

decrease of cardiohemodynamic parameters in SHR was shown: stroke volume by 2 times, ejection fraction by 1.8 times, stroke work by 5 times, end-diastolic volume on 17%, end-systolic volume by 1.3 times. Also increase of arterial rigidity by 1.4 times was observed. Other morphological changes were revealed: fibrosis compiled by 18.1% in the left ventricle area in comparing with 1.8% in Wistar rats but on the other hand adaptive angiogenesis, providing myocardial blood supply, was detected. Thus presenile SHR show first stages of pathological heart remodeling with fibrosis and pump dysfunction.

Key words: spontaneously hypertensive rats, aging, heart remodeling, cardiohemodynamics, fibrosis.

Стаття надійшла до редакції 22.04.2014 р.

Лапікова-Бригінська Тетяна Юріївна - аспірант відділу загальної та молекулярної патофізіології Інституту фізіології імені О.О.Богомольця НАН України; +38 093 642-50-43; toffi_tani@bigmir.net

Гончаров Сергій Вікторович - м. н. с. відділу загальної та молекулярної патофізіології Інституту фізіології імені О.О.Богомольця НАН України; +38 044 256-24-81; sergei_goncharov@bigmir.net

Портніченко Георгій Володимирович - інженер відділу загальної та молекулярної патофізіології Інституту фізіології імені О.О.Богомольця НАН України; +38 044 256-24-81; krissaegrim1@gmail.com

Тумановська Леся Володимирівна - н. с. відділу загальної та молекулярної патофізіології Інституту фізіології імені О.О.Богомольця НАН України; +38 044 256-24-81

Портніченко Алла Георгіївна - д. мед. н., ст. н. с. відділу загальної та молекулярної патофізіології Інституту фізіології імені О.О.Богомольця НАН України; +38 044 256-22-61; port@biph.kiev.ua

Досенко Віктор Євгенович - д. мед. н. професор, пров. н. с. відділу загальної та молекулярної патофізіології Інституту фізіології імені О.О.Богомольця НАН України; +38 044 256-24-81; dosenko@biph.kiev.ua

Мойбенко Олексій Олексійович - академік НАН України, д. мед. н., професор, завідувачий відділом загальної та молекулярної патофізіології Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України; +38 044 253-61-51

© Мальченко О.А., Анисимова Л.В., Кубышкин А.В.

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

Мальченко О.А., Анисимова Л.В., Кубышкин А.В.

ГУ "Крымский государственный медицинский университет имени С.И.Георгиевского", кафедра патологической физиологии (бульв. Ленина 5/7, г.Симферополь, 295006, Крым)

ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ НЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ ПРОТЕИНАЗ И ИХ ИНГИБИТОРОВ В МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ РЕПЕРФУЗИОННОМ СИНДРОМЕ

Резюме. В результате проведенных экспериментальных исследований установлено, что развитие реперфузионного синдрома в мышечной ткани сопровождается активацией неспецифических протеиназ при снижении контроля их ингибиторов. Выраженность локального дисбаланса протеиназ и их ингибиторов мышечной ткани нарастает при трансформации ишемического повреждения в реперфузионное и зависит от сроков реперфузии.

Ключевые слова: реперфузионный синдром, мышечная ткань, протеолиз.

Введение

Реперфузионный синдром, сопровождающийся повреждением мышечной ткани, достаточно часто встречается при инфаркте миокарда, хирургии сердца и сосудов, трансплантации [Гринев, Гринев 2010; Гриценко и др., 2012], реплантации конечностей и ряде других состояний [Криворучко и др., 2012]. Ключевым патогенетическим звеном при развитии реперфузионного синдрома следует считать изменения, происходящие в ишемизированных тканях с возрастанием тяжести последствий ишемии после восстановления кровотока [Новикова и др., 2011]. Последующее развитие системных осложнений, включающих формирование тяжелой полиорганной недостаточности, нередко резистентной к существующим методам лечения, приводит к увеличению летальности [Гринев, Гринев, 2010]. Особенно ярко реперфузионный синдром проявляется в тех случаях, когда ишемии-реперфузии подвергается мышечная ткань, что связано с высокой чувствительностью мышц к гипоксии [Бойко и др., 2011].

