УДК 615.355:615.384:616-001.32

ВЛИЯНИЕ ПЕРФТОРАНА НА АНТИОКСИДАНТНЫЕ ФЕРМЕНТЫ В КРОВИ КРЫС ПРИ СИНДРОМЕ ДЛИТЕЛЬНОГО СДАВЛИВАНИЯ

[1]Магомедов К.К., [2]Эмирбеков Э.З., [3]Бакуев М.М., [3]Шахбанов Р.К.

[1]НИИ экологической медицины при ГБОУ ВПО «Дагестанская государственная медицинская академия», Махачкала, e-mail: intel12i@yandex.ru;
[2]ФГАОУ ВПО «Южный федеральный университет», Ростов-на-Дону, e-mail: frgy@mail.ru;
[3]ГБОУ ВПО «Дагестанская государственная медицинская академия», Махачкала, e-mail: dgma@list.ru

В экспериментах на беспородных лабораторных крысах проведено моделирование синдрома длительного сдавливания (СДС) путем сдавления обеих конечностей металлическими тисками площадью 5 см^2 в течение 4 часов. Изучено влияние однократного, внутривенного введения перфторана на активность антиоксидантных ферментов крови: церулоплазмина (ЦП), супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы (КТ) в динамике развития процесса. Изменения активности ЦП, СОД и КТ в острой фазе СДС разнонаправлены: активность ЦП имеет тенденцию к росту в первом периоде СДС, тогда как СОД и КТ в тот же срок реагирует снижением активности. Применение перфторана при СДС стабилизирует ферменты АОС крови. В частности, установлено достоверное снижение активности ЦП в первом периоде СДС; в последующие дни эксперимента существенной коррекции активности фермента не наблюдается. Использование перфторана приводит к достоверному повышению активности СОД во все дни эксперимента по сравнению с результатами, полученными при СДС без коррекции; достоверный рост активности КТ наблюдается лишь в первые семь дней эксперимента.

Ключевые слова: перфторан, синдром длительного сдавливания (СДС), антиоксидантные системы (АОС)

INFLUENCE OF PERFTORAN ON ANTIOXIDANT ENZYMES IN THE BLOOD OF RATS DURING PROLONGED COMPRESSION SYNDROME

[1]Magomedov K.K., [2]Emirbekov E.Z., [3]Bakuev M.M., [3]Shakhbanov R.K.

[1]SRI of ecological medicine at Dagestan State Medical Academy, Makhachkala, e-mail: intel12i@yandex.ru;
[2]Southern Federal University, Rostov at the Don, e-mail: frgy@mail.ru;
[3]Dagestan State Medical Academy, Makhachkala, e-mail: dgma@list.ru

Modelling of crush-syndrome (CS) by squeezing both extremeties with metal vices of square 5 sm for 4 hours was conducted on breedless laboratory rats in experiments. The influence of a single, intravenous infusion of Perftoran on the activity of antioxidant enzymes blood – ceruloplasmin (CP), super oxide dismutase (SOD) and catalase (CT) in the dynamics of the process was studied. Changes in CPU activity, SOD and CT scan in the acute phase of SDS directions: CPU activity tends to raise in the first period while the CS (Crush Syndrome) SOD and CT in the same period of reduced activity responds. Application of Perftoran at CS (Crush Syndrome) stabilizes the enzymes EPA levels. In particular found a significant reduction in CPU activity and in the first period of SDS in the latter days of the experiment a significant correction of enzyme activity is not observed. Using Perftoran leads to a significant increase in SOD activity on all days of the experiment as was compared with the results obtained with SDS without correction; reliable growth CT activity is observed only in the first seven days of the experiment.

Keywords: perftoran, crush syndrome (CS), antioxidant system

Синдром длительного сдавливания (СДС) или травматический токсикоз – это патологическое состояние, развивающееся у пострадавших в результате длительного (4-5 ч. и более) раздавливания мягких тканей конечностей обломками разрушенных зданий, сооружений, грунтом при обвалах и т.д. Общая реакция организма после освобождения пострадавших из-под развалин и восстановления кровообращения в пораженной конечности было описано еще в 1918 г. как токсемический шок.

Несмотря на большое количество публикаций, посвященных изучению патогенеза, клинической картины и лечения СДС [2, 3], эти вопросы все еще далеки от окончательного решения.

