

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ ІМЕНІ О.О.БОГОМОЛЬЦЯ

МАЛЬЧЕНКО ОЛЬГА АНАТОЛІЇВНА



УДК 616-092:616.717:616-005:616-08:615.322:577.17

**ПАТОГЕНЕТИЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ПІДХОДІВ ДО КОРЕКЦІЇ
ПОШКОДЖЕНЬ ТКАНИН КІНЦІВКИ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ
РЕПЕРФУЗІЙНОМУ СИНДРОМІ**

14.03.04 – патологічна фізіологія

Автореферат

дисертації на здобуття наукового ступеня

кандидата медичних наук

Київ – 2016

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в ДУ «Кримський державний медичний університет імені С.І. Георгієвського» МОЗ України.

Науковий керівник:

доктор медичних наук, професор **Кубишкін Анатолій Володимирович**,

Офіційні опоненти:

- **Левашов Михайло Іванович**, доктор мед. наук, професор, пров. наук. співробітник Інституту фізіології ім. Богомольця НАН України.
- **Артеменко Михайло Олегович**, кандидат мед. наук, наук. співробітник відділу хірургії магістральних судин Національного інституту хірургії та трансплантології ім. О.О. Шалімова НАМН України.

Захист відбудеться «7» червня 2016 р. о 16⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.198.01 при Інституті фізіології ім. О.О.Богомольця (01024, м. Київ, вул. Богомольця,4).

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту фізіології ім. О.О.Богомольця (01024, м. Київ, вул. Богомольця, 4) та на сайті www.biph.kiev.ua

Автореферат розісланий «29» квітня 2016 р.

Вчений секретар
спеціалізованої
вченої ради,



к.б.н. Любанова О.П.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Реперфузійний синдром (РС), який супроводжується пошкодженням м'язової тканини, досить часто зустрічається при інфаркті міокарда [О.О.Мойбенко, 2011], хірургії серця і судин, трансплантації органів [М.В. Гринев, К.М.Гринев, 2010; С.Н.Гриценко та співавт., 2012], реплантації кінцівок і при інших патологіях [І.А.Криворучко та співавт., 2012]. Причому реперфузійне пошкодження кінцівок є одним з найпоширеніших гострих патологічних станів, що розвиваються при порушенні периферичного кровообігу [P.M.Rothwell, 2005; L.Norgren, 2007]. Особливо яскраво реперфузійний синдром виявляється в тих випадках, коли ішемії-реперфузії піддається м'язова тканина, що пов'язане з високою чутливістю м'язів до гіпоксії [В.В.Бойко та співавт., 2011]. Ключовою патогенетичною ланкою при розвитку реперфузійного синдрому вважаються зміни, що відбуваються в ішемізованих тканинах із зростанням ступеня важкості наслідків ішемії після відновлення кровотоку і подальшим розвитком запалення і рабдоміолізу [Н.А.Новикова та співавт., 2011; M.Flück et al., 2015]. Подальший розвиток системних ускладнень, що включає формування важкої поліорганної недостатності, часто резистентної до існуючих методів лікування, приводить до збільшення летальності [М.В.Гринев, К.М.Гринев, 2010].

Відомо, що найважливіша роль у патогенезі реперфузійного синдрому належить системній активації протеолітичних ферментів у результаті підвищення проникності клітинних мембран і екзоцитозу лейкоцитів [S. Duru et al., 2005; K. Shirahane et al., 2006]. Стан неспецифічних протеаз і їх інгібіторів може істотно впливати на пошкодження м'язової тканини при реперфузійному синдромі, а отже і на розвиток системних ускладнень [Л.В. Анісімова, 2014]. Крім того, розвиток реперфузійного синдрому супроводжується інтенсифікацією процесів вільнорадикального окиснення ліпідів (ВРО) [В. Н. Єльський та співавт., 2006]. На сучасному етапі вивчення змін в протеаз-інгібіторній системі на локальному і системному рівні при реперфузійному синдромі, зважаючи на його поширеність та значний науковий і практичний інтерес, багато питань щодо механізмів розвитку РС залишаються відкритими. У більшості випадків у наукових дослідженнях вивчали активність протеаз на рівні крові, а дані про стан протеаз-інгібіторного дисбалансу на тканинному рівні носять суперечливий характер.

Розуміння патогенетичних механізмів ушкодження тканин при синдромі ішемії-реперфузії дозволяють вести пошук лікувальних підходів з впливом на їх ключові механізми. Причому, в сучасну клінічну практику впроваджуються препарати таких груп, як інгібітори протеолізу, антиоксиданти, простагландини та їх аналоги та ін. [О.О.Мойбенко, 2007; W. Błogowski et al., 2012; T.Chen, 2013].

Тому дуже важливим є проведення комплексної оцінки стану протеолізу і ВРО на різних рівнях структурної організації (локальному і системному). Подальше вивчення протеаз-інгібіторної системи та ВРО ліпідів при РС дозволить виявити нові механізми розвитку пошкодження на клітинному і органному рівнях та експериментально обґрунтувати шляхи патогенетичної корекції реперфузійних розладів.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота виконана в рамках 2-х планових НДР кафедри патологічної фізіології ДУ «Кримський державний медичний університет імені С. І. Георгієвського»: «Розробка підходів для оцінки патогенетичної ролі тканинних протеїназ та їх інгібіторів при системних і локальних патологічних процесах» (№ держреєстрації 0107U001255) та «Розробка критеріїв діагностики синдрому системної запальної реакції на основі вивчення патогенетичної ролі компонентів протеїназ-інгібіторної системи при критичних станах» (№ держреєстрації 0110U002965).

Мета і завдання дослідження. Мета роботи полягає в експериментальному обґрунтуванні патогенетичних шляхів фармакологічної корекції реперфузійних ушкоджень шляхом вивчення стану процесів перекисного окислення ліпідів і неспецифічних протеїназ та їх впливу на морфологічні та ультраструктурні зміни м'язової тканини кінцівок щурів при синдромі ішемії/реперфузії.

Для досягнення мети були поставлені наступні **завдання**:

1. Визначити динаміку змін рівня неспецифічних протеїназ та їх інгібіторів у скелетній м'язовій тканині з осередку ішемії/реперфузії і сироватці крові при розвитку експериментального синдрому ішемії/реперфузії.

2. Вивчити характер змін процесів вільно радикального окислення і антиоксидантної системи в гомогенатах м'язової тканини і в сироватці крові експериментальних тварин в різні терміни розвитку синдрому ішемії/реперфузії.

3. Встановити характер морфологічних і ультраструктурних змін у скелетній м'язовій тканині в осередку розвитку синдрому ішемії/реперфузії

4. Визначити ефективність медикаментозної корекції експериментального синдрому ішемії/реперфузії з використанням інгібіторів протеолізу, антиоксидантів і аналогів природного простагландину E1.

5. З'ясувати зв'язок фармакологічної корекції поєднаним застосуванням кверцетина, апротиніна і аналога природного простагландину E1 з біохімічними, морфологічними та ультраструктурними змінами скелетних м'язів при синдромі ішемії/реперфузії кінцівки.

Об'єкт дослідження – патогенетичні механізми пошкодження м'язової тканини при розвитку реперфузійного синдрому і його корекції в експерименті у щурів лінії Wistar.

Предмет дослідження – стан процесів перекисного окиснення ліпідів і антиоксидантної системи сироватки крові, протеїназ-інгібіторної системи сироватки крові, супернатантів гомогенатів скелетних м'язів раніше ішемізованої кінцівки щурів при розвитку реперфузійного синдрому і на тлі його патогенетичної корекції.

Методи дослідження: біохімічні (спектрофотометричне визначення активності показників вільнорадикального окиснення ліпідів, протеїназ-інгібіторної системи в сироватці крові, супернатантах гомогенатів скелетних м'язів з використанням синтетичних субстратів – для оцінки ступеня важкості метаболічних порушень ВРО і протеїназ-інгібіторної системи на локальному та системному рівні та для вивчення впливу антиоксидантів, інгібіторів протеаз і аналогів простагландину E₁), морфологічні (світлова та електронна мікроскопія – для

підтвердження розвитку патології та реєстрації динаміки процесу, який моделювали, а також для оцінки впливу препаратів, що застосовували для лікарської корекції), статистична обробка отриманих результатів.

Наукова новизна одержаних результатів. Уперше встановлено зміни неспецифічних протеїназ, їх інгібіторів, показників перекисного окиснення ліпідів і антиоксидантів в гомогенатах м'язової тканини при експериментальному синдромі ішемії/реперфузії і співставлення виявлених змін з показниками в сироватці крові.

Уперше виявлено, що розвиток синдрому ішемії-реперфузії приводить до підвищення активності неспецифічних протеїназ і пригнічення інгібіторів в м'язовій тканині на тлі активації процесів перекисного окиснення ліпідів. Уперше доведено, що максимальні зміни в м'язовій тканині виявляються в період до 12-24 годин розвитку реперфузії і супроводжуються активацією неспецифічних протеїназ і їх інгібіторів в сироватці крові.

Отримані результати істотно розширюють наукові поняття про значення патогенетичних протеолітичних і вільнорадикальних механізмів розвитку місцевого пошкодження скелетної м'язової тканини при експериментальному синдромі ішемії/реперфузії, активація яких призводить до більш значних морфологічних та ультраструктурних змін в ушкодженій ділянці.

Отримані результати дозволяють поглибити наукові дані про ефективність вживання водорозчинної форми кверцетину, інгібітору протеїназ аprotиніну і аналогу природного простагландину E_1 для корекції метаболічних змін при розвитку реперфузійного синдрому, що підтверджується зниженням рівня вторинних продуктів ВРО і збільшенням рівня ендогенних антиоксидантів, зниженням протеолітичної активності і збільшенням рівня інгібіторів протеїназ в м'язовій тканині і на системному рівні. Найбільша ефективність виявлена при поєднаному вживанні препаратів, яке приводило до нормалізації показників протеолізу і ВРО, зменшення морфологічних і ультраструктурних змін в м'язовій тканині з осередку ішемії/реперфузії кінцівки щурів.

Отримані результати дозволяють окреслити подальший розвиток визначення системних змін в активності неспецифічних протеїназ і їх інгібіторів на моделі реперфузійного синдрому для розвитку синдрому системної запальної реакції, обґрунтовані підходи до діагностики та прогнозу його розвитку.