В настоящее время выделяют два уровня осложнений, следующих за восстановлением кровотока в ранее ишемизированных органах и тканях: местный, в результате которого усугубляется местное повреждение, и системный, проявляющийся во вторичной недостаточности органов и тканей, удаленных от ишемизированных. Следует отметить, что если изучению системного уровня осложнений уделяется много внимания, то местные изменения, от которых в первую очередь зависит характер и степень выраженности осложнений, изучаются гораздо менее интенсивно. Немногочисленные исследования, посвященные изучению местной реакции тканей, вовлеченных в реперфузионное повреждение, посвящены поиску вариантов их протекции [Гринев, Гринев 2010; Федосов, 2012].

Одним из наиболее существенных факторов тканевого и клеточного повреждения считаются неспецифические протеиназы. Избыточная активация протеиназ является важным патогенетическим звеном в

развитии ряда деструктивных и воспалительных реакций организма [Смолиенко и др., 2013; Анисимова, 2014]. А основная функция ингибиторов протеолиза заключается в блокировании нарастающей активности протеаз, непосредственно участвующих в развитии тканевой деструкции. Состояние неспецифических протеиназ и их ингибиторов может оказывать существенное влияние на повреждение мышечной ткани при реперфузионном синдроме, а следовательно и на развитие системных осложнений.

Целью проведенной работы явилось установить характер изменений неспецифических протеиназ и их ингибиторов в мышечной ткани ранее ишемизированной конечности крыс и их роль в патогенезе развивающегося реперфузионного синдрома.

Материалы и методы

Экспериментальные исследования были 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 служил супернатант гомогената скелетных мышц крыс, который получали следующим образом. Кусочки мышцы, полученные из мышечной ткани ниже места наложения жгута промывали в охлажденном физиологическом растворе, после чего обсушивали фильтровальной бумагой, очищали от жира и соединительной ткани и тщательно измельчали ножницами в кашицу. Навеску этой массы (1-2 г) помещали в ступку с кварцевым песком и тщательно растирали до получения гомогенной массы. После этого добавляли 10 объемов физиологического раствора (10 мл на 1 г ткани) и перемешивали стеклянной палочкой. Полученный экстракт мышц фильтровали через четыре слоя влажной марли и центрифугировали в течении 15 мин при 1500g. Надосадочную жидкость (супернатант) использовали для биохимических исследований.

Определение активности компонентов протеиназ-ингибиторной системы проводили с использованием энзиматических методов [Кубишкін та ін., 2010] на спектрофотометре "Biomat 5" (Великобритания). Трипсиноподобную активность (ТПА) определяли по скорости отщепления N-бензоил-L-аргинина от синтетического субстрата этилового эфира N- α -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 определяли активность кислотостабильных ингибиторов (КСИ) после предварительной подготовки сыворотки путём прогрева 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 принимали разность средних значений при $p < 0,05$.

Результаты. Обсуждение

Проведенные нами исследования показали, что при моделировании синдрома ишемии-реперфузии происходили изменения компонентов протеиназ-ингибиторной системы, проявляющиеся активацией протеиназ в гомогенатах скелетных мышц ранее ишемизированных конечностей. Так, после 6 часов ишемии в тканях не происходило активации протеиназ, а отмечалось даже снижение их активности на 7% относительно группы контроля (табл. 1). Однако уже через 6 часов после реперфузии ЭПА достоверно увеличилась относительно контроля на 23%, а относительно группы перенесшей только 6-часовую ишемию на 48%. В группе животных, перенесших 12 часов реперфузии, ЭПА гомогенатов скелетных мышц стала статистически еще более достоверно выше, превысив уровень контроля на 58,5%, а показатель группы с 6-часовой ишемией на 70%. В дальнейшем показатели эластазоподобной активности оставались достоверно более высокими. В экспериментальной группе, перенесшей 24 часа реперфузии, показатели ЭПА гомогенатов скелетных мышц оставались на уровне группы с 12-ти часовой реперфузией. В группе экспериментальных животных, перенесших 48 часов реперфузии, ЭПА увеличилась относительно контроля на 68%, а по сравнению группой, перенесшей только 6-ти часовую ишемию, - на 80%.

