

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
КРИМСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ С. І. ГЕОРГІЄВСЬКОГО**

На правах рукопису

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

**Дисертація на здобуття наукового ступеня
кандидата медичних наук**

Науковий керівник
Кубишкін Анатолій Володимирович,
д. мед. н., професор

Сімферополь — 2015

ЗМІСТ

| | |
|---|----|
| ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ..... | 4 |
| ВСТУП..... | 5 |
| РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ..... | 13 |
| 1.1. Сучасні концепції розуміння синдрому ішемії/реперфузії..... | 13 |
| 1.2. Цитопротективне моделювання при синдромі ішемії/реперфузії кінцівки..... | 18 |
| 1.3. Біофлавоноїди та їх вплив на патогенез синдрому ішемії/реперфузії..... | 24 |
| 1.4. Інгібітори протеолізу та їх роль в умовах ішемії/реперфузії..... | 28 |
| РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ..... | 34 |
| 2.1. Загальна характеристика експериментального матеріалу..... | 34 |
| 2.2. Модель синдрому ішемії / реперфузії. Структура та обсяги досліджень | 34 |
| 2.3. Методи досліджень..... | 38 |
| 2.3.1. Методи визначення показників вільно радикального окислення ліпідів і антиоксидантів | 38 |
| 2.3.2. Методи вивчення стану протеїназ-інгібіторної системи..... | 39 |
| 2.3.3 Забір і обробка матеріалу для світлової та електронної мікроскопії | 42 |
| 2.3.4. Статистична обробка результатів..... | 43 |
| РОЗДІЛ 3. ПАТОФІЗІОЛОГІЧНІ МЕХАНІЗМИ, ЩО ОБУМОВЛЮЮТЬ МОРФОЛОГІЧНІ УРАЖЕННЯ СКЕЛЕТНИХ М'ЯЗІВ ПРИ ІШЕМІЇ/РЕПЕРФУЗІЇ..... | 44 |
| 3.1. Поведінкові реакції експериментальних крис при синдромі ішемії/реперфузії | 44 |
| 3.2. Стан протеїназ-інгібіторної системи сироватки крові і гомогенатів м'язів при ішемії/реперфузії скелетних м'язів..... | 46 |
| 3.3. Стан прооксидантно-антиоксидантної системи крові та гомогенатів м'язів щурів при ішемії/реперфузії скелетних м'язів..... | 53 |

| | |
|--|-----|
| 3.4. Характер патоморфологічних та ультраструктурних змін скелетних м'язів при синдромі ішемії/реперфузії..... | 60 |
| РОЗДІЛ 4. ОСОБЛИВОСТІ МОДИФИКАЦІЇ ПАТОФІЗІОЛОГІЧНИХ МЕХАНІЗМІВ ПРИ СИНДРОМІ ІШЕМІЇ/РЕПЕРФУЗІЇ ШЛЯХОМ ФАРМАКОЛОГІЧНОЇ КОРЕКЦІЇ..... | 75 |
| 4.1 Патофізіологічні зміни процесів протеолізу у скелетних м'язах та плазмі крові при синдромі ішемії/реперфузії в умовах застосування кверцетину, апротиніну, простагландину E1 та їх комбінованої дії... | 76 |
| 4.2. Стан вільнорадикального окислення ліпідів крові та гомогенатів м'язів при моделюванні синдрому ішемії/реперфузії, на тлі медикаментозної корекції..... | 85 |
| 4.3. Характер патоморфологічних та ультраструктурних змін скелетних м'язів при синдромі ішемії/реперфузії в умовах застосування кверцетину, апротиніну, простагландину E1 та їх комбінованої дії..... | 91 |
| РОЗДІЛ 5. АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ | 102 |
| ВИСНОВКИ..... | 123 |
| СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ..... | 126 |

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

| | |
|------------------|--|
| АТА | – антитриптична активність |
| АОЗ | – антиоксидантний захист |
| БАЕЕ | – N-бензоіл-L-аргінину етилового ефіру |
| БАР | – біологічно-активні речовини |
| БАС | – бронхоальвеолярний секрет |
| ВРО | – вільнорадикальне окиснення ліпідів |
| ДВЗ | – дисеміноване внутрішньосудинне згортання |
| ЕПА | – еластазоподібна активність |
| КІО | – калікреїнінактивуюча одиниця |
| КПА | – каталазоподібна активність |
| КСІ | – кислотостабільні інгібітори протеїназ |
| МДА | – малоновий діальдегід |
| ОС | – оксидативний стрес |
| ПГЕ ₁ | – простагландин Е ₁ |
| ПОЛ | – перекисне окиснення ліпідів |
| РС | – реперфузійний синдром |
| РНК | – рибонуклеїнова кислота |
| СОД | – супероксиддисмутаза |
| СПОН | – синдром полігранної недостатності |
| ССЗР | – синдром системної запальної реакції |
| ТБК | – тіобарбітурова кислота |
| ТБК-АП | – ТБК-активні продукти |
| ТПА | – трипсиноподібна активність |
| ЦП | – церулоплазмін |
| ІЛ | – інтерлейкін |
| NO | – оксид азоту |

ВСТУП

Актуальність теми

Актуальність теми. Реперфузійний синдром, що супроводжується пошкодженням м'язової тканини, досить часто зустрічається при інфаркті міокарда [1], хірургії серця та судин, трансплантації [2,3], реіплантації кінцівок та ряді інших станів [4]. Причому реперфузійне пошкодження кінцівок є одним з найпоширеніших гострих патологічних станів, що розвиваються при порушенні периферичного кровообігу [5,6]. Особливо яскраво реперфузійний синдром проявляється в тих випадках, коли ішемії-реперфузії піддається м'язова тканина, що пов'язано з високою чутливістю м'язів до гіпоксії [7]. Ключовим патогенетичною ланкою при розвитку реперфузійного синдрому вважаються зміни, що відбуваються в ішемізованих тканинах зі зростанням тяжкості наслідків ішемії після відновлення кровообігу і подальшим розвитком запалення і рабдоміолізу [8,9]. Подальший розвиток системних ускладнень, включаючи формування важкої поліорганної недостатності, нерідко резистентної до існуючих методів лікування, призводить до збільшення летальності [3].