Отримані наукові дані про те, що ефективне блокування патогенетичних змін в ураженій тканини при розвитку реперфузії є ефективним механізмом профілактики розвитку системних ускладнень при синдромі ішемії/реперфузії.

Практичне значення одержаних результатів. Отримані експериментальні дані дозволяють обґрунтувати нові підходи до патогенетичної корекції синдрому ішемії-реперфузії з використанням інгібіторів протеолізу, антиоксидантів і аналогів природного простагландину E_1 . Результати дослідів дозволяють обґрунтувати доцільність клінічної ефективності їх поєднаного вживання при синдромі ішемії-реперфузії.

Результати дисертаційного дослідження впроваджено в навчальний процес на кафедрах патофізіології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця, Запорізького державного медичного університету, Національного

фармацевтичного університету, Української медичної стоматологічної академії, Одеського національного медичного університету, Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова, Дніпропетровської медичної академії, Сумського державного університету, Івано-Франківського державного медичного університету, Буковинського державного медичного університету, Тернопільського державного медичного університету ім. І.Я. Горбачевського; Кримського державного медичного університету ім. С.І. Георгієвського.

Особистий внесок здобувача. Автором особисто проведений патентно-інформаційний пошук літератури, відпрацьована модель реперфузійного синдрому, відповідно до якої особисто проведені експериментальні дослідження, їх аналіз та узагальнення, обґрунтовані наукові висновки і рекомендації для практичного використання отриманих результатів. Особисто автором проводилось дослідження стану вільнорадикального окиснення ліпідів, рівня активності протеаз та їх інгібіторів. Дисертантка самостійно провела статистичну обробку результатів досліджень та аналіз отриманих даних. Наукова концепція дослідження, його мета і завдання, розробка методичних підходів та методів дослідження були проведені спільно з науковим керівником. Патоморфологічні та ультраструктурні дослідження тканини скелетних м'язів були виконані сумісно з доцентом кафедри патологічної анатомії з секційним курсом, к.мед.н., доцентом Т.Г. Філоненко.

Апробація результатів дисертації. Результати досліджень доповідались на 84-й і 85-й міжнародних науково-практичних конференціях студентів та молодих вчених (Сімферополь, 2012, 2013 р.р.); науковій конференції «13-і читання ім. В. В. Підвисоцького» (Одеса, 2014), VI Національному конгресі патофізіологів України з міжнародною участю (Сімферополь - Місхор, 2012), 7 конгресі міжнародного товариства з патофізіології (Рабат, вересень 2014), на пленумі і конференції наукового товариства патофізіологів України (Вінниця, 2014).

Апробація дисертації проведена на засіданні кафедри патологічної фізіології Кримського державного медичного університету імені С.І.Георгієвського.

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 11 наукових робіт, з них 7 статей у журналах і збірках наукових видань України, 1 стаття у закордонному науковому журналі, 4 тези доповідей у матеріалах наукових конференцій.

Обсяг і структура дисертації. Дисертаційна робота викладена на 148 сторінках, представлена за загальноприйнятим для наукових робіт планом. Текст дисертації включає вступ, огляд літератури, матеріали і методи дослідження, два розділи власних результатів дослідження, розділ аналізу та узагальнення результатів, висновки, список літератури. Дисертаційна робота містить 10 таблиць і 30 рисунків, включаючи 21 мікрофотографію. Бібліографічний перелік використаних джерел включає 197 наукових праць.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріал і методи дослідження. Експериментальні дослідження були проведені на 116 білих щурах лінії Wistar, масою 180–200 г. Для створення структурної групи щурів утримували в ідентичних умовах. Експериментальні дослідження проводили відповідно до вимог «Європейської конвенції про захист

хребетних тварин, які використовуються у дослідницьких і інших наукових цілях» (Strasbourg, 18.03.1986), постанови I національного конгресу з біоетики (Київ, 2001), указу МОЗ України № 281 від 01.11.2000г. «Про заходи по подальшому удосконаленню організаційних норм роботи з використанням експериментальних тварин».

В якості моделі реперфузійного синдрому використовували модель з накладанням гумових джгутів на обидві задні кінцівки тварин на рівні пахової складки на 6 годин під легким ефірним наркозом, використовуючи модифікацію В.З. Харченка (посвідчення на раціоналізаторську пропозицію №1786, видане Кримським державним медичним інститутом 28.09.1989 р.). Сила накладених джгутів складала від 150 Н до 170 Н. Ширина перетягу тканин становила 2-3 мм. Критерієм спроможності накладення джгута була відсутність набряку кінцівки і блідість їх забарвлення. Раніше проведені дослідження показали, що при такій методиці накладання джгутів кровообіг у кінцівках щурів повністю блокується, тобто при використанні експериментальної моделі відтворювалася повна ішемія кінцівок. Розвиток реперфузійного синдрому контролювали за допомогою морфологічних досліджень. Відбір біологічного матеріалу здійснювали через 6 годин ішемії, а також через 6, 12, 24 та 48 годин після відновлення кровообігу кінцівок. Контрольна група складалася з 18 інтактних тварин. Кров для дослідження отримували з яремної вени щурів шляхом катетеризації яремної вени перед декапітацією. Сироватку крові виділяли з охолоджуваної нестабілізованої крові, шляхом центрифугування протягом 15 хвилин при 3000 об/хв. Гемолізат отримували шляхом додавання до 0,1 мл цілісної крові 1,9 мл дистильованої води. Шматочки м'язів з м'язової тканини стегна нижче за місце накладання джгута, промивали в охолоджену фізіологічному розчині, обсушували фільтрувальним папером, очищали від жиру і сполучної тканини і ретельно подрібнювали ножицями. 1-2 г цієї маси переносили в ступку з кварцевим піском і ретельно розтирали до гомогенного стану. Після цього додавали фізіологічний розчин (10 мл на 1 г тканини) і перемішували скляною паличкою. Отриманий екстракт м'язів фільтрували через чотири шари вологої марлі і центрифугували протягом 15 хв. при 1500g та відбирали супернатант для проведення біохімічних досліджень.

В серіях експериментів з лікарською корекцією здійснювали введення фармакологічних препаратів превентивно шляхом одноразової інтраперитонеальної ін'єкції за 30 хвилин до відновлення кровообігу кінцівок. Як антиоксидант використовували водорозчинну форму біофлавоноїду кверцетину «Корвітин» (ЗАТ НПЦ «Борщагівській хіміко-фармацевтичний завод», Україна). В якості інгібітору протеїнази застосовували апротинін у виді «Гордоксу» («Gedeon Richter», Угорщина). Як аналог природного простагландину E₁ використовували алпростан («Zentiva», Чехія). Дози препаратів були підібрані, виходячи з середніх терапевтичних доз, що використовуються в клініці на 1 кг маси. Препарати щурам вводили внутрішньоочеревинно: Гордокс вводили в дозі 20000 КИЕД/кг, розведений в ізотонічному розчині хлориду натрію, з розрахунку 10 мл/кг маси; корвітин вводили в дозі 10 мг/кг маси тіла, розведений в ізотонічному розчині натрію хлориду, з розрахунку 10 мл/кг маси; алпростан вводили в дозі 20 мкг/кг маси. Аналогічні дози

препаратів застосовували в серіях експериментів, направлених на вивчення ефектів аprotиніну, кверцетину і аналогу природного простагландину E_1 при їх комбінованому використанні. Щурам контрольної і експериментальних груп без лікування вводили ізотонічний розчин хлориду натрію в розрахунку 10 мл/кг. Як контрольні експерименти, так і експерименти із застосуванням препаратів проводилися в абсолютно однакових, стандартизованих умовах з використанням перерахованих методик. Розподіл тварин по серіях представлено в табл.1.

Таблиця 1

Розподіл тварин по серіям експерименту

Серії дослідів		Щури шт.
1.	Контрольна група	18
2.	Ішемія 6 годин	10
3.	Реперфузійний синдром, 6 годин	10
4.	Реперфузійний синдром 12 годин	10
5.	Реперфузійний синдром, 24 години	8
6.	Реперфузійний синдром 48 годин	12
7.	Реперфузійний синдром 12 годин + лікування кверцетином	10
8.	Реперфузійний синдром 12 годин + лікування аprotиніном	10
9.	Реперфузійний синдром 12 годин + лікування аналогом природного простагландину E_1	8
10.	Реперфузійний синдром 12 годин + поєднане лікування аprotиніном і кверцетином	10
11.	Реперфузійний синдром 12 годин + поєднане лікування аprotиніном, кверцетином і аналогом природного простагландину E_1	10
Всього:		116

У сироватці крові і супернатантах гомогенатів скелетних м'язів вивчали активність протеїназ та їх інгібіторів ензиматичними методами з використанням синтетичних субстратів, оптичну щільність вимірювали на спектрофотометрі «Biomat 5» (Великобританія) [А.В.Кубишкін та співавт., 2010]. Трипсиноподібну активність (ТПА), визначали спектрофотометричним методом, заснованим на вимірюванні швидкості відщеплювання N-бензоіл-L-аргініну від синтетичного субстрата N-бензоіл-L-аргініну етилового ефіру (BAEE) (Reanal). Розрахунок активності проводили по приросту оптичної щільності в пробі за 1 хвилину і виражали в мкМолях ВА, звільненого 1 мл біологічного матеріалу за 1 хвилину.

Вимірювання еластазоподібної активності (ЕПА) проводили по гідролізу синтетичного субстрата N-t-BOC-аланіл-p-нітрофінілового ефіру (Reanal). Визначення антитриптичної активності (АТА) проводили уніфікованим методом, заснованим на визначенні гальмування BAEE–естеразної активності трипсину розведеною в 50 разів сироваткою крові; гідроліз трипсином вимірювали по

приросту оптичної щільності проби при 253 нм. Для визначення кислотостабільних інгібіторів (КСІ) проби заздалегідь обробляли для осадження кислотолабільних білків: для цього 0,1 мл сироватки крові, розведеної в 10 разів, змішували з 0,1 мл 0,05 М Na-ацетатного буфера (рН 4,1) і прогрівали на водяній бані при 60 °С протягом 20 хвилин. Після охолодження пробу нейтралізували 0,5 Н розчином NaOH і об'єм доводили 0,05 М трис-НСІ буфером (рН 8,0) до 1,9 мл. Подальше визначення проводили за методом для визначення антитриптичної активності.