Аналогичные изменения выявлены при исследовании ТПА в гомогенатах скелетных мышц конечностей экспериментальных животных. Так, после 6 часов ишемии ТПА относительно контроля снизилась на 8%, однако эти изменения были статистически недостоверны. У экспериментальных животных через 6 часов после реперфузии ТПА в гомогенатах скелетных мышц конечностей увеличилась на 7% по сравнению с контрольной группой животных, а по сравнению с группой, перенесшей только 6-часовую ишемию - на 71%. В группе животных, перенесших 12-часовую реперфузию ТПА гомогенатов скелетных мышц конечностей увеличилась по сравнению с контролем на 62,6%, по сравнению с группой, перенесшей только 6-часовую ишемию - на 77%. У экспериментальных животных,

Таблиця 1. Активність протеолітичних ферментів та їх інгібіторів в гомогенатах скелетних м'язів кінцівок в умовах моделювання ішемії-реперфузії ($M \pm m$).

Група	ЭПА	ТПА	АТА	КСИ
	(мкМ/мл-мин)		(ЕД/мл)	
Контрольна група (n=11)	34,20±1,42	7,41±0,67	0,07±0,023	1,51±0,19
6 годин ішемії (n=10)	31,90±1,1	6,80±0,58	0,09±0,006	0,21±0,027***
6 годин після реперфузії (n=9)	47,20±4,3 ***,###	11,62±1,05***,###	0,19±0,012***,###	0,52±0,034 ***,###
12 годин після реперфузії (n=10)	54,20±3,91***,###	12,04±1,02***,###	0,17±0,19 ***,###	0,51±0,074***,###
24 годин після реперфузії (n=8)	54,08±3,91***,###	11,49±1,29**,*###	0,20±0,02***,###	0,46±0,022 ***,###
48 годин після реперфузії (n=11)	57,38±3,03***,###	12,00±0,57***,###	0,17±0,017***,###	0,19±0,02 ***,###

Примечание: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, по сравнению с группой контроля; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ по сравнению с группой перенесшей 6-ти часовую ишемию.

перенесших 24 часа реперфузії, ТПА гомогенатів скелетних м'язів кінцівок статистично достовірно збільшилась на 55% відносно контролю, а відносно групи, перенесшої тільки 6-ти годин ішемії - на 67%. ТПА гомогенатів скелетних м'язів кінцівок тварин, перенесших 48 годин реперфузії збільшилась на 62,% відносно контролю, а відносно групи, перенесшої тільки 6-годин ішемію - на 76%.

Дослідження інгібіторної активності гомогенатів скелетних м'язів кінцівок мишей з моделлю синдрому ішемії-реперфузії показали, що у експериментальних тварин спостерігалося підвищення рівня АТА по відношенню до контрольної групи та до групи перенесшої тільки 6-годин ішемію. В експериментальній групі, яку склали тварини, перенесші тільки 6 годин після ішемії, АТА в гомогенатах скелетних м'язів кінцівок збільшилась на 20,3% відносно контролю, однак ці зміни були статистично недостовірні. У тварин перенесших 6-ти годин реперфузії АТА гомогенатів скелетних м'язів кінцівок достовірно збільшилась відносно контролю на 161,42%, а відносно групи, перенесшої тільки 6-годин ішемію - на 117%. В групі експериментальних тварин через 12 годин реперфузії АТА гомогенатів скелетних м'язів кінцівок зросла, по відношенню до контролю, в 2,3 рази, по відношенню до групи, перенесшої тільки 6-годин ішемію - на 94%. АТА гомогенатів скелетних м'язів кінцівок у групи з 24-х годин реперфузії збільшилась - в 2,8 рази відносно тварин з групи контролю, відносно групи, перенесшої тільки 6-годин ішемію - на 133%. А у тварин з групи, перенесших 48-ми годин реперфузії АТА збільшилась відносно контролю в 2,4 рази, а відносно групи, перенесшої тільки 6-ти годин ішемію, - майже в 2 рази.