Пошкодження тканин при ішемії розвивається переважно через виснаження енергетичних депо і накопичення лактату в екстрацелюлярному просторі, а реоксигенація парадоксально викликає пошкодження тканин через формування кисневих радикалів, вивільнення прозапальних медіаторів і активацію поліморфоядерних лейкоцитів [10]. Поза судинного русла лейкоцити індукують пряме пошкодження клітин через вивільнення оксидантів і гідролітичних ферментів [11]. Причому активація вільнорадикального окислення вважається одним з ключових механізмів як місцевого пошкодження тканин після їх реперфузії, так і впливу на формування системних ускладнень, що включають розвиток органопатології з формуванням синдрому поліорганної недостатності (СПОН) [12].

Іншим найбільш істотним фактором тканинного і клітинного ушкодження при гіпоксії-реперфузії вважаються неспецифічні протеїнази. Надлишкова активація протеїназ є важливою патогенетичною ланкою у розвитку ряду деструктивних і запальних реакцій організму. Стан неспецифічних протеїназ та їх інгібіторів може робити істотний вплив на пошкодження м'язової тканини при реперфузійному синдромі, а отже і на розвиток системних ускладнень [13].

В даний час виділяють два рівня ускладнень, виникаючих після відновленням кровообігу в раніше ішемізованих органах і тканинах: місцевий, в результаті якого посилюється місцеве пошкодження, і системний, що виявляється активацією і накопиченням прозапальних факторів і метаболітів у крові і формуванням вторинної недостатності органів і тканин, віддалених від ішемізованих. Слід зазначити, що якщо вивченню системного рівня ускладнень приділяється досить багато уваги [14], то місцеві зміни, від яких у першу чергу залежить характер і ступінь вираженості ускладнень, вивчаються набагато менш інтенсивно [15]. Нечисленні дослідження присвячені вивченню місцевої реакції тканин, залучених до реперфузійного пошкодження, присвячені в основному пошуку варіантів їх протекції [3,11].

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.

Відомо, що інгібітори протеолізу здатні знижувати протеолітичну активність, блокувати деякі ланки калікреїн-кінінової системи, володіють антифібринолітичним і гемостатичним ефектами [16]. Антиоксиданти, часто використовувані в кардіологічній, неврологічній і ангіохірургічній практиці, здатні впливати на активність різних ферментів, які беруть участь у деградації фосфоліпідів, що впливають на вільнорадикальні процеси і відповідають за біосинтез в клітинах оксиду азоту, протеїназ та ін. [17-20].

Препарати з групи простагландинів, застосовувані, в основному, в ангіо- і кардіохірургічній практиці, мають вазодилатуючі, ендотелій-стабілізуючі і дезагрегантну властивість [21]. Однак, зазначені препарати застосовуються обмежено лише при деяких клінічних ситуаціях. На сьогоднішній день не існує «золотих» стандартів фармакологічної корекції, а в літературі немає однозначних відповідей на запитання, як адекватно захистити тканини від реперфузійного ураження. Не визначеним залишається характер патофізіологічних та морфологічних змін у кінцівці при профілактичному використанні інгібітора протеолізу апротініну та антиоксиданту на основі кверцитину. Відкритим залишається питання, на скільки ефективно можливе використання аналогів простагландіну E1 для ангіопротекції при реперфузійному синдромі. Не з'ясовані місцеві цитопротективні механізми спільного використання флавоноїда кверцетину, інгібітора протеолізу апротініну та аналогів простагландіну E1 при синдромі ішемії/реперфузії і можливість зменшення системних реакцій при блокуванні місцевих ланок патогенезу.

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 перекісного 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 поєднанням 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 E_1), 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 тканині 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

Е₁. 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.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Сучасні концепції розуміння синдрому ішемії/реперфузії

Гостра ішемія з реперфузією, викликана емболізацією чи тромбозом артерії, застосуванням судинного турнікету в якості першої допомоги при травмі для зменшення крововтрати чи при хірургічних втручаннях на кінцівках для покращення візуалізації тканин («безкровне хірургічне поле»), реімплантацією частин кінцівки чи вільною пересадкою тканин, зустрічається досить часто. При цьому виникають пошкодження на місцевому та системному рівнях, важкість яких пов'язана з тривалістю ішемії та наслідками реперфузії. Реперфузійні симптоми, зумовлені каскадом метаболічних порушень, можуть проявлятися як транзиторними симптомами в кінцівках, так і системним запаленням з поліорганною недостатністю [22]. Патофізіологічні та патоморфологічні дослідження показують, що незворотні зміни в м'язових клітинах починаються після 3 годин ішемії, а майже цілковитий некроз – через 6 годин [23,24]. Реперфузія після транзиторної ішемії покликана зберегти цілісність тканин. Відновлення кровоплину не завжди призводить до реоксигенації ішемізованих тканин, а частіше до неспроможності мікроциркуляції до реперфузії, а відтак, до пролонгації ішемії [25,26]. Так, в умовах відтвореної ішемії/реперфузії (72 год.) в експерименті на кролях, реперфузія призводила до набряку м'язів та підвищення тиску у передньому м'язовому футлярі гомілки у 4,5 рази [27]. Це зумовлює місцеві зміни у скелетних м'язах і віддалених органах через підвищення проникності судин та крововиливи [26].

В той час як ішемія пошкоджує тканини переважно через виснаження енергетичних депо, зокрема концентрації глюкози, та накопичення лактату в екстрацелюлярному просторі [10], реоксигенація парадоксально викликає пошкодження тканин через формування кисневих радикалів, вивільнення прозапальних медіаторів та активацію циркулюючих поліморфоядерних

лейкоцитів. Поза судинним руслом лейкоцити індукують пряме пошкодження клітин через вивільнення оксидантів та гідролітичних ферментів. Зокрема показано, що продукція вільних радикалів та еластази поліморфоядерними нейтрофілами може бути пригнічена з використанням субстанції з антиоксидантними властивостями [28]. Крім того, виявлено, що використання субстанцій, спроможних пригнічувати активацію вільних радикалів, призводить до зменшення накопичення нейтрофілів і TNF- α в міокарді при ішемії/реперфузії [29].