Інтенсивність ВРО ліпідів в крові і супернатантах гомогенатів скелетних м'язів оцінювали за концентрацією продуктів, що реагують з тіобарбітуровою кислотою (ТБК-АП) [Т.Асакawa, S.Matsushita, 1980]. Визначення антиокислювального потенціалу включало дослідження каталазоподібної активності (КПА) [М.А.Корольок та співавт., 1988], церулоплазміну (ЦП) [В.Г.Колб, В.С.Камышников, 1982] і супероксиддисмутази (СОД) [Д.Е.Дубинина та співавт., 1983; С.Чевари та співавт., 1985]. В тканині скелетних м'язів проводили патоморфологічні та ультраструктурні дослідження (світлову та електронну мікроскопію).

Необхідні статистичні розрахунки та побудову діаграм проводили за допомогою ЕОМ з використанням програми Microsoft Excel та Statistica v5.5a Statsoft®. Одержані результати опрацьовували модулем параметричних тестів ANOVA/MANOVA (LSD test, Newman-Keuls test, Duncun's test multiple range test, Turkey honest significance difference) для повторювальних порівнянь середніх значень у дослідних групах та непараметричним кореляційним тестом Spearman для порівняння масиву даних у нерівномірних вибірках [В.П.Боровиков, 1998; С. Гланц, 1999]. Дані у таблицях подані як середні значення та їх стандартні похибки ($M \pm m$), коефіцієнт R відображає ступінь кореляції. Всі вимірювання і дослідження здійснювалися на устаткуванні, що пройшло метрологічну перевірку і експертизу.

Результати досліджень та їх обговорення. В результаті проведених експериментальних досліджень встановлено, що при реперфузійному синдромі спостерігається значна активація процесів протеолізу в сироватці крові; при цьому надходження протеолітичних ферментів з раніше ішемізованих тканин набуває вирішального значення. Встановлено, що при розвитку ішемії задніх кінцівок щурів в сироватці крові відмічена тенденція до зростання рівня еластазоподібної активності на тлі незначного падіння рівня ТПА в порівнянні із здоровими тваринами (рис.1).

При моделюванні ішемії в супернатантах гомогенатів м'язів мала місце тенденція до зниження активності даних ферментів в порівнянні з аналогічними показниками контрольної групи. Дослідження інгібіторної активності сироватки крові щурів з моделлю ішемії виявили незначне зростання АТА і зниження кількості КСІ на 37,4 % ($p < 0,001$) в порівнянні з показниками групи інтактних тварин. У супернатантах гомогенатів м'язів щурів також було відмічено зростання АТА на 28,5 % ($p < 0,05$) і різке зниження кількості КСІ (у 7,2 рази) в порівнянні з контрольною групою.

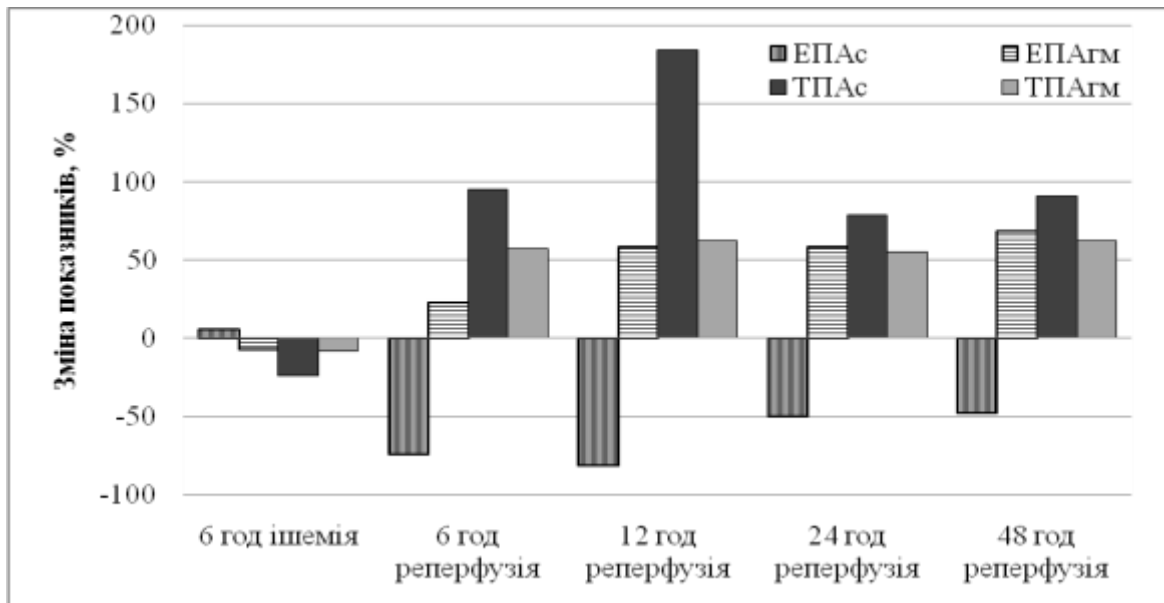


Рис. 1. Зміни активності протеолітичних ферментів в сироватці крові (с) і гомогенатах скелетних м'язів раніше ішемізованих кінцівок (гм) в умовах моделювання ішемії-реперфузії (у відсотках по відношенню до контрольної групи).

Вивчення реперфузійного синдрому продемонструвало збільшення рівнів трипсиноподібної активності сироватки крові всіх експериментальних груп з РС, поряд з вираженим зниженням активності інгібіторів неспецифічних протеаз. Так, при РС тривалістю 12 годин було виявлено збільшення ТПА в 2,8 рази ($p < 0,001$) в порівнянні з групою інтактних щурів. Описані зміни супроводжувалися падінням антитриптичної активності на 25,7% ($p < 0,001$), а кислотостабільних інгібіторів - на 44,3% ($p < 0,001$), в порівнянні з контролем. Настільки значне підвищення активності трипсиноподібних протеаз є однією з основних причин порушення функцій гуморальних регуляторних систем плазми крові з утворенням значної кількості біологічно активних речовин, і, як наслідок, декомпенсації системної гемодинаміки і мікроциркуляції з розвитком органопатології.

На цьому фоні розвиток реперфузійного синдрому супроводжувався функціональним перенапруженням і подальшим виснаженням інгібіторного потенціалу сироватки крові. Так, тривала реперфузія (24-48 годин від моменту відновлення кровообігу кінцівок) характеризується вираженим зниженням АТА і КСІ. Так, через 24 години після зняття джгутів АТА знизилася в 2 рази ($p < 0,001$), а КСІ - на 49,5 % ($p < 0,001$) в порівнянні з контрольною групою, що свідчить про недостатні можливості компенсаторних резервів і їх підвищене витрачання.

Таким чином, механізми антипротеазного захисту сироватки крові виявилися неспроможними, що і зумовило максимальну реалізацію деструктивної дії трипсиноподібних протеїназ на системному рівні. У зв'язку з цим можна припустити, що при розвитку ішемічно-реперфузійного пошкодження системна активація процесів протеолізу, пов'язана із вивільненням протеїназ з раніше ішемізованих тканин, посилюється швидше за все за рахунок надмірного споживання інгібіторів протеїназ.

Поряд із системними зрушеннями протеїназ-інгібіторної рівноваги, розвиток РС супроводжувався змінами показників активності неспецифічних протеаз і їх інгібіторів на локальному рівні: у гомогенатах скелетних м'язів. На місцевому рівні збільшення активності протеолітичних ферментів супроводжувалося компенсаторним підвищенням АТА і падінням рівня КСІ в порівнянні з показниками інтактних тварин. Так, при 12-ти годинній реперфузії мало місце підвищення активності еластази, ТПА – на 62,5 % ($p < 0,001$) і падіння КСІ в 2,9 рази ($p < 0,001$) в порівнянні з показниками інтактних тварин. Описані зміни в протеїназ-інгібіторній системі скелетних м'язів раніше ішемізованих кінцівок, ймовірно, пояснюються тим, що в умовах вираженої токсемії і гіперпротеолізу, супроводжуваних РС, власний інгібіторний потенціал виявляється недостатнім. Звертає на себе увагу факт зниження саме КСІ, які, завдяки стійкості в кислому середовищі, грають головну роль в протекції тканин від локальної деструктивної дії протеаз в умовах вираженої гіпоксії, супроводжуваної розвитком реперфузійного синдрому.

Аналізуючи кореляційні зв'язки між показниками неспецифічних протеаз і їх інгібіторів в контролі, а також при експериментальній ішемії і РС, ми виявили ряд статистично достовірних зв'язків різної міцності. Так, відслідковується чіткий зворотній кореляційний зв'язок між ЕПА та ТПА у контрольній групі тварин ($R = -0,9$, $p = 0,037$), а також між АТА та КСІ ($R = -0,82$, $p = 0,041$). В той же час в умовах ішемії обернена залежність зберігається лише для АТА та КСІ ($R = -0,58$, $p = 0,099$).

Результати проведених експериментальних досліджень показали, що при реперфузійному синдромі на тлі посилення процесів протеолізу спостерігається значна активація вільнорадикального окиснення ліпідів. Про це свідчить підвищення вмісту в сироватці крові ТБК-активних продуктів, максимальна кількість яких спостерігалася через 48 годин після зняття джгутів: цей показник перевищив контроль в 2,8 рази ($p < 0,001$) (рис. 2). Активація процесів ВРО супроводжувалася зростанням КПА і ЦП. Мабуть, антиоксидантної дії каталази і ЦП при розвитку ішемічно-реперфузійного пошкодження виявилось недостатньо, і вміст в сироватці крові вторинних продуктів вільнорадикального окиснення ліпідів продовжував підвищуватися.

Посиленню процесів ліпопероксидації сприяло і зниження активності внутрішньоклітинних антиоксидантних ферментів. Так, найнижчий рівень СОД був виявлений в групі тварин з 48-годинним реперфузійним періодом: на 74,7 % ($p < 0,001$) нижче за показник контрольної групи.

Моделювання ішемії і реперфузійного синдрому викликає зростання вільнорадикального окиснення ліпідів в супернатантах гомогенатів скелетних м'язів на тлі падіння вмісту антиоксидантних ферментів (СОД, КПА). В даному випадку, на нашу думку, накопичення токсичних продуктів ВРО ліпідів можна розцінювати як наслідок недостатньої активності ключових ферментів антиоксидантного захисту.

