увеличение уровня ТБКАП, сопровождающееся снижением активности всех исследуемых антиоксидантных ферментов. Снижение активности ингибиторов протеиназ и антиоксидантных ферментов свидетельствует об истощении компенсаторных возможностей организма при действии повреждающего фактора.

ВЫВОДЫ

1. Ишемия нижних конечностей в течение 6 ч у крыс приводит к повышению уровня ингибиторов протеиназ и антиоксидантной системы, которое компенсирует активацию ПОЛ и протеолитических ферментов и свидетельствует об активации компенсаторных реакций организма при действии повреждающего фактора.

2. Развитие РС сопровождается чрезмерной активацией протеолиза и ПОЛ, что приводит к дисбалансу протеиназ-ингибиторной и прооксидантно-антиоксидантной систем с превалированием протеиназ и оксидантов.

3. Кровопотеря на фоне РС усугубляет его течение, что проявляется более выраженной активацией протеиназ и свободнорадикальных

процессов на фоне угнетения антипротеиназ и антиоксидантов и сопровождается увеличением летальности экспериментальных животных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Акбашева О.Е., Загрова Т.А., В.Ю. Серебров. Показатели протеолиза и фенотипы β_1 -протеиназного ингибитора при язвенной болезни двенадцатиперстной кишки // Вопросы медицинской и фармацевтической химии. – 2007. №2. – С.41-44.

2. Дубинина Е.Е., Сальникова Л.А., Ефимова Л.Ф. Активность и изоферментный спектр супероксиддисмутазы эритроцитов и плазмы крови человека // Лабораторное дело. – 1983. - №10. – С. 30-33.

3. Гаврилов В.Б., Мешкорудя М.И. Спектрофотометрическое определение содержания гидроперекисей липидов в плазме крови // Лаб. Дело. – 1983. - № 3. – с. 33-36.

4. Кубишкін А.В., Харченко В.З., Семенец П.Ф. та ін. Методи визначення активності неспецифічних протеїназ і їх інгібіторів у сироватці крові і біологічних рідинах. (Методичні рекомендації). Київ, 2010.

5. Королюк М. А. , Иванова Л. И. , Майорова И.Б. и др. Метод определения активности каталазы // Лабораторное дело. – 1988. - № 1. – С. 16-19.

6. Миронов Л.Л. Рабдомиолиз// Медицина неотложных состояний. – 2006. - №6. – С7-16.

7. Попов Т., Нейковская Л. Метод определения пероксидазной активности крови// Гигиена и санитария. – 1971. - №10. – С. 89-91.

8. Фомочкина И.И. Патогенетическая коррекция метаболических нарушений при реперфузионных расстройствах в эксперименте// Таврический медико-биологический вестник. – 2010. – т.13. -№3(51). –С.206-211.

9. Харченко В.З., Кубышкин А.В., Фомочкина И.И. и др. Молекулярные механизмы развития экстремальных состояний и их коррекция. Симферополь, 2001.

10. Храмых Т.П., Долгих В.Т. К вопросу о эндотоксемии при геморрагической гипотензии// Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2009. - №1. – С.28-30.

11. Makam P. BTK Stenting in Critical Limb Ischemia/ Endovascular Today. – September, 2010. -P.69-72.