Крім того, у тварин з відтвореним в експерименті синдромом ішемії/реперфузії достовірно суттєво підвищується концентрація малонового діальдигіду (МДА), супероксид-радикалу [30] та відмічається зростання мієлопероксидази [31], знижується загальний антиоксидантний захист [32], активність супероксиддисмутази (СОД) [33], каталази, глутатіон пероксидази [10,34], а також концентрація глутатіону [35] у плазмі крові та гомогенатах скелетних м'язів, тканинах печінки, серця і легень у порівнянні з групою інтактних тварин. Оксидативний стрес (ОС) внаслідок ішемії/реперфузії є особливо вираженим при цукровому діабеті [36]. Пік росту біомаркерів, індукованих двогодинною ішемією, припадає на 8 годину від початку реперфузії, а повернення величин до вихідного рівня відбувається через 24 години [37]. Достовірна кореляція була виявлена між рівнем МДА у сироватці крові та потенціалом спокою скелетних м'язів [36].

Суттєва роль у розвитку мітохондріальної дисфункції та інфаркту *m. gastrocnemicus* належить супероксид-радикалу, як було показано в експериментах на мишах. Ішемія/реперфузія (3/4 години) викликала інфаркти у близько 40 % м'язової тканини та призводила до порушення комплексів (I, II, III та IV) мітохондріального електронного транспорту [38]. При цьому продукція супероксид-радикалу зростала, а активність магній-залежної супероксиддисмутази (мітохондріальної ізоформи СОД) знижувалася у порівнянні з контролем. Застосування СОД-міметичної субстанції темполу (50 мг/кг) та коензиму Q (50 мг/кг) не лише зменшувало продукцію

супероксид-радикалу, але й розмір м'язових некрозів [39]. Співзвучні результати одержані і французькими вченими, котрі показали зниження концентрації сукцинату у скелетних м'язах на 56% та TMPD-аскорбату на 25% у порівнянні з контрольними тваринами, що дозволяє стверджувати про значні пошкодження комплексів I, II, IV мітохондріального дихального ланцюга. При цьому загальний антиоксидантний захист литкового м'язу при ішемії/реперфузії (5/1 години) знижувався на 46 % [38]. СОД пригнічує активність вільних радикалів та адгезивних молекул, а отже і запобігає ішемічно/реперфузійним пошкодженням [31]. На експериментальній моделі задньої кінцівки щурів було випробувано модифікації СОД та досліджено їх цитопротективні властивості при ішемії/реперфузії. Порівнюючи нативну СОД, монометоксиполіетиленгліколь-СОД, поліакрилморфолін-СОД було показано, що за параметрами життєздатності кінцівки та гістоморфологічними змінами монометоксиполіетиленгліколь-СОД переважає природній та інші модифікації ферменту [40].

Вважається, що ішемія реперфузія скелетних м'язів в результаті пошкодження тканини може бути пусковим механізмом розвитку запалення, в розвитку якого визначну роль грають активовані лейкоцити [41,42]. Хоча відновлення кровопостачання має важливе значення у зменшенні ішемічних пошкоджень, реперфузія ініціює серію комплексних реакцій, що ведуть до акумуляції нейтрофілів, порушення мікроциркуляційного бар'єру та набряку. Кисневі вільні радикали, що утворюються ксантиноксидазою та іншими ліпооксигеназами, зумовлюють формування прозапальних адгезивних молекул, які прикріплюються до поверхні лейкоцитів та ендотелію судин. Внаслідок цього лейкоцити починають формувати адгезивні містки з ендотелієм посткапілярних венул за допомогою Е-селектину та β_2 інтегринів за участю лейкоцитарних (CD11a/CD18, CD11b/CD18) та ендотеліальних (ICAM, GMP-140) адгезивних рецепторів [41]. Китайськими вченими було продемонстровано, що експресія CD11b/CD18 та ICAM достовірно корелює з ішемічно/реперфузійним ушкодженням м'язів [31]. Адгезія нейтрофілів є

пропорційною тривалості реперфузії і супроводжується виснаженням комплементу, зростанням концентрації IL-1 та IL-6 [32]. Використовуючи селективні антитіла було показано підвищення концентрації та пошкоджуючий вплив TNF α на ендотелій судин, а застосування антагоністів рецепторів до тромбоксану A₂ (GR32191) чи лейкотрієну B₄ (SC41930) супроводжувалося повним збереженням життєздатності м'язів кінцівки та зниженням ступеня набряку ураженої кінцівки при дії останнього у тварин з ішемією/реперфузією (6/4 години) задньої кінцівки [42].

Якщо прозапальні сигнали є достатніми, лейкоцити щільно злипаються з ендотелієм і можуть проникати в периваскулярний простір шляхом діapedезу. Порушуючи мікроциркуляторний бар'єр, міграція лейкоцитів призводить до посилення капілярної проникності та транскапілярної фільтрації рідини. Набряк, що виникає, в свою чергу знижує перфузію і призводить до розвитку феномену неспроможності реперфузії після відновлення кровопостачання [26]. «No-reflow»-феномен, як його ще називають, характеризується звуженням діаметру мікросудин, інфільтрацією мікроциркуляторного русла нейтрофілами, що в сукупності призводять до зниження швидкості кровотоку [43,44]. Іншими дослідниками в експерименті на щурах показано, що через 10 хв. після початку реперфузії, якій передувала 6 годинна ішемія кінцівки, швидкість кровоплину знизилася до 10 % , через 120 хв. - до 30 %, а через 240 хв. - до 50,0 % у порівнянні з швидкістю кровоплину у литковому м'язі контралатеральної кінцівки [45]. Про незаперечну роль лейкоцитарної ланки у синдромі ішемії/реперфузії свідчить той факт, що антинейтрофільна сироватка та інгібітор еластази елафін достовірно знижували міграцію нейтрофілів та запобігали некротичним змінам м'язів після 6 годинної ішемії з подальшою 4 годинною реперфузією у щурів [46].