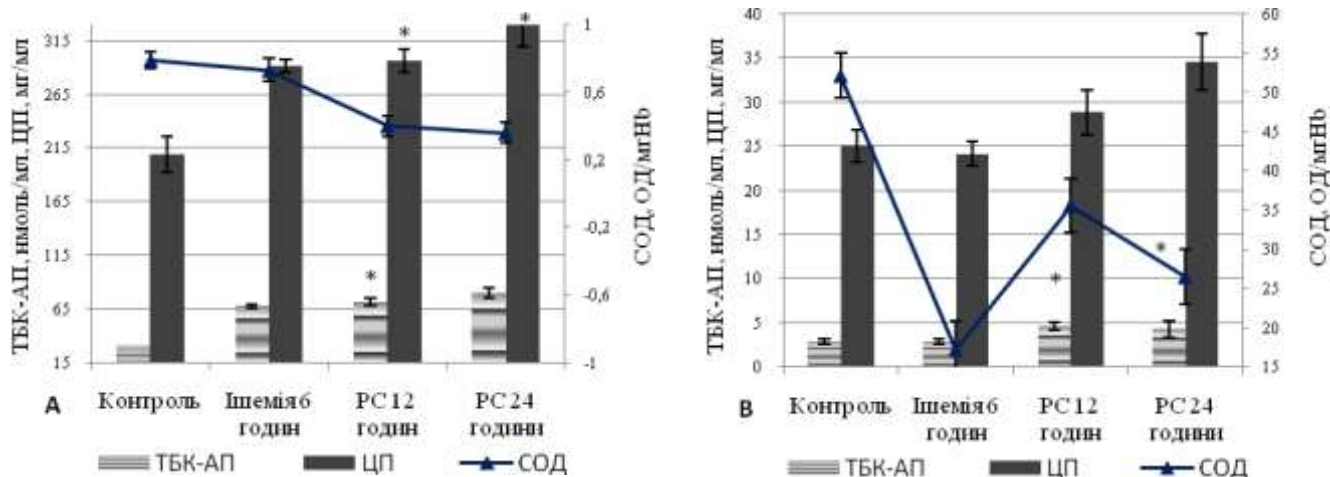


Рис. 2. Показники вільнорадикального окиснення ліпідів крові (А) і супернатантів гомогенатів скелетних м'язів (В) у щурів з моделлю ішемії/реперфузії

Дослідження кореляційного зв'язку між компонентами окислювально-антиоксидантного гомеостазу в гомогенатах скелетних м'язів продемонструвало позитивну кореляцію, що характерна для ферментів антиоксидантного захисту в гомогенатах скелетних м'язів у інтактних тварин: каталаза та СОД ($R=0,87$, $p=0,00045$), СОД та церулоплазмін ($R=0,64$, $p=0,031$), каталаза та церулоплазмін ($R=0,74$, $p=0,008$). Збільшення концентрації продуктів ТБК супроводжується підвищенням активності ферментів антиоксидантного захисту ($R=0,89$, $p=0,006$). В ішемізованій м'язовій тканині відмічено достатню кореляцію лише між СОД та церулоплазміном ($R=0,67$, $p=0,023$).

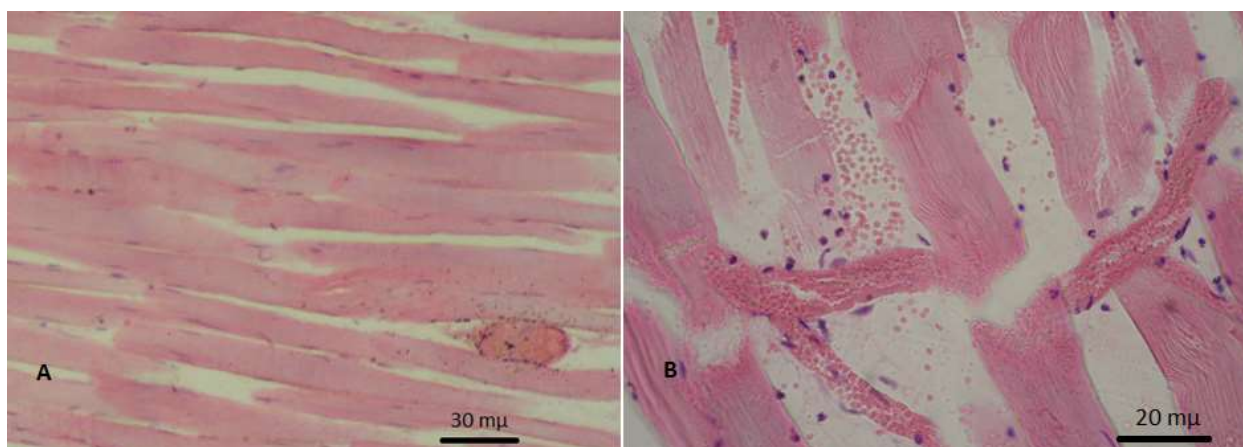


Рис. 3. Структура нормальної м'язової тканини в групі контрольних щурів (А) (Зб. $\times 100$) і периваскулярний набряк, петехіальні крововиливи в групі щурів з реперфузією 6 годин (В). Забарвлення гематоксиліном та еозином (Зб. $\times 250$).

Описана динаміка біохімічних показників при розвитку реперфузійного синдрому супроводжувалася вираженими змінами морфологічної картини ішемізованих тканин, яка характеризувалася значними порушеннями мікроциркуляції, які прогресували у міру збільшення тривалості постішемічного періоду, а також дистрофічними і некробіотичними змінами (рис.3 та рис.4).

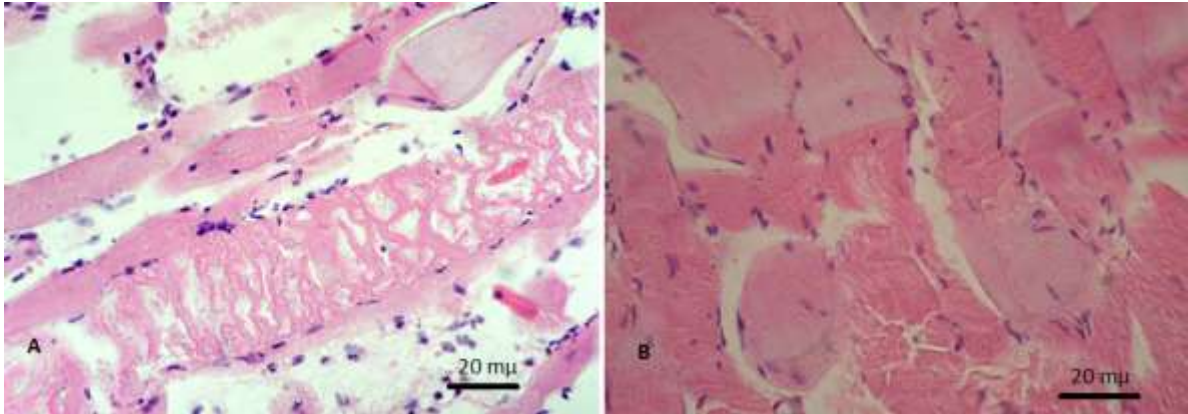


Рис. 4. Розпад м'язових волокон з формуванням «булавоподібних» потовиць на кінцях фрагментів в групі щурів з реперфузією 12 годин (А) і набряк м'язових волокон, міждисккових просторів та множинні розриви м'язових волокон в групі щурів з реперфузією 24 години (В). Забарвлення гематоксиліном та еозином. Зб. х 250.

При експериментальному синдромі ішемії/реперфузії спостерігалися також певні ультраструктурні зміни. Так, на електронограмах м'язової тканини визначалися прояви пошкодження м'язів, разволокністість міофібрил, втрата структури мітохондрій, руйнування їх кріст. У стромі спостерігався значний набряк і велика кількість поліморфно-ядерних лейкоцитів, в ядрі клітин мали місце конденсація хроматину на ядерній мембрані, що свідчило про цитоплазматичний набряк (рис.5 та рис.6).

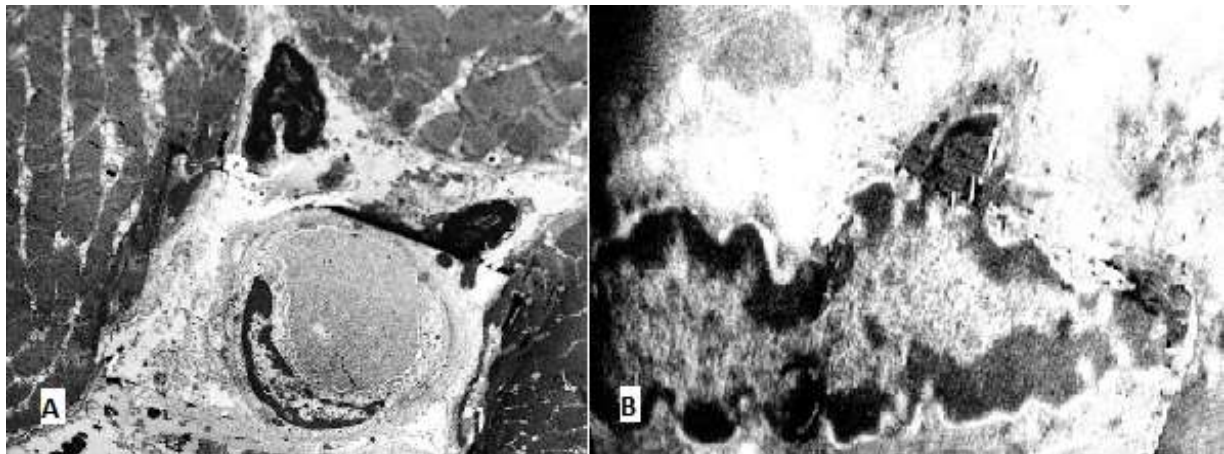


Рис. 5. Набряк м'язової тканини, нерівномірне розширення простору між окремими міофібриллами в групі щурів з ішемією 6 годин (А) (Зб. х6000) і конденсація хроматину на ядерній мембрані ядра міоциту в групі щурів з реперфузією 12 годин (В) (Зб. X18600).