Активність КСИ в гомогенатах скелетних м'язів кінцівок експериментальних тварин з моделлю синдрому ішемії-реперфузії, знизилась відносно тварин, що склали контрольну групу, але перевищала показники групи, перенесшої тільки 6-ти

годин ішемію. Так у тварин через 6 годин після ішемії активність КСИ знизилась відносно контролю на 86%. В групі експериментальних тварин після 6-годин реперфузії активність КСИ гомогенатів скелетних м'язів кінцівок була на 66% нижче, ніж в групі контролю, але на 146% вище по відношенню до групи, перенесшої тільки 6-годин ішемію. Практично аналогічні показники активності КСИ гомогенатів скелетних м'язів кінцівок спостерігались у експериментальних тварин з 12-ти годин реперфузії. У групи тварин перенесших 24-х годин реперфузії рівень активності КСИ відносно контролю знизився на 70%, і був на 119% вище відносно групи, перенесшої тільки 6-годин ішемію. В групі експериментальних тварин після 48 годин реперфузії активність КСИ гомогенатів скелетних м'язів кінцівок знизилась на 87% нижче, ніж у тварин контрольної групи та на 8%, ніж у групи, перенесшої тільки 6-годин ішемію.

Проведені нами дослідження стану протеїназ-інгібіторної системи в гомогенатах скелетних м'язів кінцівок у мишей з моделлю синдрому ішемії-реперфузії показали, що максимальне збільшення ЭПА відбувалося у групи тварин з 48-ми годин реперфузії, а ТПА максимально збільшувалась вже після 12-ти годин реперфузії як по відношенню до групи контролю, так і відносно групи, перенесшої тільки 6-годин ішемію. Найбільше збільшення антитриптичної активності гомогенатів скелетних м'язів кінцівок спостерігалося у тварин після 24-х годин реперфузії. В той же час рівень КСИ знизився відносно контролю, досягаючи максимального дефіциту при 48-годин реперфузії.

Як видно з представлених даних, розвиток експериментального синдрому ішемії-реперфузії супроводжується зміною активності неспецифічних протеїназ та їх інгібіторів в м'язовій тканині. Реперфузійні порушення характеризуються накопиченням трипсино- та еластазоподібних протеїназ, які мають високий деструктивний потенціал та здатні спричинити подальшу деградацію та розру-

шению мышечной ткани. Причем, при активации протеиназ происходит снижение локального антипротеиназного потенциала, в первую очередь за счет уменьшения синтеза местносинтезируемых кислотостабильных ингибиторов протеиназ. Выраженность локального дисбаланса протеиназ и их ингибиторов мышечной ткани нарастает при трансформации ишемического повреждения в реперфузионное и зависит от сроков реперфузии.

Выводы и перспективы дальнейших разработок

1. Экспериментальная шестичасовая ишемия нижних конечностей крыс приводит к угнетению синтеза

и секреции кислотостабильных ингибиторов протеиназ, 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.

Локальный дисбаланс с нарастанием протеиназной активности в мышечной ткани может способствовать усилению деструкции и свидетельствует о целесообразности целенаправленной коррекции выявленных нарушений, что требует дальнейшего изучения.