Важлива роль у розвитку ішемії/реперфузії може належати оксиду азоту, хоча його значення для розвитку патологічних змін розглядається з різних точок зору. Неоднозначність у трактуванні ролі оксиду азоту (II) в

патогенетичних механізмах при ішемії/реперфузії полягає у різновекторних змінах його концентрації у різних органах та тканинах та контраверсійних повідомленнях у літературі. Так, група дослідників вказує на підвищення рівня NO в печінці, легенях та в сироватці крові, тоді як в м'язах його концентрація залишається без змін [34,47]. Інші відмічають підвищення рівня оксиду азоту (II) як у плазмі, так і в м'язовій тканині [44,48,49]. Формування та прикріплення адгезивних молекул на поверхні ендотелію суттєво зменшує біодоступність та біологічний ефект оксиду азоту (II) [50,51].

В дослідях з моделюванням синдрому ішемії/реперфузії задньої кінцівки у щурів автори пов'язують пошкодження судин з препаратами L-аргініну, в той час як його антагоністи демонстрували протективний ефект [52]. Надмірно велика кількість NO, що продукується iNO-синтетазою, може пошкоджувати клітини та викликати апоптоз. Хоча у зразках м'язової тканини методом ланцюгової полімеразної реакції не було виявлено mRNA NO-синтази після зняття турнікету, preconditionування блокаторами NO-синтази призводило до зменшення утворення кисневих радикалів у скелетних м'язах [53]. В експериментах Cowled P.A. та ін. (2008) [54] інгібітор NO-синтази N-іміно-L-орнітин введений перед індукованою шестигдинною ішемією та подальшою чотирьохгодинною реперфузією суттєво пригнічував інфільтрацію нейтрофілів у скелетних м'язах, легенях і нирках та лише у м'язовій тканині запобігав деградації колагену IV [54,55].

Іншими дослідниками було показано, що призначення L-аргініну в дозі 500 мг/кг перорально впродовж 5 днів в умовах модельованої ішемії/реперфузії призводить до суттєвого підвищення концентрації NO, загального рівня антиоксидантного захисту і зменшення ПОЛ у порівнянні з плацебо. Одночасне вживання блокатора NO-синтази L-NAME у дозі 75 мг/кг впродовж 5 днів нівелювало феномен L-аргініну [56]. Інший блокатор NO-синтази L-NMMA суттєво знижував кровоплин скелетних м'язів, що достовірно не покращувався за умов комбінованого застосування з S-нітроглутатионом та СОД. В цих же експериментах контрактильна функція

литкових м'язів лише у групі L-NMMA+СОД була достовірно вищою у порівнянні з плацебо [57]. Співзвучні результати одержані Stoffels et al. (2007) у дослідях на щурах лінії Вістар, де рівень оксиду азоту (II) не змінювався незалежно від концентрації супероксид радикалу, вміст якого ефективно знижувався епігалокатехін-3-галатом (1.5 мкмоль/кг) відомим «скавенджером» вільних радикалів [30].

1.2. Цитопротективне моделювання при синдромі ішемії/реперфузії кінцівки

Цілий ряд клітинних та ферментативних механізмів покликані нівелювати чи пом'якшити наслідки реперфузійного пошкодження тканинних структур, однак значна кількість питань остається не вирішеними [58,59]. Ішемічне прекодиціонування, що передбачає короткі періоди ішемії перед тривалою постійною ішемією, дозволяє викликати мобілізацію захисних тканинних механізмів для попередження пошкоджень викликаних ішемією/реперфузією. Три десятихвилинні цикли ішемії з десяти хвилинними перервами між ними здатні суттєво покращити мікроциркуляцію, зменшити запальну відповідь клітин та кількість відмерлих клітин при синдромі ішемії/реперфузії задньої кінцівки щурів [60]. Цікаво, що транзиторна ішемія, як нижньої кінцівки, так і серця, в експерименті на щурах лінії Вістар, проявляла однаковий захист серцевого м'язу від ішемії/реперфузії. Обидві групи демонстрували статистично достовірне зниження активності креатинфосфокінази та тропоніну I, зростання активності СОД та зменшення ділянки інфаркту після реперфузії у порівнянні з групою тварин, де ішемічне прекодиціонування не застосовувалося [61]. Німецькі дослідники показали значення та важливу роль оксиду азоту (II) у цьому феномені, оскільки застосування донорів NO перед моделюванням ішемії відтворювало ефект ішемічного прекодиціонування, в той час як неспецифічний блокатор синтезу NO L-

NAME нівелював цитопротективний ефект ішемічного прекодиціонування. При цьому екзогенне введення NO не забезпечує відповідного захисту тканин, якщо синтез ендogenous оксиду азоту (II) є заблокованим [62]. Короткі періоди ішемії нижньої кінцівки, як було показано на свинях, проявляють захисну дію і на тканину головного мозку в умовах повної зупинки кровообігу та гіпотермії 18 °С. При цьому у дослідній групі концентрація лактату була нижчою, а відновлення електроенцефалографічної активності та неврологічної функції спостерігалось швидше у порівнянні з контролем. Гістолопатологічний аналіз зрізів головного мозку показав зменшення уражень з 5,8 до 1,5 балів за шкалою пошкоджень у тварин з віддаленим ішемічним прекодиціонуванням [63]. В інших експериментах, прекодиціонування тепловим стресом проявляло цитопротективний ефект через підвищення активності супероксиддисмутази та зниження концентрації МДА [33].

Слід зазначити, що в основі патогенезу синдрому ішемії/реперфузії та багатьох інших захворювань лежить оксидативний стрес. Тому проводиться пошук найбільш активних та найменш токсичних антиоксидантів для підвищення ефективності профілактики та лікування синдрому ішемії/реперфузії. В умовах модельованої ішемії/реперфузії (2-1,5 години) шляхом накладання затискача на стегнову артерію у щурів було показано антиоксидантний цитопротективний ефект мелатоніну. Прекодиціонування з останнім призводило до зниження активності СОД, глутатіонпероксидази та каталази, індукованих реперфузією, а також рівня МДА, оксиду азоту (II) у порівнянні з групою інтактних тварин [49]. Для створення більш потужного фармакологічного середника для попередження пошкоджень при ішемії/реперфузії, вчені з'єднали протизапальну частку (похідне 1,3-дигідроксану) з ключовою часткою мелатоніну. Нове похідне індолу проявляло виражену протизапальну дію та посилювало захист скелетних м'язів і пошкоджень легень пов'язаних з ішемією/реперфузією кінцівки [64].