Вищеописані морфологічні зміни багато в чому обумовлені розвитком виражених порушень мікроциркуляції і системної гемодинаміки з розвитком гіпоксичного пошкодження клітин. Провідна роль при цьому належить порушенням стану гуморальних регуляторних систем, що виникають в результаті розвитку дисбалансу протеїназ-інгібіторної і окислювально-антиоксидантної систем.

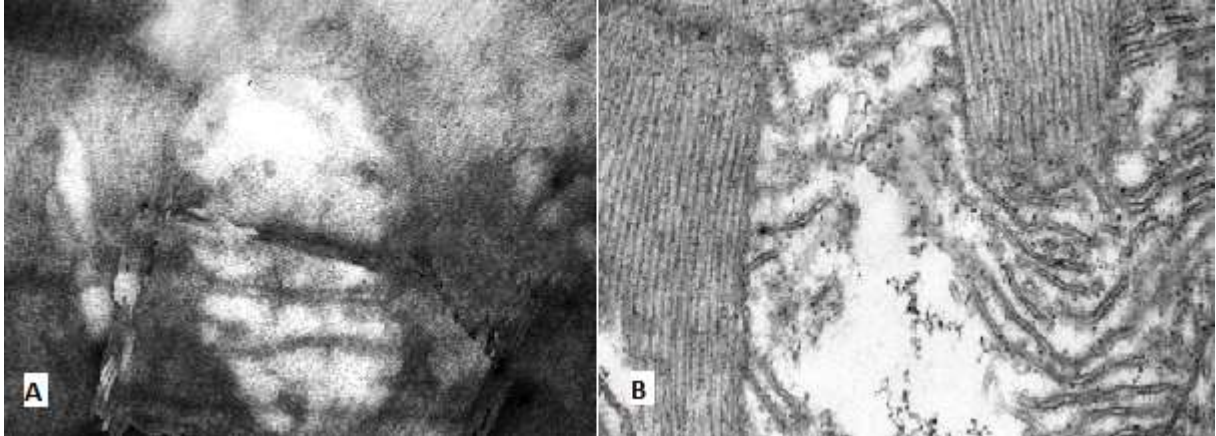


Рис. 6. Злиття мембран сусідніх мітохондрій, гігантська мітохондрія в групі щурів з реперфузією 6 годин (А) (Зб. $\times 20000$) і відкладення аморфного матеріалу (кальцію) у матриксі порушених мітохондрій в групі щурів з реперфузією 24 години (В) (Зб. $\times 26000$).

Отримані в ході досліджень результати переконливо свідчать про те, що при розвитку РС розвивається комплекс метаболічних і структурно-функціональних порушень. При цьому важливими ланками патогенезу є дисбаланс неспецифічних протеаз і їх інгібіторів, а також інтенсифікація процесів ВРО ліпідів на тлі виснаження антиоксидантних резервів організму.

Результати проведених досліджень, а також дані літератури дозволили запропонувати схему, яка демонструє роль порушень протеїназ-інгібіторної системи і посилення процесів ВРО ліпідів в патогенезі РС та взаємозв'язок локальних та системних уражень при реперфузійному синдромі (рис.7).

Значення активації оксидантів і протеїназ в патогенезі критичних станів дозволило припустити, що блокування окислювальної і протеолітичної активності може запобігати або істотно знижувати ризик формування синдрому системної запальної реакції. В той же час, враховуючи патогенетичні механізми формування синдрому ішемії-реперфузії, в даний час все більше значення надається вивченню впливу простагландинів і їх синтетичних аналогів для корекції цих станів. Відомо, що простагландин E_1 володіє такими властивостями, як стабілізація ендотелію, вазодилатація, є ефективним інгібітором агрегації тромбоцитів, інгібує активацію нейтрофілів, знижуючи вивільнення вільних радикалів, лізосомальних ферментів, медіаторів хемотаксису, цитокінів [Y.F. Jiang, W.W. Wang, 2008]. У зв'язку з цим, включення його в лікувальний комплекс поряд з використанням інгібіторів протеолізу і антиоксидантів може потенційно розширити спектр дії на основні ланки патогенезу синдрому ішемії-реперфузії і підвищити ефективність лікування і виживання пацієнтів в критичних станах.

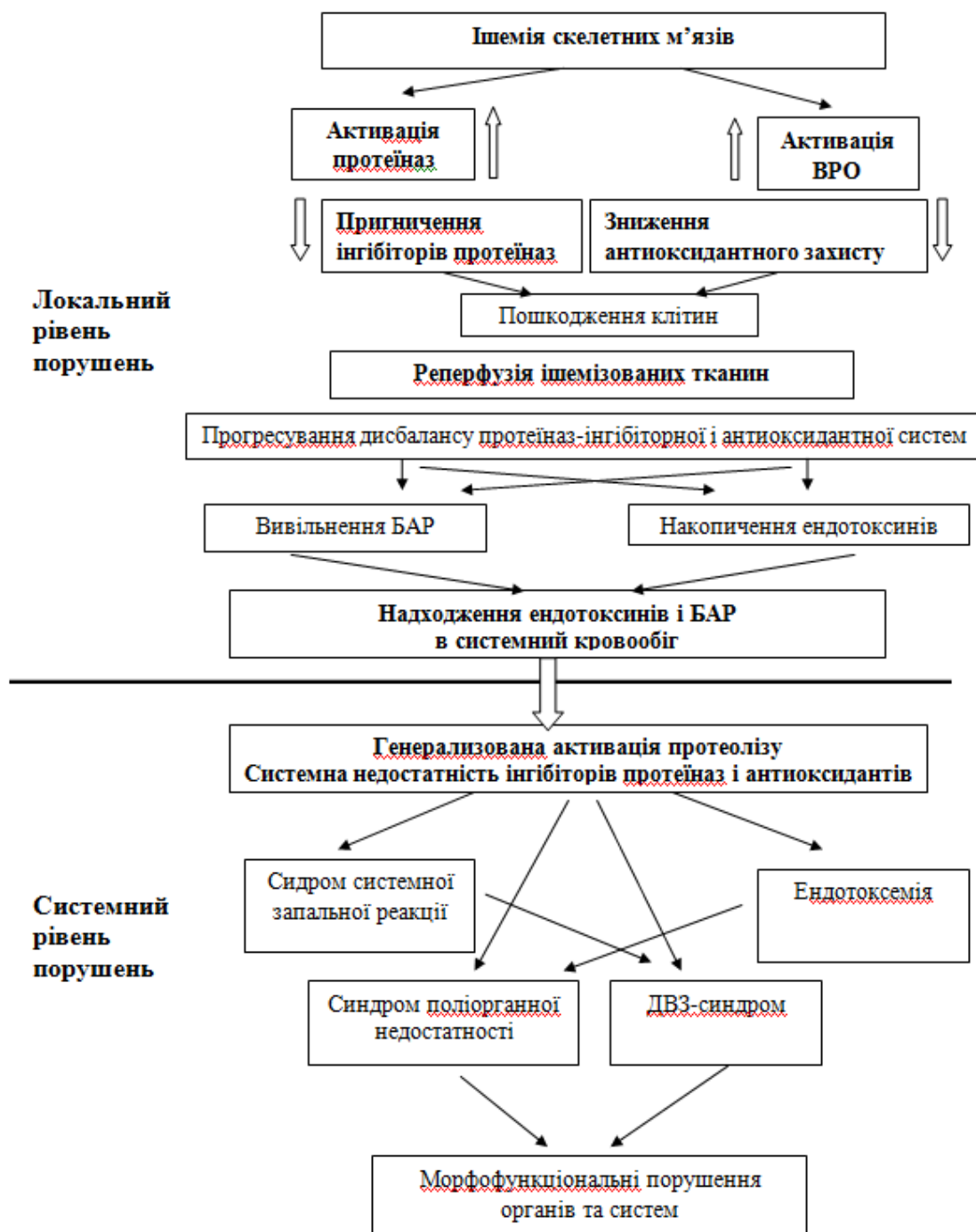


Рис. 7. Патогенетична схема взаємозв'язку локальних та системних уражень при реперфузійному синдромі

Як показали результати, отримані при експериментальній медикаментозній корекції синдрому ішемії-реперфузії в термін 12 годин після відновлення кровотоку, зниження протеолітичної активності, підвищення інгібіторного потенціалу і блокування процесів вільнорадикального окиснення спостерігалось в разі вживання всіх використаних препаратів, проте найбільш істотні зрушення спостерігалися при поєднаному вживанні інгібіторів протеолізу, антиоксидантів і аналогів природного простагландину E_1 ; нормалізація показників супроводжувалася поліпшенням стану експериментальних тварин.

Проведені біохімічні дослідження показали тенденцію до нормалізації ЕПА сироватки на тлі використання апротиніну для корекції 12-годинного РС, при цьому рівень ЕПА був в 2,8 рази ($p < 0,001$) вище за аналогічний показник групи тварин без лікування, проте декілька нижче за значення групи здорових тварин (рис.8).