Многие исследователи [5, 7] акцентируют внимание на то, что одним из путей повышение уровня газообмена при гипоксии является улучшения условий переноса кислорода от эритроцитов к тканям.

Исследования, проведенные рядом авторов [9], показали, что препарат перфторан, обладающий полифункциональными свойствами, может быть полезным в остром периоде травматического токсикоза. В частности, полученные ими данные о механизмах действия перфторана в биологических системах позволили отнести это соединение, кроме как кровозаменителя с газотранспортными свойствами, в группу средств, дающих и противоишемический эффект.

Работы, посвященные экспериментальному моделированию СДС с последующим изучением тонких механизмов его развития, с выяснением роли антиоксидантных систем организма, в частности,

в эритроцитах и плазме крови, на сегодняшний день немногочисленны. В частности, мало публикаций, посвященных выяснению механизмов сдвигов основных ферментных антиоксидантов: супероксиддисмутазы (СОД), церулоплазмина (ЦП) и каталазы (КТ) при этом патологическом состоянии, и практически отсутствуют сведения о попытках использования при этом препаратов-корректоров. В связи с этим целью настоящего исследования было изучение при экспериментальном СДС указанных антиоксидантов в эритроцитах и плазме крови в различные сроки посткомпрессионного периода и установление возможности коррекции выявленных сдвигов инфузией перфторана.

Материалы и методы исследования

В работе использовались беспородные белые крысы обоего пола массой 170–230 г, полученные из вивария Дагестанского государственного университета, в количестве 144. Животные содержались в стандартных условиях вивария; опыты проводились натощак.

Для выполнения поставленных задач исследования эксперименты распределялись на 4 группы: I – интактная (12); II – модель посткомпрессионного периода СДС без коррекции (43); III – модель посткомпрессионного периода СДС + коррекция физиологическим раствором (41); IV – модель СДС + коррекция инфузией перфторана (44).

СДС у крыс воспроизводили компрессией мягких тканей бедра под этаминал-натриевым наркозом (40 мг/кг) специальными металлическими тисками в течение 4 часов [1]. Площадь сдавливаемой поверхности составляла около 5 см². Силу и время сдавления подбирали в эксперименте таким образом, что в результате возникала клиническая картина СДС средней степени тяжести. Это позволяло унифицировать условия проведения исследований и проследить процессы как в момент повреждения, так и в период восстановления.

В III и IV группах исследуемых животных с целью коррекции раннего посткомпрессионного периода СДС проводили внутривенную инфузию физиологического раствора и перфторана в хвостовую вену крысы однократно из расчета 2 мл/кг массы животного.

Выбранные сроки исследования соответствовали общепринятым периодам развития СДС [13]: от 1 до 3 суток – ранний период, от 3 до 7 суток – промежуточный период и от 7 до 21 суток – поздний (восстановительный период).

Активность СОД определяли методом R. Fried (1975) [14]. Оксидазную активность церулоплазмина (ЦП) в плазме крови выявляли модифицированным методом Ревина [6]. Активность каталазы, которая, как известно, работает в паре с СОД и расщепляет продукт дисмутации супероксида – пероксид водорода, в гемолизатах эритроцитов определяли методом М.А. Королюк и др. (1988) [8].

Для расчета активности СОД и каталазы в эритроцитах определяли содержание гемоглобина гемиглобинцианидным методом. Как известно, гемоглобин в присутствии окислителяи цианид ионов образует в водном растворе гемиглобинцианид, окраска которого пропорциональна содержанию гемоглобина в пробе [Меньшиков В.В., 1987] [11].

Результаты исследований и их обсуждение

Показатели активности ЦП в плазме крови, а также СОД и КТ в эритроцитах приведены в табл. 1.

Результаты 2-й серии экспериментов (модель СДС без коррекции) показали, что в 1-м и 2-м периодах СДС отмечается рост активности ЦП (табл. 1). В частности, в раннем периоде (1–3 дня) активность антиоксиданта достигает 125 % относительно значений интактной группы. Указанная тенденция сохраняется и в промежуточном периоде и лишь на 3-й неделе экспериментов отмечается спад активности, (1,12 ± 0,05 при контроле – 1,04 ± 0,08).

Из приведенных данных (табл. 2) следует, что при инфузии ФР цифры активности ЦП в различные сроки декомпрессионного периода близки к тем при модели СДС без коррекции. В то же время динамика изменений фермента в выбранные сроки исследований при введении ПФ имеет некоторые особенности: до конца 1-й недели экспериментов отмечается равномерный рост и такое же плавное снижение в последующие сроки.