Список литературы

- Анисимова Л.В. Неспецифические протеиназы как диагностический и прогностический маркер развития синдрома остро поврежденного легкого /Л.В. Анисимова //Укр. мед. альманах.- 2014.- №1.- С.129-131.
- Гриценко С.Н. Гемодинамика и кислородный режим при реперфузии печеночного трансплантата /С.Н.Гриценко, В.А.Собакар, В.В.Саленюк //Досягнення біол. та мед.- 2012.- №1(19).- С.38-42.
- 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.
- Методи визначення активності неспецифічних протеїназ і їх інгібіторів у сироватці крові і біологічних рідинах (методичні рекомендації) /А.В.Кубишкін, В.З.Харченко, П.Ф.Семінець [та ін.]- Київ, 2010.- 28с.
- 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.
- Патогенетическое значение протеолитических и цитокиновых механизмов при реперфузионном синдроме /М.И.Федосов, И.И.Фомочкина, А.В.Кубышкин [и др.] //Таврический медико-биол. вестник.- 2012.- №3.- С.354-357.
- Роль процессов протеолиза в развитии трофических язв при варикозной болезни /В.Н.Смолиенко, Л.В.Анисимова, О.А.Питуло [и др.] //Акт. пробл. транспортной медицины.- 2013.- №2.- С.57-60.
- Состояние монооксигеназной системы печени крыс при синдроме ишемии/реперфузии тонкой кишки /И.А.Криворучко, В.И.Жуков, Ю.В.Иванова [и др.] //Харківська хірургічна школа.- 2012.- №6.- С.36-39.
- Бойко В.В. Ультраструктура гладких миоцитов мышечного слоя кишечника экспериментальных животных с моделированной гипоксией /В.В.Бойко, В.Г.Грома, В.П.Невзоров //Експерим. і клін. медицина.- 2011.- №3.- С.22-25.

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

ЗМІНИ АКТИВНОСТІ НЕСПЕЦИФІЧНИХ ПРОТЕЇНАЗ ТА ЇХ ІНГІБІТОРІВ У М'ЯЗОВІЙ ТКАНИНІ ЩУРІВ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ РЕПЕРФУЗІЙНОМУ СИНДРОМУ

Резюме. В результаті проведених експериментальних досліджень встановлено, що розвиток реперфузійного синдрому у м'язовій тканині супроводжується активацією неспецифічних протеїназ при зниженні контролю з боку їх інгібіторів. Виразність локального дисбалансу протеїназ та їх інгібіторів м'язової тканини наростає при трансформації ішемічного ушкодження у реперфузійне і залежить від термінів реперфузії.

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

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

CHANGES ACTIVITY OF NONSPECIFIC PROTEINASES AND THEIR INHIBITORS IN RATS MUSCLE TISSUE WITH EXPERIMENTAL REPERFUSION SYNDROME

Summary. As the result of experimental studies has shown that the development of reperfusion syndrome is accompanied by the changes in the activity of nonspecific proteinases and their inhibitors in muscle tissue. The severity the local imbalance of proteases and their inhibitors, of muscle tissue increases in transformation of ischemic damage in to the reperfusion and depends on the time of reperfusion.

Key words: reperfusion syndrome, muscle tissue proteolysis.

Статья поступила в редакцию 23.04.2014 г.

Мальченко Ольга Анатоліївна - судинний лікар-хірург відділення судинної хірургії КРЗ "КТМО Університетська клініка"; +38 095 815-02-02; kamastra-mal@rambler.ru
 Анисимова Людмила Василівна - к. мед. н., доцент кафедри патологічної фізіології Кримського державного медичного університету; +38 050 961-22-35; anisanisl@mail.ru
 Кубишкін Анатолій Володимирович - д. мед. н., професор, завідувач кафедри патологічної фізіології Кримського державного медичного університету імені С.І.Георгієвського; +38 050 294-14-44; anatoly2802@gmail.com