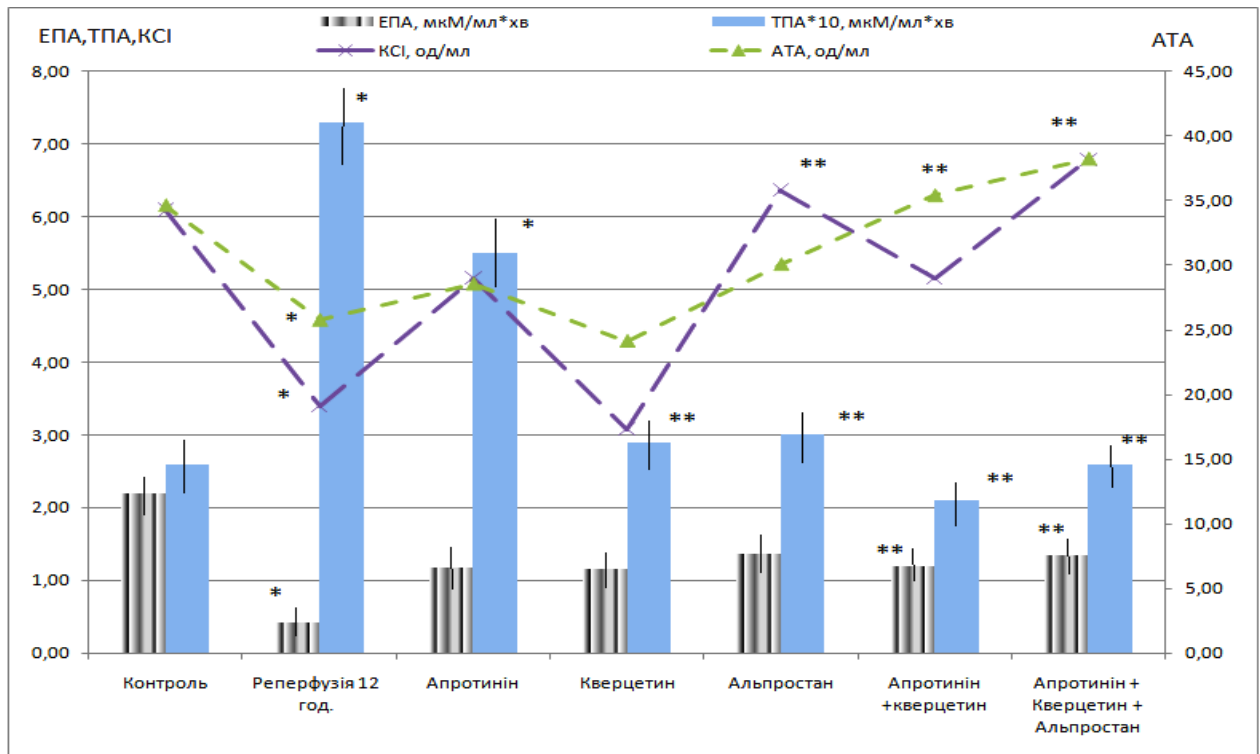


Рис. 8. Зміни у протеїназ-інгібіторній системі сироватки крові щурів при розвитку реперфузійного синдрому на тлі лікування. Зірочками відзначена достовірність ($p < 0,05$): одна зірочка - щодо контролю, дві зірочки - щодо групи реперфузія 12 годин.

Використання кверцетину і аналога простагландину E_1 мало аналогічний вплив на еластазоподібну активність сироватки крові щурів з синдромом ішемії/реперфузії. Поєднане вживання антиоксиданту і інгібітору протеїназ надавало більш виражену, в порівнянні з ізольованим вживанням препаратів, дію, проте рівень ЕПА все ще не досягав значень групи інтактних тварин. Використання потрібної комбінації: антиоксиданту, інгібітору протеїназ і аналогу простагландину було більш ефективним в цьому відношенні.

Вживання гордоксу для корекції РС сприяло зниженню ТПА сироватки крові на 24,7 % ($p < 0,001$) в порівнянні з аналогічним показником групи тварин без лікування, при цьому ТПА активність в 2,1 рази ($p < 0,001$) перевищувала контрольні параметри. Введення кверцетину для патогенетичної корекції вказаного стану викликало істотніше падіння ТПА – на 60,3 % ($p < 0,001$) в порівнянні із значеннями групи тварин без лікування. Використання аналога простагландину E_1 також сприяло нормалізації рівня ТПА сироватки крові: рівень знизився на 58,9% ($p < 0,001$) в порівнянні із значеннями групи тварин без лікування. Найбільш ефективним виявилось поєднане вживання препаратів. Так, використання антиоксиданту і інгібітору протеїназ сприяло зниженню ТПА на 71,2 % ($p < 0,001$) в порівнянні із значеннями групи тварин без лікування. Поєднане вживання антиоксиданту, інгібітору протеїназ і аналогу простагландину E_1 сприяло зниженню

ТПА на 64,8 % ($p < 0,001$) в порівнянні з показником групи нелікованих тварин. При цьому показник ТПА практично не відрізнялася від контрольних значень.

При використанні гордоксу для патогенетичної корекції РС була відмічена тенденція до зростання АТА сироватки крові в порівнянні з показниками нелікованої групи, при цьому АТА була на 10,9 % ($p > 0,5$) нижче за рівень групи інтактних щурів.

При використанні кверцетину антитриптична активність знижувалася трохи і недостовірно. При моделюванні РС на тлі поєднаного використання кверцетину і аprotиніну спостерігалось достовірне зростання АТА на 37,5 % ($p < 0,001$) в порівнянні із значеннями групи без лікування. При цьому рівень АТА був вищий за контрольні значення на 2,2 % ($p > 0,5$). «Потрійна» комбінація: використання антиоксиданту, інгібітору протеїназ і простагландину E_1 супроводжувалося найбільш вираженим збільшенням АТА: на 48,6 % ($p < 0,001$) вище в порівнянні із значеннями групи без лікування; при цьому АТА була вища за значення групи контролю на 10,4 % ($p < 0,05$). Саме ця комбінація також найбільш значно впливала на збільшення рівня КСІ, який в 2 рази ($p < 0,001$) перевищив значення нелікованої групи і був декілька вище за показник групи контролю.

Аналіз динаміки змін протеаз і їх інгібіторів в супернатантах гомогенатов скелетних м'язів виявив аналогічні відмінності ефективності ізольованого введення препаратів патогенетичної корекції і їх поєднань. Профілактичне самостійне та комбіноване застосування протективних посередників для патогенетичної терапії 12-годинного реперфузійного синдрому в супернатантах гомогенатів скелетних м'язів у всіх без виключення групах супроводжувалося статистично достовірним зниженням ЕПА в порівнянні з групою тварин без лікування. Причому використання інгібітору протеїназ сприяло максимальному зниженню ЕПА супернатантів гомогенатів скелетних м'язів, при цьому рівень ЕПА був на 39,5% ($p < 0,001$) нижче аналогічного показника групи тварин без лікування і наблизився до показника контролю. ТПА в скелетних м'язах теж значною мірою пригнічувалася у всіх піддослідних групах.

Застосування інгібітору протеїназ для корекції РС також мало найбільш виражений ефект і викликало зростання АТА в супернатантах гомогенатів скелетних м'язів на 64,7% ($p < 0,001$) порівняно з аналогічним показником групи тварин без лікування. Активність КСІ змінювалася незначно за умов фармакологічної корекції гордоксом, корвітином чи альпростаном порівняно з аналогічним показником групи тварин без лікування.

В той же час комбінація інгібітору протеаз аprotиніну і водорозчинної форми антиоксиданту кверцетину призводила до підвищення активності кислотостійких інгібіторів у 3 рази ($p < 0,001$) у порівнянні з групою без протективної фармакологічної корекції. «Потрійна» терапія застосуванням антиоксиданту, інгібітору протеїназ і аналогу простагландину характеризувалася дещо меншим зростанням КСІ, які у 2,1 рази ($p < 0,001$) були вищі порівняно з аналогічним показником групи тварин без лікування.

Вживання гордоксу, корвітину і алпростану знижувало інтенсивність утворення продуктів вільнорадикального окиснення ліпідів в сироватці крові експериментальних тварин, а також підвищувало антиоксидантний потенціал в гемолізаті і сироватці крові. Так, в ході проведених досліджень було виявлено, що найефективніше пригнічувала збільшену в результаті ішемічно-реперфузійного пошкодження активність вільних радикалів «потрійна» комбінація. ТБК-активні продукти при цьому знижувалися на 34,4 %. Комбіноване використання антиоксиданту, інгібітору протеаз і аналогу простагландину E₁ виявлялося ефективним також відносно впливу на ендогенний антиоксидантний потенціал. Наприклад, вживання вищезгаданої «потрійної» комбінації сприяло нормалізації рівня СОД в крові, значення якої не відрізнялися від параметрів контрольної групи.

Комбіноване вживання антиоксиданту, інгібітору протеїназ і аналогу простагландину виявлялося найбільш ефективним й відносно зниження вільнорадикального окиснення ліпідів в супернатантах гомогенатів скелетних м'язів щурів, яким проводилася патогенетична терапія.

Патогенетична терапія РС викликала значне зростання КПА в супернатантах гомогенатів скелетних м'язів щурів в порівнянні з тваринами без лікування. Найбільш виражений вплив на каталазоподібну активність зробило введення водорозчинної форми кверцетину та введення аналогу простагландину E₁. У супернатантах гомогенатів скелетних м'язів щурів цих груп рівень КПА виріс більше ніж в 3 рази у порівнянні з щурами без лікування і перевищив показник групи інтактних тварин.

Використання інгібітору протеїназ і простагландину для патогенетичної корекції реперфузійного синдрому не привело до істотного впливу на рівень СОД в супернатантах гомогенатів скелетних м'язів щурів. Найбільш виражений ефект був виявлений в групі з «потрійним» застосуванням антиоксиданту, інгібітору протеїназ і аналогу простагландину. Так, рівень супероксиддисмутази в даній групі в 2,1 рази перевищив показник щурів без лікування і на 44,0% показник групи інтактних тварин.

Таким чином, експериментальними дослідженнями встановлено, що комбіноване лікування апротиніном, кверцетином і аналогом простагландину E₁ найбільш виражено сприяє посиленню інгібіторного і антиоксидантного потенціалу в гомогенатах м'язової тканини щурів. Мабуть, одночасний вплив на декілька патофізіологічних механізмів сприяє найбільш ефективному лікуванню наслідків реперфузійного синдрому.

Описана в роботі динаміка біохімічних показників при розвитку реперфузійного синдрому супроводжувалася виразними позитивними змінами морфологічної картини органів. При цьому поєднане застосування кверцетину і апротиніну попереджало виникнення грубих розладів мікроциркуляції та ознак морфологічної альтерації тканин досліджуваних органів (рис. 9).

Електронно-мікроскопічне дослідження показало, що ділянки вираженого міюлізу зустрічалися рідко.