Прекондиціонування L-карнітином чи натрію аскорбатом відразу перед реперфузією достовірно зменшувало сегментарний некроз, зміну діаметру м'язових волокон та централізацію клітинного ядра камбаловидного м'язу у порівнянні з плацебо та контрольною групами кролів в умовах ішемії/реперфузії (42 години), а L-карнітин мав певну перевагу над аскорбіною кислотою за параметрами фіброзу та зміни діаметру м'язових волокон, що досліджувалися світловою мікроскопією [65].

Аспартат цинку на моделі ішемії/реперфузії (3-24 години) знижував вміст МДА, підвищував активність СОД, каталази та концентрацію глутатіону в гомогенаті литкового м'язу, при цьому значно збільшувалося життєздатність м'язу у тварин без та з прекондиціонуванням у перерахунку на масу м'язу здорової кінцівки [35,47].

Ішемія/реперфузія (72 години), індукована перетисненням стегнової артерії та перев'язуванням колатеральних гілок термінальної аорти у кролів, призводить до зниження вмісту таурину у литкових м'язах на 33 %. Для зменшення ОС таурин (1 мг/кг), що вводився довенно за 10 хв до реперфузії, знижував тиск в передньому м'язовому футлярі гомілки на 39 %, набряк м'язів на 16 %, а активність лактатдегідрогенази на 36 %. При цьому МДА та дієнові кон'югати у м'язовій тканині знизилися на 22 % та 30 %, а у плазмі крові – на 38 % та 23 %, відповідно [27].

Пошкодження ендотелію внаслідок перенесеної ішемії та реперфузії характеризується підвищенням проникності, клітинним набряком і втратою ацетилхолін-залежної вазорелаксації. Здатність інгібіторів фосфодіестерази посилювати ацетилхолін-залежну вазорелаксацію було показано на сегменті поверхневої стегнової артерії кролів з модельованою ішемією/реперфузією (32 години). Так, після норепінефрин-індукованого спазму артерії ацетилхолін дозозалежно призводив до вазодилатації у тварин без прекондиціонування. У кролів, що одержали пентоксифілін (100 мкМ) інтраартеріально перед початком реперфузії, ацетилхолін зумовлював значно сильнішу вазодилатацію [66].

Неселективний адреноблокатор карведілол у дозі 2 мг/кг/день впродовж 10 днів перед ішемією/реперфузією (42 години) задньої лапи щурів запобігав підвищенню рівня МДА, зниженню активності СОД та глутатіонпероксидази в печінці, легенях, м'язах та сироватці крові [34].

Прекондиціонування білих Ново Зеландських кролів N-ацетилцистеїном, β -глюканом та коензимом Q призводило до зниження рівня МДА та підвищення активності СОД, глутатіонпероксидази і концентрації оксиду азоту (II) в умовах ішемії/реперфузії (1-3 години) [67]. N-ацетилцистеїн здатний знешкоджувати вільні радикали, пригнічувати нагромадження нейтрофілів, зумовлювати вазодилатацію та покращувати мікроциркуляцію. В умовах ішемії/реперфузії (41 година) зумовлює зниження рівня креатинфосфокінази в плазмі та реактивні субстанції тіобарбітурової кислоти, як у плазмі, так і скелетних м'язах кінцівки [68]. Нейтрофільна інфільтрація теж була менш виражена при дії N-ацетилцистеїну у порівнянні з контрольною групою [69]. Проте, в умовах модельованої важкої посттравматичної ішемії/реперфузії (42 години) N-ацетилцистеїн введений двічі доведено до дози 375 мг/кг перед індукуванням ішемії і перед реперфузією не проявляв антиоксидантного ефекту, не змінюючи рівня МДА, загального та відновленого глутатіону, концентрації креатинфосфокінази та не запобігав набряку і ураженням камбаловидного м'язу [70].

Антиоксидантні властивості α -токоферолу (вітамін E) та екстракту прополісу, діючою речовиною якого є фенілетиловий ефір кофеїнової кислоти, вивчалися в умовах ішемії/реперфузії (22 години) у щурів. Обидві речовини, введені внутрішньоочеревинно за 1 год. до реперфузії знижували рівень МДА та NO як в плазмі крові, так і гомогенаті литкового м'язу у порівнянні з групою тварин без прекондиціонування. Активність СОД підвищувалася в плазмі, проте у литковому м'язі залишалась без змін. При цьому активність каталази у всіх групах тварин була без змін [48]. Використовуючи різноманітні поєднання антиоксидантів та

мембраностабілізуючих речовин, таких як α -токоферол, метіонін, дексаметазон, манітол та цистеїн, було продемонстровано різочу відмінність двох режимів введення активних речовин – підчас індукованої ішемії та відразу перед зняттям затискача. Співвідношення відновлених/окислених глутатіон в тканині скелетних м'язів, що використовувалося для оцінки рівня оксидативного стресу, підвищувалося при введенні речовин перед реперфузією та не змінювалося при їх застосуванні під час індукованої ішемії. В той же час рівень креатинкінази не відрізнявся в обох групах тварин [71].

Новітній нетоксичний антиоксидант, двоатомний водень (H_2), був нещодавно випробуваний на різних тваринних моделях- ішемії/реперфузії, запальних та неврологічних захворювань, селективно знижуючи рівень токсичних кисневих радикалів. В клінічних дослідженнях вода насичена воднем чи інгаляції проявляли антиоксидантний та антиалергічний ефекти, запобігали апоптозу та запаленню [72]. Гіпербарична оксигенація впродовж періоду ішемії зменшувала індуковані реперфузією зростання МДА та підвищення активності каталази, як було продемонстровано на моделі ішемії/реперфузії (3/1 година) [10].

