

Біохемілюмінесцентний аналіз стану прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу при краш-синдромі та фармакокорекції корвітином

І.І.Гаврилов

ДЗ «Луганський державний медичний університет», кафедра фармакології
(завідувач — професор В.Д.Лук'янчук)
Луганськ, Україна

Стаття присвячена вивченню впливу корвітину на кінетику вільно-радикальних реакцій у щурів із синдромом тривалого розчавлювання за допомогою методу біохемілюмінесценції. Доведено, що корвітин володіє високою антирадикальною активністю, яка реалізується «обривом» ланцюгових реакцій у сироватці крові щурів, на що переконливо вказують зміни кінетики всіх параметрів надслабкого світіння в біосубстраті, що досліджувався. На нашу думку, саме антирадикальні властивості даного препарату можуть зіграти ключову роль у реалізації детоксикаційної активності корвітину при краш-синдромі.

Ключові слова: ендотоксикоз, синдром тривалого розчавлювання, корвітин, лікування.

Вступ

Всезростаючої актуальності у сучасному суспільстві, де далеко не завжди можна дійти консенсусу в питаннях адекватності оцінки прогресу та його наслідків (механічні травми на виробництві, екологічні катастрофи тощо), набуває краш-синдром, або синдром тривалого розчавлювання (СТР), який постійно привертає увагу різних спеціалістів-медиків унаслідок тяжкості пошкоджень та відсутності надійних методів лікування потерпілих [7]. Адже відомо, що сучасні підходи до лікування краш-синдрому, на жаль, далеко не завжди нівелюють розвиток найбільш загрозливих проявів даного екстремального стану — гострої печінкової та ниркової недостатності, що й підтверджується дуже високими показниками летальності, яка, за даними різних авторів, становить 30-70% [6].

У цьому зв'язку пошук, розробка та вивчення нових високоефективних і безпечних засобів детоксикації при СТР, які б впливали одночасно на декілька ланок патогенезу даного екстремального стану, є одним із пріоритетних напрямів сучасної фармакології.

Активні форми кисню, які надмірно утворюються при СТР, є наслідком розвитку синдрому ендогенної інтоксикації, відрізняються

мембранотоксичністю та слугують тригерними механізмами ліпідперекислення. Тож інтенсивність перебігу реакцій вільно-радикального окислення фосфоліпідів клітинних та субклітинних біомембран об'єктивно відображає стан про- та антиоксидантних процесів в організмі за умов ендотоксикозу посттравматичного генезу [1].

З огляду на багатовекторність патогенезу СТР пильну увагу фармакологів останнім часом привертають препарати з політропними фармакодинамічними ефектами, які були б здатні одночасно коригувати декілька патогенетичних ланок ендогенної інтоксикації та виявляти виразну детоксикуючу дію. До таких ліків у повній мірі відносяться біофлавоноїди, а саме кверцетинвмісний препарат корвітин [8], який є одним з найбільш безпечних та ефективних сучасних вітчизняних перспективних фармакотерапевтичних засобів для лікування ендотоксемії [4].

Метою дослідження була біохемілюмінесцентна (БХЛ) оцінка впливу корвітину на кінетику вільно-радикальних реакцій у щурів із синдромом тривалого розчавлювання.

Матеріали та методи дослідження

Досліди проведені на 80 статевозрілих білих безпородних щурах обох статей масою 180-230 г, згідно з методичними рекомендаціями

ДП «Державний експертний центр» МОЗ України [5]. Щури були поділені на чотири групи: інтактну (8 тварин), контрольну (СТР), дослідну (СТР+корвітин) та референтну групи (СТР+тіотриазолін) (по 24 тварини в кожній). Експериментальною моделлю слугував патологічний процес, що розвивався у тварин унаслідок розчавлювання м'яких тканин задніх кінцівок протягом 5 год. у спеціальному пристрої з манометричним контролем тиску (15 кг/см²), сконструйованому на кафедрі фармакології ДЗ «Луганський державний медичний університет» [2]. Тваринам дослідної групи внутрішньоочеревинно вводили 2% водний розчин корвітину в дозі 200 мг/кг безпосередньо перед декомпресією та в цій же дозі через 8 год. у посткомпресійному періоді. Тварини контрольної групи в такому ж режимі отримували еквівалентний об'єм 0,9% розчину натрію хлориду. В якості препарату порівняння обрано тіотриазолін (АТ «Галичфарм», Україна), який щурам вводили в раніше встановленому в лабораторії кафедри фармакології ДЗ «Луганський державний медичний університет» режимі дозування — 117,4 мг/кг за 30 хв. до декомпресії та через 6 год. після неї [2].