Уровень активности СОД в эритроцитах снижается в первые 3 дня декомпрессионного периода; к концу недели его значения близки к показателям интактной группы. Как следует из приведенной таблицы (2), активность СОД в эритроцитах при инфузии ФР в начальный период процесса значительно ниже контрольных значений и сравнима с цифрами варианта модели СДС без коррекции, только в конце 1-й недели имеет место постепенный рост активности фермента с достижением контрольных цифр на 14-й день декомпрессионного периода. В отличие от вышеописанных сдвигов в варианте опытов с инфузией ПФ активность СОД достоверно снижена лишь в первые сутки после декомпрессии, а к концу первого периода процесса (3-й день) она сходна с контролем (4,86 ± 0,28). В последующие сроки исследований уровень фермента достоверно выше интактных значений.

В проведенных экспериментах активность КТ значительно снижена в первые три дня СДС без коррекции. В последующем, до конца 2-й недели, наблюдается существенный рост активности фермента, а к концу третьей недели она сравнима с контрольными значениями.

Таблица 1

Активность антиоксидантных ферментов в плазме крови (ЦП) и эритроцитах (СОД, КТ) крыс (модель СДС без коррекции) в различные сроки декомпрессионного периода. M ± m

Серии экспериментов	Интакт. группа	Дни декомпрессионного периода				
		1	3	7	14	21
ЦП, мкМ/л	1,04 ± 0,08	* 1,72 ± 0.16	* 2,34 ± 0,18	1,82 ± 0,08*	1,14 ± 0,06	1,12 ± 0,05
СОД, усл.ед./мг Н*в*	4,12 ± 0,18	* 2,67 ± 0.22	* 2,88 ± 0,27	3,96 ± 0,23	* 4,88 ± 0,32	* 4,82 ± 0,28
КТ, нмоль H_2O_2/ мг Н*в*	35,24 ± 1,62	* 23,46 ± 1.76	* 26,12 ± 1.44	* 46,84 ± 2,32	* 42,46 ± 2,84	36,35 ± 1,16

Примечание. *P < 0,05 достоверность различий в сравнении с интактными значениями.

Таблица 2

Активность церулоплазмина в плазме крови, каталазы и супероксиддисмутазы в эритроцитах крыс в различные дни СДС при инфузии физиологического раствора и ПФ (M ± m)

	Интактная группа	Серии экспериментов	Дни декомпрессионного периода				
			1	3	7	14	21
ЦП	1,04 ± 0,08	ФР	1,84 ± 0,14	2,22 ± 0,16	1,84 ± 0,84	1,18 ± 0,08	1,16 ± 0,07
		ПФ	1,84 ± 0,08	* 1,86 ± 0,12	1,94 ± 0,12	* 1,52 ± 0,06	* 1,32 ± 0,06
СОД	4,12 ± 0,18	ФР	2,84 ± 0,23	2,82 ± 0,32	3,86 ± 0,24	4,54 ± 0,24	4,48 ± 0,28
		ПФ	* 3,64 ± 0,27	* 4,86 ± 0,28	* 5,35 ± 0,18	* 5,82 ± 0,29	4,92 ± 0,32
КТ	35,24 ± 1,62	ФР	25,76 ± 2,74	27,64 ± 2,38	47,24 ± 2,94	39,18 ± 2,32	35,68 ± 2,18
		ПФ	* 33,28 ± 2,86	* 48,82 ± 2,54	50,34 ± 2,62	42,34 ± 2,62	40,16 ± 2,28

Примечание. *P < 0.05 достоверность различий в сравнении с значениями СДС без коррекции.

Введение ФР не приводит к существенным сдвигам активности антиоксиданта в сравнении с вариантом опытов без коррекции, тогда как при инфузии ПФ уровень активности фермента достоверно выше контрольных значений, начиная с конца первого периода; а в варианте СДС без коррекции восстановление активности антиоксиданта наблюдалось лишь к концу первой недели. Пик активности КТ, также как и во второй серии экспериментов, отмечается на 7-й день СДС. В последующие дни активность фермента постепенно снижается, однако на протяжении 2-х последних недель она не достигает контрольных значений.