Нейтрофільна інфільтрація, як було відмічено раніше, є детермінантою ішемічно/реперфузійних пошкоджень. Статини (інгібітори 3-гідрокси, 3-метилглутарил коензим А редуктази) покращують ендотеліальну функцію, шляхом підвищення активності NO-синтази та пригнічення експресії адгезивних молекул, зменшуючи таким чином індуковану реперфузією екстравазацію нейтрофілів. Так, симвастатин впродовж 6 днів перед модельованою ішемією/реперфузією (4-24 години) знижував активність мієлопероксидази скелетних м'язів і не впливав на ступінь деградації колагену IV [54]. У цих же дослідках симвастатин (2 мг/кг) проявляв цитопротективний ефект на тканину нирок, запобігаючи нейтрофільній інфільтрації, та парадоксально протилежну дію на паренхіму легень, посилюючи екстравазацію нейтрофілів [55]. У імуногістохімічному

дослідженні показана ефективність використання антиоксиданту силденафілу цитрату як протектора м'язового пошкодження при синдромі ішемії/реперфузії [73].

Певний захисний ефект при пошкодженнях викликаних ішемією/реперфузією пов'язували з впливом антитромбоцитарного середника клопідогрелю. Проте, 10 денний курс блокатора P2Y₁₂ рецепторів тромбоцитів клопідогрелю призводив до зниження концентрації NO у м'язовій тканині, в умовах модельованої 6-годинної ішемії з подальшою 4 годинною реперфузією задньої лапи щурів [74]. Вважалось, що манітол захищає скелетні м'язи від пошкоджень викликаних ішемією/реперфузією, проте в експериментах на щурах лінії Вістар було показано обмежений терапевтичний ефект манітолу. В умовах ішемії/реперфузії (21 година) манітол запобігав зниженню капілярного кровоплину, а також капілярної та веноулярної швидкостей еритроцитів, що визначалися прижиттєвою мікроскопією, проте не зменшував адгезію та інфільтрацію лейкоцитів і площу ураження скелетних м'язів [75].

Посткондиціонування пов'язане з застосуванням альтернативних коротких періодів оклюзії/відновлення кровопостачання перед цілковитою васкуляризацією тканин. Посткондиціонування довело свою ефективність в експериментах і знайшло широке застосування в повсякденній клінічній практиці, оскільки значно покращує мікроциркуляцію, зумовлюючи гіперемію, суттєво зменшує системну запальну відповідь індуковану вільними радикалами та TNF α [76].

Слід зазначити, що у останні роки получає розвиток нові напрямлення досліджень, які оцінюють роль активних форм кисню з різних точок зору [77], а також розвивають нові підходи до корекції цих змін на основі впливу на мітохондрії та використання нових груп препаратів [78-82].

1.3. Біофлавоїди та їх вплив на патогенез синдрому ішемії/реперфузії

Близько 4000 тисяч природних поліфенольних сполук, що містяться в фруктах та овочах, було названо флавоноїдами. Маючи за основу фенольне кільце, ці ароматичні вуглеводні різняться положенням та кількістю кисневих і гідроксильних радикалів. Ось основні класи флавоноїдів та їх представники (рис 1.): флавони (хрисин, лютеолін, флавіон), флавоноли (кверцетин, мірецетин, рамнетин, рутин), ізофлавоноли (геністеїн, дайдзеїн), флаванони (гесперетин), флаванололи (таксифолін), флаванолі (катехин, епікатехин), дигідрофлавоноли (флоретин), антоціанідини (пеонідин, ціанідин) та ін.

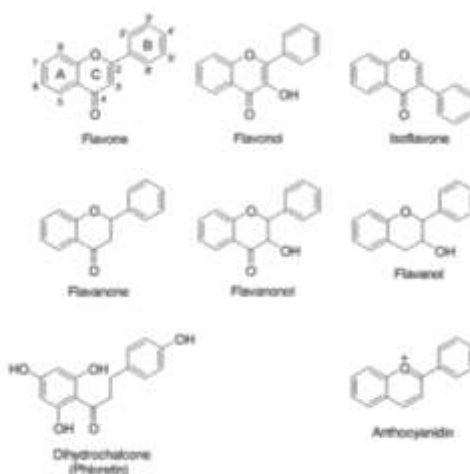


Рис. 1. Хімічна структура окремих класів біофлавоноїдів.

Ці сполуки зацікавили науковців широким спектром біологічних ефектів, котрі ті можуть проявляти. Так, було описано протинеопластичну та антимурагенну [83,84], протизапальну [85,86], протидіабетичну [87], антигістамінну [88], нейропротективну [89] та іншу дію [90-92] флавоноїдів. Антиоксидантний ефект флавоноїдів пов'язують з видаленням вільних радикалів, донацією іонів водню чи утворенням ліганд з іонами металів [91,93]. Окрім антиоксидантної активності, флавоноїди, як було показано, можуть пригнічувати різноманітні ензими пов'язані із запаленням, такі як

циклооксигенази та ліпооксигенази [85]. Більше цього, епідеміологічні дослідження показали, що вживання флавоноїдів з їжею та напоями рослинного походження обернено пропорційне до смертності від серцево-судинних ускладнень [94,95]. Нещодавно було показано механізм, завдяки якому споживання концентрованого виноградного соку призводить до зниження активності NADH^+ -оксидази, що є основним продуцентом супероксид аніонів в фагоцитарних та ендотеліальних клітинах у хворих на хронічні запальні та серцево-судинні захворювання. Використовуючи полімеразну ланцюгову реакцію в режимі реального часу, дослідники показали, що виноградний сік та окремі поліфеноли, зокрема кверцетин, селективно знижують експресію генів p47phox, p22phox та gp91phox, що кодують субодиниці NADH^+ -оксидази при транскрипції на мРНК у нейтрофілах, моноцитах та ендотеліальних клітинах [96]. Розвератрол, біофлавоноїд широко представлений у продуктах середземноморської дієти та червоному вині, у дозі 20 мг/кг щоденно впродовж 14 днів статистично достовірно запобігає ушкодженню чотирьохголового м'язу стегна у щурів в умовах модельованої ішемії /реперфузії шляхом перетискання черевної аорти [97].

Все указанные исследования позволили обосновать использование биологически активных компонентов растительного происхождения в качестве эффективных ингредиентов при разработке лекарственных препаратов [98-100].