Інтенсивність надслабкого світіння вивчали в сироватці крові в динаміці — через 3, 9 і 24 год. після декомпресії. У роботі використовували удосконалений співробітниками кафедри фармакології метод визначення в тканинах надслабкого світіння, індукованого 3% розчином перекису водню [1].

БХЛ-аналіз проводили за допомогою хемілюмінограм сироватки крові, які реєстрували протягом 5 хв. за допомогою хемілюмінометра «Emillite-1105» спільного австро-німецько-російського виробництва у наступному режимі: спектральний діапазон 350-390 нм, діапазон вимірів — 10³-10¹⁰ фотон/с. Біосубстрат, що досліджували, попередньо інкубували (15 хв. при 37°C). Фонові значення і спонтанний рівень БХЛ записували протягом 1 хв.

Кінетику надслабкого світіння оцінювали за наступними показниками: амплітуда швидкого спалаху (I₁), амплітуда повільного спалаху (I₂), час індукції повільного спалаху (Ф), амплітуда кінцевого значення БХЛ (I_к), а також загальна світлосума реакції (S). Розрахунок досліджуваних параметрів проводили за допомогою комп'ютерної програми, спеціально розробленої на кафедрі фармакології ДЗ «Луганський державний медичний університет».

Статистичну обробку отриманих даних проводили з використанням критерію t Стьюдента за допомогою програми «Statgraphics» [3].

Результати дослідження та їх обговорення

Отримані в експерименті результати, що відображають модифікацію параметрів БХЛ в сироватці крові за умов ендogenous інтоксикації та при її лікуванні корвітином, наведені на рис. 1 і 2 та в табл. 1.

За світлосумою надслабкого світіння (площа під кривою хемілюмінесценції) можна оцінити число бічних ланцюгів розгалуження, тобто скільки переокисних радикалів, що утворилися, припадає на один іон двовалентного заліза, або іншими словами — величина S характеризує здатність фосфоліпідів піддаватися вільнорадикальному окисленню. Як видно з рис. 1, за умов форми посттравматичного ендотоксикозу, що моделюється, кількість вільних радикалів, а отже й світлосума БХЛ-реакцій значно зростає в усі терміни дослідження. При цьому на ранніх строках дослідження (3 та 9 год.) показник, що аналізується, на 26% вище за такий, що реєструється в інтактних тварин із тенденцією до зниження. Проте і на 24-годинній позначці різниця між цими групами сягає 18%.

Інша картина спостерігається в сироватці щурів дослідної серії, тобто при застосуванні корвітину. Так, загальна світлосума реакції в сироватці дослідних тварин у середньому на 35% нижче за аналогічний показник, що є в контрольній групі. Це переконливо свідчить про підвищення стійкості фосфоліпідів до вільнорадикального окислення під впливом корвітину. Більш того, значення S у дослідній групі вірогідно нижчі, ніж у референтній групі, тобто у тварин, які з лікувально-профілактичною метою отримували тіотриазолін (P₃<0,001-P₃<0,01).

Інтенсивність генерації вільних радикалів, яка оцінювалася за величиною амплітуди швидкого спалаху надслабкого світіння (табл. 1), у сироватці крові контрольних щурів у середньому в 2,3 разу вище, ніж в інтактній групі, з максимальною різницею на 24-й годині, коли цей параметр БХЛ в контролі в 2,7 разу вище за аналогічний у «здорових» щурів.

Із застосуванням корвітину крива надслабкого світіння в ранньому посткомпресійному періоді СТР зазнає істотних геометричних змін. Так, величини першого піку БХЛ в дослідній серії вірогідно (P<0,001) зменшуються в порівнянні зі значеннями I₁, зафіксованими у контрольних тварин в 1,9; 1,5 та 2,4 разу від-

ОРИГІНАЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ



Рис. 1. Вплив корвітину в порівнянні з референтним препаратом на динаміку світлосуми надслабкого світіння в сироватці крові щурів за умов СТР ($n=8$).