Таким образом, изменения антиоксидантов – ЦП в плазме крови и СОД в эритроцитах в острой фазе СДС – разнонаправлены: активность ЦП имеет тенденцию к росту, достигая максимального уровня в первом периоде СДС, тогда как основной внутриклеточный антиоксидант (СОД) крови в тот же срок реагирует почти двукратным снижением. Из литературных источников известно, что снижение содержания активности СОД может компенсироваться повышением активности внеклеточных антиоксидантов в плазме крови [10, 12, 15]. В наших экспериментах активность ЦП, который играет существенную роль в антиоксидантной защите во все сроки СДС, при инфузии ПФ сохраняется на достаточно высоком уровне, несмотря на ее снижение на третий день эксперимента. Уровень активности КТ в первые 7 дней также повышается при введении перфторана в сравнении с периодами СДС без коррекции. Надо отметить, что полученные нами данные подтверждают результаты исследований, в которых установлен факт снижения перфтораном интенсивности свободнорадикального окисления при стрессе за счёт увеличения активности СОД и других ферментов антиоксидантной защиты [4]. По-видимому, ПФ приводит к значительной активации ферментов антиоксидантной защиты – СОД, каталазы, надо полагать и ЦП, результатом чего является снижения интенсивности гипоксии и свободно-радикальных процессов в острым периоде развития СДС.

Список литературы

1. Ардашева, Е.И. Применение перфторана с целью профилактики и лечение

компрессионной травмы мягких тканей конечностей (экспериментальное исследование): дис. … канд. мед. наук. – Кемерово, 2002. – 142 с.

2. Нарушения белкового и липидного обмена при синдроме длительного сдавления / Ю.И. Бородин, А.В. Ефремов, А.Р. Антонов, Ю.В. Начаров, А.В. Калиниченко. – Новосибирск, 1997. – 78 с.

3. Нарушения белкового обмена при экспериментальном синдроме длительного сдавления / А.В. Ефремов и др. // Патол. физиология и эксперим. терапия. – 2001. – № 3. – С. 21–23.

4. Модулирующее действие перфторана на соотношение про- и антиоксидантных систем в разных органах / А.Г. Жукова, Т.Г. Сазонтова, И.В. Аркадьева, В.В. Мороз // Общая реаниматология. – 2001. – № 1. – С. 47–50.

5. Закирова А.Н. Клинико-гемодинамические эффекты антиоксиданта церулоплазмина у больных ИБС // Тер. архив. – 1995. – Т. 67, № 4. – С. 33–35.

6. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике. – Минск, 2000. – С. 74–75.

7. Кетлинский С.А., Калинина Н.М. Цитокины мононуклеарных фагоцитов в регуляции реакции воспаления и иммунитета // Иммунология. – 1995. – № 3. – С. 30–48.

8. Метод определения активности каталазы / М.А. Королюк, Л.И. Иванова, И.Г. Майорова, В.Е. Токарев // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16–19.

9. Курашвили Л.В., Ушакова С.В., Волотов В.И. Инфаркт миокарда: особенности липидного обмена, окислительного и антиокислительного потенциала // Вестник Российской академии медицинских наук : ежемесячный научно-теоретический журнал. – 2009. – № 3. – С. 15–19.

10. Логинов А.С, Матюшин Б.Н. Цитотоксическое действие активных форм кислорода и механизмы развития хронического процесса в печени при ее патологии // Пат. физиол. и экспер. терапия. – 1996. – № 4. – С. 3–6.

11. Меньшиков В.В. Лабораторные методы исследования в клинике: справочник. – М.: Изд-во: «Медицина», 1987. – 368 с.

12. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты / Е.Б. Меньщикова, В.З. Ланкин, Н.К. Зенков и др. – М.: Слово, 2006. – 556 с.

13. Нечаев Э.А., Раевский А.К. Савицкий Г.Г. Синдром длительного сдавления (руководство для врачей). – М.: Медицина, 1993. – 208 с.

14. Fried R., Ciesielski-Treska J., Ledig M. and Mandel P. Superoxide dismutase activity in nerve cell culture. Neurochemical Research. – 1978. – Vol. 3, №. 5. P. 633–639.

15. Kirkman H.N., Rolfo M., Ferraris A.N., Gaetani G.F. Mechanisms of protection of catalase by NADPH. Kinetics and stoichiometry. Journal of Biological Chemistry 278. – 1999. – P. 13908–13914.