Показано, що мікронізована біофлавоїдна фракція (діосмін) в дослідях на м'язах та брижі щурів призводила до зниження міграції лейкоцитів, капілярної проникності протеїнів і концентрації моноклональних антитіл до адгезивних молекул та до змін низки ензимів. Так у тварин, що одержували мікронізований діосмін, концентрація еритроцитарних СОД та $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATP}$ -ази була вищою, а рівень глутатіону, концентрація мієлопероксидази і малонового деальдегіду у сироватці були нижчими у порівнянні з контрольною групою [101]. Розчин гомогенізованого листа *Urtica dioica*

також призводив до зниження рівня МДА в передніх гомілкових м'язах щурів в умовах ішемії/реперфузії [102].

Флавоноїд магнолол, що є екстрактом *Magnolia officinalis*, проявляє антиоксидантний, антинітрозилюючий та протизапальний ефекти при ішемії/реперфузії у щурів. Магнолол у дозі 0,3 та 1 мг/кг доведено зменшує запалення, набряк та пошкодження м'язової тканини, знижуючи постішемичне зростання МДА, мієлопероксидази та нітрит/нітрат співвідношення. В той же час, біофлавоїд не змінює місцевий м'язовий кровоплин та інші фізіологічні параметри, такі, як гематокрит, рівень глюкози, артеріальний тиск та парціальний тиск газів крові [103]. Продемонстровано ефект зниження пошкодження головного мозку у новонароджених щурів при прекондіції з використанням хеспередину [104].

Враховуючи дані про цитопротективний ефект кореневих екстрактів *Salvia leriifolia* при ішемічно/реперфузійному ушкодженні на мозкову тканину, Hosseinzadeh Н. та ін. (2007) оцінили можливий ефект біофлавоноїда на скелетні м'язи. Водні та спиртові екстракти кореня *Salvia leriifolia* (100, 200, 400 мг/кг) інтраперитонеально за 1 год до реперфузії суттєво збільшували амплітуду електроміографічних потенціалів м'язів задньої кінцівки у щурів, знижували рівень МДА, та підвищували загальний вміст сульфгідрильних груп, що дозволяє судити про певний захисний ефект при оксидативному пошкодженні м'язової тканини [105].

Ефективність синтетичних аналогів порівнювалася з природними флавоноїдами, такими як хрисин, апігенин, лютеолин, кверцетин та фісетин. У дослідях на ізольованій грудній аорті щурів синтетичний 3,4-дигідрофлавонол проявляв сильнішу вазодилатуючу дію, більш ефективно пригнічуючи кальцій-індуковане скорочення грудної аорти та покращуючи релаксацію ендотелію в умовах оксидативного стресу, викликаного ксантиноксидазою чи пірогалолом [95].

Кверцетин (клас флавонолів) є найбільш поширеним біофлавоноїдом, що міститься у переважній більшості фруктів та овочів [106,107]. Більшість

вивчених біологічних ефектів, пов'язані з його антиоксидантною активністю – видаленням вільних радикалів, пригніченням окиснення ліпідів та активності ксантиноксидази [108]. Саме гідроксильний радикал в положенні С-7 пов'язаний з гальмуванням активності ксантиноксидази, що дорівнює ефекту застосування специфічного блокатора алопуринолу. Серед усіх тестованих флавоноїдів лише кверцетин та лютеолін (клас флавонів) проявляють найсильніший ефект блокування ксантиноксидази [109]. Кверцетин проявляє вазодилатуючу, антигіпертензивну та антиатерогенну дію, а також зменшує ремоделювання судин при артеріальній гіпертензії [110].

Цитопротективні властивості кверцетину були показані і в умовах синдрому ішемії/реперфузії різних тканин та органів. Так, пероральне застосування кверцетину за 30 хв. до модельованої ішемії/реперфузії слизової оболонки шлунка дозозалежно (25, 50, 100 мг) зменшувало площу уражень, викликану реперфузією [111]. В умовах ішемії/реперфузії задньої лапи кролів кверцетин у дозі 5 мг/кг запобігав зниженню концентрації оксиду азоту (NO) у стінці стегнової артерії, що визначався прижиттєво порфіриновим мікросенсором, та зменшував концентрацію супероксид радикалу у біопсіях скелетних м'язів [112]. Кверцетин, що є основним інгредієнтом екстракту *Ginkgo biloba* та обумовлює його біологічні ефекти, може активувати синтез оксиду азоту (NO) та вазодилатацію. Так, у дослідях на ізольованій грудній аорті, він викликав дозозалежне збільшення перерізу судини, що усувалося інгібітором NO-синтази L-NAME, та підвищення концентрації внутрішньоклітинного Ca^{2+} в культивованих ендотеліальних клітинах, що не пригнічувалося інгібітором кальцієвої помпи тапсігастрином, а залежало від концентрації позаклітинного кальцію [113].

В останній час при патологічних станах використовують антиоксидантні препарати, які забезпечують корекцію ВРО і, як наслідок, виявляють різного ступеня антиангінальну, ліпорегулюючу, антикоагулянтну, мембраностабілізуючу та імуностимулюючу активність.

Великий інтерес представляють дослідження з вивчення антиоксидантної активності флавоноїдних речовин, мембранопротективні властивості яких виявляються у здатності блокувати вільні радикали, збільшувати ефективність ферментативного антиоксидантного захисту, стабілізувати структуру клітинної мембрани. Найбільш перспективним, на наш погляд, серед біофлавоноїдів є представник інгібіторів ліпоксигеназ - корвітин (кверцетин). Відомо, що він впливає на активність ферментів, які беруть участь у деградації фосфоліпідів (фосфоліпазу, ліпоксигеназу, циклооксигеназу), а також блокує вільнорадикальні процеси. До основних позитивних властивостей препарату відносяться його швидку дію у зв'язку з наявністю водорозчинної форми, вазодилататорну дію, яка частково опосередкована вивільненням оксиду азоту, а також інгібуванням активності протеїнкінази C [114]. Корвітин також інгібує дегрануляцію нейтрофілів, пригнічує утворення супероксиду і фосфорилювання специфічних білків нейтрофілів. Є дані про ефективне застосування кверцетину для корекції порушень в протеїназ-інгібіторній системі [115].