Примітки: * — $P<0,05$ вірогідно в порівнянні з інтактною серією; ** — $P<0,05$ вірогідно в порівнянні з контрольною групою; *** — $P<0,05$ вірогідно в порівнянні з референтною групою.

повідно на 3, 9 та 24 год., не відрізняючись при цьому ($P>0,05$) від значень I_1 інтактної групи на всіх термінах дослідження. Це вказує на виражену здатність потенційного засобу фармакотерапії СТР — корвітину — ефективно пригнічувати генерацію ланцюгових вільно-радикальних реакцій за умов екстремального стану, що вивчається. Важливим є той факт, що величина амплітуди повільного спалаху у тварин дослідної групи під впливом корвітину вірогідно нижче ($P<0,001$) на 3-й год. дослідження аналогічного показника у референтній серії, не маючи проте вірогідних відмінностей ($P>0,05$) від значень групи порівняння в більш пізні терміни (9 та 24 год.).

Аналізуючи зміни амплітуди повільного спалаху світіння в сироватці крові за умов СТР (контроль), слід зазначити, що цей параметр БХЛ стабільно в часі перевищує аналогічний показник у інтактних щурів упродовж усього спостереження і навіть через 24 год. у декомпресійному періоді в сироватці контрольних щурів величина I_2 на 39% вище ($P<0,01$), ніж у щурів інтактної групи.

Лікувально-профілактичне ж введення корвітину за умов патологічного стану, що моделюється, призводить до вірогідного ($P<0,001$) зниження показника I_2 в біосубстраті в крові порівняно з контрольною групою в ранні терміни досліду. Крім того, амплітуда повільного спалаху протягом усього експерименту достовірно не відрізняється ($P>0,05$) від аналогічного параметра в інтактних тварин.

Встановлений характер змін амплітуди повільного спалаху БХЛ при застосуванні корвітину досить переконливо свідчить про здатність цього препарату попереджати надмірну ініціацію ланцюгових реакцій, що протікають

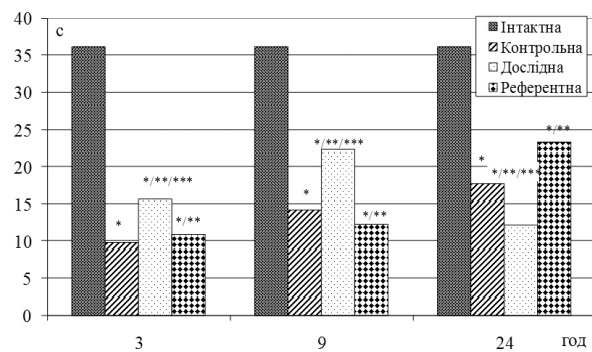


Рис. 2. Вплив корвітину на час індукції повільного спалаху надслабкого світіння в сироватці крові щурів за умов СТР ($n=8$).

Примітки: * — $P<0,05$ вірогідно в порівнянні з інтактною серією; ** — $P<0,05$ вірогідно в порівнянні з контрольною групою; *** — $P<0,05$ вірогідно в порівнянні з референтною групою.

за участю металів змінної валентності, зокрема Fe^{2+} , тобто сповільнювати швидкість утилізації цих іонів у системі в період максимальної продукції вільних радикалів за умов СТР.

Не менш значимим у плані інформативності показником кінетики вільно-радикальних реакцій є кінцеве значення інтенсивності світіння, яке відображає зміну динамічної рівноваги між процесами генерації та «гасіння» люмінесцентних продуктів перекисного окислення ліпідів. Встановлено, що величина цього показника у групі тварин із СТР, але без лікування, втричі перевищує таку, що визначається в групі інтактних тварин (табл. 1). Це свідчить про порушення динамічної рівноваги між процесами синтезу та «гасіння» продуктів вільно-радикальних реакцій, які супроводжуються надслабким світінням.

У групі ж тварин, яким з лікувально-профілактичною метою за умов патологічного стану, що моделюється, вводили корвітин, зареєстровано зниження I_k у 4,2 разу, що свідчить про наявність у даного препарату вельми вираженої протекторної дії щодо гіперініціації вільно-радикальних реакцій у сироватці крові щурів. Вельми важливо наголосити, що корвітин значно (у 2,8 разу) перевищує за антирадикальною активністю тіотриазолін.