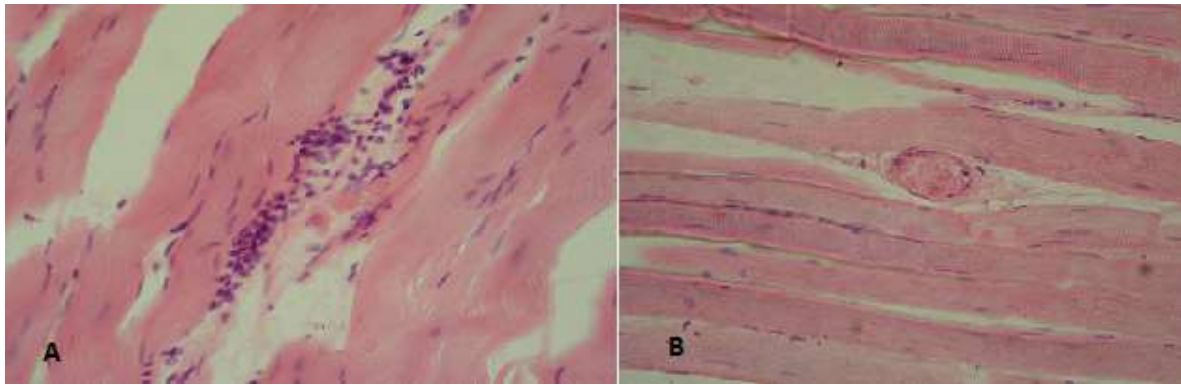


Рис.9 Помірно виражена ділянкова періваскулярна інфільтрація в групі щурів з реперфузією 12 годин при використанні аprotиніну (A) і нормалізація структур клітин і волокон м'язової тканини практично без явищ набряку в групі щурів з реперфузією 12 годин при використанні аprotиніну, кверцетину і аналогу простагландину E1 (B). Забарвлення гематоксиліном та еозином. Зб. x250.

Також відзначалося зниження вираженості проявів набряку, яке супроводжувалося зниженням розволокнення м'язових пучків; поперечна смугастість присутня практично у всіх м'язових клітинах. Відзначалася нормалізація структури ряду мітохондрій. З'являлися в більшій кількості тісно розташовані дрібні округлі електроннощільні мітохондрії з відновленням нормальної структури і паралельності крист, що характерно для відновлення енергетичної функціональної активності клітини (рис. 10).

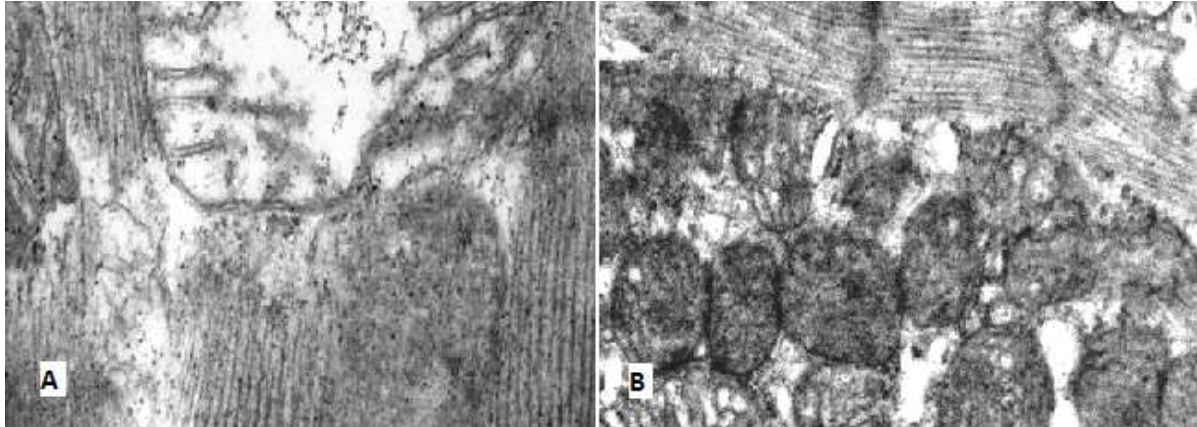


Рис.10. Більш збережена відносно групи з 12 годинною реперфузією структура крист великих мітохондрій в групі щурів з реперфузією 12 годин при використанні кверцетину (A) (Зб. x24000) і дрібні округлі мітохондрії, з тісними контактами і неушкодженими кристами в групі щурів з реперфузією 12 годин при використанні аprotиніну, кверцетину і аналогу простагландину E1 (B) (Зб. x16000)

При вживанні «потрійної» комбінації препаратів знижувалася інтенсивність деструктивних змін, що свідчить про патогенетичну доцільність їх вживання з метою корекції реперфузійного синдрому. В основі механізму органопротекторної дії поєданого вживання вищезгаданих препаратів лежить оптимізація обмінних процесів, поліпшення мікроциркуляції і оксигенації тканин, а також стабілізація біологічних мембран в результаті антипротеазних, антиоксидантних і ендотелій-стабілізуючих властивостей.

ВИСНОВКИ

Агресивна дія радикалів кисню і гіперпротеоліз сприяють порушенню як структури, так і функції органів і тканин при реперфузійних розладах, тому є важливою ланкою патогенезу багатьох критичних станів, що обґрунтовує медико-соціальну значимість проблеми. В останні роки в дослідженнях вивчалася роль протеаз на системному рівні, а дані про окислювально-антиоксидантний і протеїназ-інгібіторний стан на місцевому рівні носять суперечливий характер. Також на даний момент невирішеним залишається питання ефективної патогенетичної терапії реперфузійних розладів. Отже, експериментальне обґрунтування патогенетичних шляхів фармакологічної корекції реперфузійних пошкоджень шляхом вивчення стану процесів перекисного окиснення ліпідів і неспецифічних протеїназ і їх впливу на морфологічні і ультраструктурні зміни скелетної м'язової тканини кінцівок щурів при синдромі ішемії-реперфузії є актуальною проблемою сучасної патологічної фізіології, вирішення якої допоможе правильніше збудувати стратегію лікування з метою підвищення її ефективності.

У дисертаційній роботі вирішена важлива наукова проблема, що полягає у встановленні ролі протеолітичних і вільнорадикальних механізмів у патогенезі розвитку реперфузійного синдрому й експериментальному обґрунтуванні патогенетичних підходів до медикаментозної корекції зазначеної патології за допомогою поєднаного застосування антиоксидантів і інгібіторів протеїназ і аналогів природного простагландину E1.

1. Експериментальне моделювання реперфузійного синдрому супроводжується дисбалансом протеїназ-інгібіторної системи як в гомогенатах скелетних м'язів, так і в сироватці крові. Трипсиноподібна та еластазоподібна активності в супернатантах гомогенатів скелетних м'язів підвищуються відповідно на 62,5 % ($p < 0,001$) і 58,4 % ($p < 0,001$) у порівнянні з контрольними значеннями; при цьому рівень кислотостабільних інгібіторів протеїназ знижується в 2,9 рази ($p < 0,001$). Реперфузійний синдром протягом 12 годин супроводжується підвищенням активності трипсиноподібних протеїназ сироватки крові в 2,8 рази ($p < 0,001$), на тлі зниження рівня антитриптичної активності на 25,7 % ($p < 0,001$) і кислотостабільних інгібіторів протеїназ – на 44,3 % ($p < 0,001$) у порівнянні з контрольною групою.

2. При розвитку ішемічно-реперфузійного ураження в супернатантах гомогенатів скелетних м'язів відбувається підвищення вмісту ТБК-активних продуктів на 61,9 % ($p < 0,001$), пригнічення супероксиддисмутази, каталазоподібної активності – на 31,8 % ($p < 0,001$) і на 52,0 % ($p < 0,001$) нижче у порівнянні з контролем відповідно, на тлі компенсаторного підвищення церулоплазміну. В сироватці крові спостерігається зростання ТБК-активних продуктів в 2,3 рази ($p < 0,001$), зниження активності супероксиддисмутази в гемолізаті на 49,4 % ($p < 0,001$) і підвищення вмісту церулоплазміну на 41,8 % ($p < 0,001$) в порівнянні з контролем.

3. Патоморфологічні зміни скелетних м'язів при реперфузійному синдромі характеризуються порушеннями мікроциркуляції у вигляді повнокрів'я вен, артерій,

судин мікроциркуляторного русла, явищ стазу та сладжу, зникненням поперечної посмугованості м'язових волокон, внутрішньоклітинним набряком, вираженими різною мірою ознаками некрозу, запальною реакцією з переважанням в ексудаті нейтрофільних гранулоцитів. На електронограмах скелетної м'язової тканини визначаються яскраві прояви пошкодження м'язів, разволокністість міофібрил, втрата структури мітохондрій, розриви сарколеми і вакуолізація міофібрил. Ступінь важкості даних змін безпосередньо залежить від тривалості реперфузійного періоду.

4. Застосування кверцетину, апротиніну і аналогу простагландину E₁ для корекції реперфузійного синдрому призводить до зниження активації протеїназ та вільнорадикального окислення як у супернатантах гомогенатів скелетних м'язів, так і в сироватці крові, причому застосування інгібітору протеїназ призводить до більш вираженої нормалізації показників протеолізу, а використання у якості препарату водорозчинної форми кверцетину більшою мірою нормалізує показники вільнорадикального окислення.

5. Фармакологічна корекція поєднаним застосуванням кверцетина, апротиніна і аналога природного простагландину E₁ найбільш ефективно попереджує біохімічне, морфологічне та ультраструктурне пошкодження скелетних м'язів та нормалізує показники сироватки крові при синдромі ішемії/реперфузії. В гомогенатах м'язової тканини трисиноподібна активність знижується на 52,4 % ($p < 0,01$), еластазоподібна – на 32,9 % ($p < 0,001$), рівень ТБК-активних продуктів – на 20,7% у порівнянні з показниками аналогічної групи без корекції. При цьому рівень кислотостабільних інгібіторів протеїназ у супернатантах гомогенатів скелетних м'язів підвищується в 2 рази ($p < 0,001$), каталазоподібна активність – в 2,4 рази ($p < 0,001$), СОД – в 2,1 рази у порівнянні із групою тварин, які не отримували корекції. Комбіноване введення кверцетину, апротиніну і аналогу простагландину E₁ зменшує виразність порушень мікроциркуляції, стазу, сладжу і виражених дистрофічних змін в скелетній м'язовій тканині, що дозволяє рекомендувати подальше вивчення та клінічне обґрунтування для впровадження у практику охорони здоров'я.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Кубишкін А.В. Зміна активності неспецифічних протеїназ та їх інгібіторів у гомогенатах м'язів щурів при реперфузійному синдромі нижньої кінцівки за умов комбінованої дії кверцетину, апротиніну та альпростану / А.В. Кубишкін, **О.А. Мальченко**, Ю.В. Мандрик // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. – 2013. – № 4. – С. 12-19. *(Дисертантом особисто проведені біохімічні дослідження, статистична обробка матеріалу, аналіз результатів)*.
2. **Мальченко О.А.** Изменения в мышечной ткани задней конечности крыс в разные сроки формирования синдрома ишемии-реперфузии / **О.А. Мальченко**, А.В. Кубышкин, Л.В. Анисимова [и др.] // Таврический медико-биологический вестник. – 2012. – Т. 15, № 3, ч.1 (59). – С.207-210. *(Дисертантом особисто проведені біохімічні дослідження, статистична обробка матеріалу, аналіз результатів)*.