References

1. Ardasheva Ye.I. *Primeneniye perftorana s tselyu profilaktiki i lecheniye kompressionnoy travmy myagkikh tkaney konechnostey (eksperimentalnoye issledovaniye)* [Application of Perftoran for the prevention and treatment of compression injury of soft tissues of the extremities] / thesis of a candidate of medical Sciences Kemerovo, 2002. pp. 142.

2. Borodin Yu.I. Yefremov A.V., Antonov A.R., Nacharov Yu.V. Kalinichenko A.V. Narusheniya belkovogo i lipidnogo obmena pri sindrome dlitelnogo sdavleniya. [Violations of the protein and lipid metabolism in experimental compartment syndrome.] Novosibirsk, 1997. pp. 78.

3. Efremov A.V. et. al. Narusheniya belkovogo obmena pri eksperimentalnom sindrome dlitelnogo sdavleniya . *Pat. fiziologiya i eksperimentalnaya terapiya.* 2001, no. 3, pp. 21–23.

4. Zhukova A.G., Sazonova T.G., Arkadyeva I.V., Moroz V.V. Moduliruyushcheye deystviye perftorana na sootnosheniye pro- i antioksidantnykh sistem v raznykh organakh. Obshchaya reanimatologiya. 2001. no. 1. pp. 47–50.

5. Zakirova A.N. Kliniko-gemodinamicheskiye effekty antioksidanta tseruloplazmina u bolnykh IBS. Ter. arkhiv. 1995. T. 67, no. 4. pp. 33–35.

6. Kamyshnikov A.S. *Spravochnik po kliniko-biokhimicheskoy laboratornoy diagnostike* [Handbook of clinical and biochemical laboratory diagnostics.] Minsk, 2000. pp. 74–75.

7. Ketlinskiy S.A., Kalinina N.M. *Tsitokiny mononuklearnykh fagotsitov v regulyatsii reaktsii vospaleniya i immuniteta*. Immunologiya. 1995. no. 3. pp. 30–48.

8. Korolyuk M.A., Ivanova L.I., Mayorova I.G., Tokareva V.E. *Metod opredeleniya aktivnosti katalazy*. Laboratornoye delo. 1988, no. 1 pp. 16–19.

9. Kurashvili L.V., Ushakova S.V., Volotov V.I. *Infarkt miokarda: osobennosti lipidnogo obmena, okislitelnogo i antiokislitelnogo potentsiala*. Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk: yezhemesyachnyy nauchno-teoreticheskiy zhurnal. 2009. no. 3. pp. 15–19.

10. Loginov A.s., Matyushin B.N. *Tsitotoksicheskoye deystviye aktivnykh form kisloroda i mekhanizmy razvitiya khronicheskogo protsessa v pecheni pri yeye patologii*. Patologicheskaya fiziologiya i eksperimentalnaya terapiya. 1996. no. 4. pp. 3–6.

11. Menshikova V.V. *Laboratornyye metody issledovaniya v klinike.* [Laboratory methods in the clinic.] Spravochnik. M.: Meditsina, 1987. pp. 368.

12. Menshchikova Ye.B., Lankin V.Z., Zenkov N.K. et al. *Okislitelnyy stress. Prooksidanty i antioksidanty*. [Oxidative stress. Pro-oxidants and antioxidants] M.: Slovo, 2006. pp. 556.

13. Nechayev E.A., Rayevskiy A.K., Savitskiy G.G. *Sindrom dlitelnogo sdavleniya (rukovodstvo dlya vrachey)* [Crush syndrome (a guide for doctors)] M.: Meditsina, 1993. pp. 208.

14. R. Fried, J. Ciesielski-Treska, M. Ledig and P. Mandel. Superoxide dismutase activity in nerve cell culture. Neurochemical Research. 1978. Vol. 3, no. 5. pp. 633–639.

15. Kirkman HN, Rolfo M, Ferraris AN, Gaetani GF. Mechanisms of protection of catalase by NADPH. Kinetics and stoichiometry. Journal of Biological Chemistry 278, 1999. pp. 13908–13914.

Рецензенты:

Кличханов Н.К., д.б.н., профессор кафедры биохимии и биофизики, Минобрнауки России, ФГБОУ ВПО «Дагестанский государственный университет», г. Махачкала;

Габибов М.М., д.б.н., профессор, зав. кафедрой физиологии, анатомии и гистологии, Минобрнауки России, ФГБОУ ВПО «Дагестанский государственный университет», г. Махачкала.

Работа поступила в редакцию 05.09.2013.