При аналізі динаміки змін показника, який характеризує час індукції повільного спалаху надслабкого світіння (τ), очевидним є те, що в контрольній групі тварин в усі терміни дослідження відзначається вірогідне ($P<0,001$) зменшення значень цього параметра БХЛ щодо інтактних щурів із максимальною різницею в 3,7 разу на 3-й год. експерименту (рис. 2).

Таблиця 1

Вплив корвітину на показники біохемілюмінесценції в сироватці крові щурів за умов синдрому тривалого розчавлювання (n=8)

Група тварин	Термін дослідження, год.		
	3	9	24
<i>Амплітуда швидкого спалаху (I_1), імн/с</i>			
Інтактна		359,00±34,03	
Контрольна (СТР)	823,17±21,03 $P_1 < 0,001$	716,00±51,76 $P_1 < 0,001$	976,00±30,07 $P_1 < 0,001$
Дослідна (СТР+корвітин)	439,50±31,13 $P_1 > 0,05$ $P_2 < 0,001$ $P_3 < 0,001$	483,83±41,09 $P_1 > 0,05$ $P_2 < 0,001$ $P_3 > 0,05$	406,50±7,08 $P_1 > 0,05$ $P_2 < 0,001$ $P_3 > 0,05$
Референтна (СТР+тіотриазолін)	755,80±21,40 $P_1 < 0,001$ $P_2 > 0,05$	532,00±53,15 $P_1 < 0,05$ $P_2 < 0,05$	407,00±16,00 $P_1 > 0,05$ $P_2 < 0,001$
<i>Амплітуда повільного спалаху (I_2), імн/с</i>			
Інтактна		369,00±25,72	
Контрольна (СТР)	942,60±30,46 $P_1 < 0,001$	858,00±70,19 $P_1 < 0,001$	513,00±26,61 $P_1 < 0,01$
Дослідна (СТР+корвітин)	457,50±39,17 $P_1 > 0,05$ $P_2 < 0,001$ $P_3 < 0,001$	437,17±37,60 $P_1 > 0,05$ $P_2 < 0,001$ $P_3 < 0,05$	443,40±43,28 $P_1 > 0,05$ $P_2 > 0,05$ $P_3 > 0,05$
Референтна (СТР+тіотриазолін)	852,20±36,20 $P_1 < 0,001$ $P_2 > 0,05$	665,50±60,86 $P_1 < 0,01$ $P_2 > 0,05$	514,00±45,90 $P_1 > 0,05$ $P_2 > 0,05$
<i>Кінцеве значення інтенсивності світіння (I_K), імн/с</i>			
Інтактна		20,18±1,70	
Контрольна (СТР)	64,00±2,73 $P_1 < 0,001$	56,50±4,84 $P_1 < 0,01$	61,60±8,64 $P_1 < 0,001$
Дослідна (СТР+корвітин)	9,67±0,76 $P_1 < 0,001$ $P_2 < 0,001$ $P_3 < 0,001$	11,33±0,42 $P_1 < 0,01$ $P_2 < 0,001$ $P_3 < 0,001$	22,50±0,96 $P_1 > 0,05$ $P_2 < 0,001$ $P_3 > 0,05$
Референтна (СТР+тіотриазолін)	42,00±3,39 $P_1 < 0,001$ $P_2 < 0,001$	51,83±6,84 $P_1 > 0,05$ $P_2 < 0,001$	25,67±2,40 $P_1 > 0,05$ $P_2 < 0,001$

Примітки: P_1 — вірогідно в порівнянні з інтактними тваринами; P_2 — вірогідно в порівнянні з контролем; P_3 — вірогідно в порівнянні з референтними тваринами.

Інша картина динаміки τ спостерігається в групі тварин, яким попередньо та через 8 год. після декомпресії вводили корвітин. Так, у дослідній групі в усі терміни дослідження реєструється вірогідне ($P < 0,001-0,01$) порівняно з контролем збільшення тривалості латентного періоду генерації повільного спалаху в середньому на 20%. Це вказує на спроможність корвітину стимулювати поповнення в організмі ендогенних антиоксидантів або попереджати їх інактивацію, так чи інакше регулюючи співвідношення в системі про- та антиоксидантів.