3. Федосов М.И. Сочетанное применение аналогов естественного простагландина E1, ингибиторов протеолиза и антиоксидантов для медикаментозной коррекции экспериментального реперфузионного синдрома / М.И. Федосов, **О.А. Мальченко**, А.В. Кубышкин, А.А. Бабанин, Н.Ю. Пылаева // Актуальные проблемы транспортной медицины. -2013.- Т.2.- № 2.- 84-89. *(Дисертантом особисто проведені біохімічні дослідження, статистична обробка матеріалу, аналіз результатів).*
4. **Мальченко О.А.**, Анисимова Л.В., Кубышкин А.В., Харченко В.З. Состояние неспецифических протеиназ и их ингибиторов в сыворотке крови и мышечной ткани крыс при экспериментальном реперфузионном синдроме // Актуальные проблемы транспортной медицины.-2014.-Т.2, №2.-С.30-36. *(Дисертантом особисто проведені біохімічні дослідження, статистична обробка матеріалу, аналіз результатів).*
5. **Мальченко О.А.**, Анисимова Л.В., Кубышкин А.В. Изменение активности неспецифических протеиназ и их ингибиторов в мышечной ткани крыс при экспериментальном реперфузионном синдроме//Вісник морфології.-2014.- Т.20,№2.-С.388-391.*(Дисертантом особисто проведені біохімічні дослідження, статистична обробка матеріалу, аналіз результатів).*
6. **Мальченко О.А.**, Анисимова Л.В., Федосов М.И., Кубышкин А.В. Состояние прооксидантно-антиоксидантной системы крови и мышечной ткани крыс при экспериментальном реперфузионном синдроме // Таврический медико-биологический вестник.-2014.-№2.-с.90-93. *(Дисертантом особисто проведені біохімічні дослідження, статистична обробка матеріалу, аналіз результатів).*
7. **Мальченко О.А.** Состояние процессов перекисного окисления липидов и антиоксидантов в скелетных мышцах крыс при фармакологической коррекции экспериментального реперфузионного синдрома/ **О.А. Мальченко**, А.В. Кубышкин, В.З. Харченко, Ю.В. Мандрык // Вестник КазНМУ.-2013.-№ 5 (1).- С.158-162. *(Дисертантом особисто проведені біохімічні дослідження, статистична обробка матеріалу, аналіз результатів).*

Тези доповідей:

8. Ганиева А. Б. Состояние окислительно-антиоксидантного гомеостаза в экстрактах мышечной ткани при моделировании реперфузионного синдрома и его коррекция /А.Б. Ганиева, **О.А. Мальченко**, П.А. Шалин, М.И. Федосов, И.И. Фомочкина // Теоретические и практические аспекты современной медицины: Материалы 84-й международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых, 21-23 марта 2012. - Симферополь.- С. 122. *(Дисертантом особисто проведені біохімічні дослідження стану окислювально-антиоксидантного гомеостазу, статистична обробка матеріалу).*
9. Kubyshkin A., Fomochkina I., Kharchenko V., Fedosov M., **Malchenko O.**, Zhukova A. Pathogenic interaction in shock and systemic inflammatory response syndrome // *International Society for Pathophysiology. 7th International Congress of Pathophysiology* (4-7 September, 2014). Rabat –Morocco.– P.66-

67(Дисертантом особисто проведені біохімічні дослідження, статистична обробка матеріалу, аналіз результатів).

10. Kubyshkin A.V., **Malchenko O.A.**, Borovskaya A.I., Kharchenko V.Z. Nonspecific proteinase-inhibitory system as a diagnostic and prognostic marker of the multiple organ dysfunction syndrome // *International Society for Pathophysiology. 7th International Congress of Pathophysiology (4-7 September, 2014). Rabat – Morocco.* – P.107 (Дисертантом особисто проведені біохімічні дослідження, статистична обробка матеріалу, аналіз результатів).
11. **Мальченко О.А.**, Анисимова Л.В., Кубышкин А.В. Процессы протеолиза и состояние антиоксидантов сыворотки крови и мышечной ткани при экспериментальном реперфузионном синдроме // *XIII-е чтения В.В. Подвысоцкого: Бюллетень материалов научной конференции (19-20 июня 2014 года).* – Одесса: УкрНИИ медицины транспорта. - 2014.-С.164.

АНОТАЦІЇ

Мальченко О. А. Патогенетичне обґрунтування підходів до корекції пошкоджень тканин кінцівки при експериментальному реперфузійному синдромі – Рукопис. Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.03.04 – патологічна фізіологія. –2016.

Дисертація присвячена проблемі встановлення ролі протеолітичних і вільнорадикальних механізмів у патогенезі розвитку реперфузійного синдрому й експериментального обґрунтування патогенетичних підходів до медикаментозної корекції зазначеної патології за допомогою поєднаного застосування антиоксидантів і інгібіторів протеїназ і аналогів природного простагландину E₁. На підставі результатів експериментальних досліджень визначені ключові патогенетичні протеолітичні і вільнорадикальні механізми розвитку місцевого пошкодження м'язової тканини при експериментальному синдромі ішемії/реперфузії, та виявлено їх вплив на ультраструктурні зміни в ушкодженій ділянці. Встановлено, що фармакологічна корекція поєднаним застосуванням кверцетина, апротиніна і аналога природного простагландину E₁ попереджує біохімічне, морфологічне та ультраструктурне пошкодження скелетних м'язів при синдромі ішемії/реперфузії.

Ключові слова: реперфузійний синдром, ішемія, протеїназ-інгібіторна система, вільнорадикальне окиснення ліпідів.

Мальченко О. А. Патогенетическое обоснование подходов к коррекции повреждений тканей конечности при экспериментальном реперфузионном синдроме. – Рукопись. Диссертация на соискание научной степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.04 – патологическая физиология. – 2016.

Диссертация посвящена проблеме установления роли протеолитических и свободнорадикальных механизмов в патогенезе развития реперфузионного синдрома и экспериментального обоснования патогенетических подходов к его медикаментозной коррекции с помощью сочетанного применения антиоксидантов, ингибиторов протеиназ и аналогов естественного простагландина E₁.

Экспериментальными исследованиями, проведенными на 116 белых крысах-самцах линии Wistar, установлено, что развитие реперфузионного синдрома сопровождается активацией свободнорадикального окисления липидов и

ограниченного протеолиза в супернатантах гомогенатов скелетных мышц, на фоне снижения в них активности ингибиторов протеиназ и антиоксидантного потенциала. Максимальные изменения в мышечной ткани развиваются к 12-24 часам развития реперфузии и сопровождаются активацией неспецифических протеиназ и снижением их ингибиторов в сыворотке крови. Реперфузионные нарушения в мышечной ткани проявляются исчезновением поперечной исчерченности мышечных волокон, внутриклеточным отеком, выраженными в разной степени признаками некроза, воспалительной реакцией с преобладанием в экссудате нейтрофильных гранулоцитов. На ультраструктурном уровне выявлены признаки выраженного миолиза и нарушения структуры митохондрий. Морфологические и ультраструктурные изменения нарастают по мере увеличения сроков реперфузии.

Доказана эффективность применения водорастворимой формы кверцетина, ингибитора протеиназ аprotинина и аналога естественного простагландина E₁ для коррекции метаболических изменений при развитии реперфузионного синдрома, что подтверждается снижением уровня вторичных продуктов ПОЛ и увеличением уровня эндогенных антиоксидантов, снижением протеолитической активности и увеличением уровня ингибиторов протеиназ в мышечной ткани и в крови. Наибольшая эффективность выявлена при сочетанном применении препаратов, которое приводило к нормализации показателей протеолиза и ПОЛ, уменьшению морфологических и ультраструктурных изменений в мышечной ткани из очага ишемии/реперфузии. Показана перспективность изучения клинической эффективности их сочетанного применения при синдроме ишемии-реперфузии.

Полученные результаты позволяют расширить представления о роли протеиназ, их ингибиторов и процессов перекисного окисления липидов в патогенезе синдрома ишемии/реперфузии

Ключевые слова: реперфузионный синдром, ишемия, протеиназ-ингибиторная система, свободнорадикальное окисление липидов.

Malchenko O. A. Pathogenetic substantiation of approaches for correcting damaged tissues in experimental lower-limb ischemia-reperfusion syndrome. – Manuscript. Thesis for the degree of candidate of medical sciences in speciality 14.03.04 – pathological physiology. –2016.

The thesis is devoted to the problem of establishment of the role of proteolytic and free radical oxidation mechanisms in pathogenesis of reperfusion syndrome and experimental approaches to study the pathogenesis of medicine correction of this pathology by combined use of antioxidants, protease inhibitors and natural analogues of prostaglandin E₁. The key pathogenetic proteolytic and free radical mechanisms of development of local muscle damage at experimental ischemic/reperfusion syndrome injury and their influence on the ultrastructural changes in the damaged area were revealed based on the results of experimental investigations. The pharmacological preconditioning by combined use of quercetin, aprotinin and natural analogue of prostaglandin E₁ prevents biochemical, morphological and ultrastructural damage of skeletal muscle at ischemia/reperfusion syndrome.

Keywords: reperfusion syndrome, ischemia, proteinase-inhibitory system, free radical oxidation of lipids.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АТА	– антитриптична активність
ВАЕЕ	– N-бензоіл-L-аргінину етилового ефіру
БАР	– біологічно-активні речовини
БАС	– бронхоальвеолярний секрет
ВРО	– вільнорадикальне окиснення ліпідів
ДВЗ	– дисеміноване внутрішньосудинне згортання
ЕПА	– еластазоподібна активність
КЮ	– калікреїнінактивуюча одиниця
КПА	– каталазоподібна активність
КСІ	– кислотостабільні інгібітори
ПГЕ ₁	– простагландин Е ₁
ПОЛ	– перекисне окиснення ліпідів
РС	– реперфузійний синдром
СОД	– супероксиддисмутаза
СПОН	– синдром поліогранної недостатності
ТБК-АП	– продукти, що реагують з тіобарбітуровою кислотою
ТПА	– трипсиноподібна активність
ЦП	– церулоплазмін