Висновок

Таким чином, підводячи підсумок біохемілюмінесцентного аналізу впливу корвітину на стан вільно-радикальних реакцій за умов краш-синдрому, слід вважати доведеною його високу антирадикальну активність, яка реалізується «обривом» ланцюгових реакцій у сироватці крові щурів, на що переконливо вказують зміни кінетики всіх параметрів надслабкого світіння в біосубстраті, що досліджувався. На нашу думку, саме антирадикальні властивості даного препарату можуть зіграти ключову роль у реалізації детоксуючої активності корвітину при краш-синдромі.

Література

1. Биохемиллюминесцентный анализ фармакодинамики лекарственных средств: Метод. рек. / В.Д.Лукьянчук, Д.С.Кравец, Н.В.Витохина [и др.]. — Киев, 2010. — 42 с.
2. Болгов Д.М. Лікувально-профілактична ефективність тіотриазоліну при синдромі тривалого розчавлювання: Автореф. ... дис. на здобуття наук. ступеня канд.мед.наук: спец. 14.03.05 «Фармакологія» / Д.М.Болгов. — Інститут фармакології та токсикології АМН України. — Київ, 2003. — 20 с.
3. Гланц С. Медико-биологическая статистика / С.Гланц. — Пер с англ. — М.: Практика, 1999. — 459 с.
4. Деркачевська В.В. Стан компонентів антиоксидантної системи захисту організму у щурів з каловим перитонітом на тлі фармакологічної корекції корвітином / В.Д.Лук'янчук, В.В.Деркачевська // Журнал екстремальної медицини ім. Г.О.Можаєва. — 2009. — №1. — С. 55-61.
5. Доклинические исследования лекарственных средств: Метод. рек. / Под ред. член-кор. АМН Украины А.В.Стефанова. — К., 2002. — 567 с.
6. Лук'янчук В.Д. Синдром тривалого роздавлювання: сучасні уявлення про механізми формування (огляд літератури і власних досліджень) / В.Д.Лук'янчук, Л.В.Савченкова, Д.М.Болгов // Журнал АМН України. — 2002. — Т.8, №3. — С. 441-455.
7. Скринінг і порівняльна оцінка ефективності засобів детоксикації серед координаційних сполук германію з біолігандами при синдромі тривалого розчавлювання / В.Д.Лук'янчук, І.Й.Сейфулліна, Н.В.Рисухіна [и др.] // Одеський медичний журнал. — 2007. — №1. — С. 15-19.
8. Free radicals scavenging efficiency of few naturally occurring flavonoids: a comparative study / M. Rajendran, P. Manisankar, R. Gandhidasan, R. Murugesan // J. Agric. Food Chem. — 2004. — Vol. 52. — №24. — P. 7389-7394.

И.И.Гаврилов. Биохемиллюминесцентный анализ состояния прооксидантно-антиоксидантного гомеостаза при краш-синдроме и фармакокоррекции корвитиним. Луганск, Украина.

Ключевые слова: эндотоксикоз, синдромом длительного раздавливания, корвитин, лечение.

Статья посвящена изучению влияния корвитина на кинетику свободно-радикальных реакций у крыс с синдромом длительного раздавливания с помощью метода биохемиллюминесценции. Доказано, что корвитин обладает высокой антирадикальной активностью, которая реализуется «обрывом» цепных реакций в сыворотке крови крыс, на что убедительно указывают изменения кинетики всех параметров сверхслабого свечения в исследуемом биосубстрате. По нашему мнению, именно антирадикальные свойства данного препарата могут сыграть ключевую роль в реализации детоксикационной активности корвитина при краш-синдроме.

I.I.Gavrilov. Biochemiluminescence analysis of the prooxidant-antioxidant homeostasis in crash-syndrome and pharmacocorrection by corvitinum. Lugansk, Ukraine.

Key words: endotoxycosis, crash-syndrome, corvitinum, treatment.

The article is devoted to the study of corvitinum influence on kinetics of free-radical reactions in rats with the crush-syndrome using biochemiluminescence method. It is proved that corvitinum possesses high antiradical activity, which is manifested in «breakage» of chain reactions in the blood serum of rats. It is indicated in the changes of kinetics of all parameters of super-weak luminescence in this biosubstrate. Regarding this fact, we think that antiradical properties of the medicine supposed to play a key role in realization of detoxicative activity of corvitinum in crash-syndrome.

Надійшла до редакції 29.11.2010 р.