1.4. Інгібітори протеолізу та їх роль в умовах ішемії/реперфузії

У плазмі крові здорової людини виявляється незначна протеолітична активність. Це обумовлено тим, що основна частина ферментів міститься у вигляді неактивних ензімогенів, і наявністю інгібіторів протеїназ, що зв'язують активні форми протеолітичних ферментів. Вони пов'язують ферменти з утворенням неактивних комплексів, які потім видаляються з організму. Дані механізми дозволяють контролювати роботу комплексних протеолітичних систем крові: системи згортання, фібринолізу, комплементу, кінінової, ренін-ангіотензинової [117-119]. При цьому показано, що інгібітори протеїназ мають протизапальну, антибактеріальну, противірусну і протипухлинну дію [119-126].

Спадкова чи набута недостатність інгібіторів може призвести до розвитку багатьох патологічних процесів внаслідок надмірної активації протеолізу. При патологічних станах (травматичний токсикоз, опікова хвороба, запальні процеси) відбувається надходження в системний кровообіг значної кількості внутрішньоклітинних протеїназ із зруйнованих клітин і викид півактивних лізосомальних ферментів з активованих нейтрофілів. Наявність великої кількості тригерних факторів протеолізу призводить до активації плазмових протеолітичних систем. Це є додатковими несприятливим фактором для перебігу захворювання, з виникненням таких небезпечних для життя станів як ДВС-синдром, тяжка артеріальна гіпотензія, сильний больовий синдром і т.п. [127,128]. Крім того, відбувається активація неспецифічного протеолізу, що викликає посилену деградацію білків плазми крові, у тому числі інгібіторів протеїназ, а також білків клітинних мембран і сполучної тканини, що може призвести до пошкодження інтактних тканин і розширенню вогнища запалення. Таким чином, при патологічних станах відбувається надмірна активація протеолізу, яка супроводжується пригніченням антипротеїназної системи, що обумовлює необхідність заповнення дефіциту власного захисту організму застосуванням препаратів інгібіторів протеїназ [122].

Найбільш універсальним механізмом регуляції протеоліза є контроль, здійснюваний інгібіторами протеїназ. Інгібітори протеїназ відіграють важливу роль в обмеженні тканинного пошкодження протеолітичними ферментами лейкоцитів, що вивільняються при запаленні. Основним інгібітором плазми крові є α 1-антитрипсин, фермент становить 90-92% загальної антипротеїназної активності плазми крові і виконує провідну роль у гальмуванні тканинного протеолізу. Даний білок має 9 метіонінових радикалів, що надає йому властивості антиоксиданту [129]. Інтенсивне специфічне споживання інгібіторів протеїназ активованими протеолітичними ферментами, а також неспецифічне їх руйнування внаслідок біодеградації і окислення викликає зниження антипротеолітичного потенціалу організму.

Все це призводить до порушення співвідношень активності процесів протеолізу та контролю цього процесу за допомогою інгібіторів протеолітичних ферментів. Встановлено, що в основі патогенезу багатьох захворювань лежить порушення балансу між активністю протеолітичних ферментів та їх інгібіторів [127,128]. У свою чергу, дисбаланс протеїназ-інгібіторної системи, що виникає при різних патологічних станах, сприяє посиленню інтенсивності процесів ПОЛ, що ще більше підсилює надходження в кров лізосомальних ферментів, яким притаманний потужний деструктивний потенціал і які викликають активацію плазмових протеолітичних ферментів [130].

Таким чином, при реперфузійному синдромі в організмі відбувається активація протеолітичних ферментів і зростання рівня біологічно активних речовин, які активуються шляхом обмеженого протеолізу, що супроводжується падінням антипротеїназного інгібіторного потенціалу плазми крові [131-133]. Це призводить до системних порушень гемодинаміки на рівні мікроциркуляції, розладу клітинного метаболізму, розвитку органопатології і шоку [134-136].

Щоб обмежити шкідливу дію протеолітичних ферментів з високою деструктивною активністю використовуються препарати поліфункціональних інгібіторів протеолітичних ферментів, що містять у своєму складі активний пептид (інгібітор Кунітца). Одним з таких препаратів є інгібітор протеаз аprotинін. Використання інгібіторів протеїназ при патологічних станах, що супроводжуються активацією протеолізу, запобігає надлишкової активації основних протеолітичних систем крові. Одним з найбільш важливих властивостей інгібіторів протеаз є їх здатність регулювати взаємовідносини систем згортання, фібринолізу і кініногенезу [137,138]. Дослідження дії інгібіторів протеаз показало, що вони мають значну інгібуючу дію на калікреїн-кінінову систему. Інгібітори протеїназ володіють антиагрегантною дією, їх використовують з метою пригнічення надлишкового фібринолізу та запобіганню прогресування внутрішньо

судинного згортання крові. Крім того, інгібітори протеїназ, включаючись в мембрану лізосом, змінюють її структуру і функції, регулюють тим самим протеолітичний баланс клітин, запобігаючи розвитку спонтанного аутолізу, нормалізуючи процес обмеженого протеолізу [139,140]. Цитопротективний ефект інгібіторів протеїназ на віддалені органи (нирки, легені) при ішемії/реперфузії вивчався рядом науковців [141], тоді як їх значення у моделюванні індукованих реперфузією змін скелетних м'язів є недостатньо з'ясованим. Так, у клінічних дослідженнях низькі дози апротиніну (280 мг) знижували експресію адгезивних рецепторів CD11b/CD18 у нейтрофілах, індуковану використанням апарату штучного кровообігу [142], а в експериментально відтворених умовах ішемії/реперфузії (4/1 година) задньої лапи у щурів апротинін проявляв більший цитопротективний ефект ніж антиоксиданти N-ацетилцистеїн та кальцію добезілат, суттєво знижуючи реактивні субстанції тіобарбітурової кислоти в тканині легень, прерибронхіальний та інтерстиційний лейкостаз [143].

У літературі існують лише спорадичні повідомлення про вплив інгібіторів протеолізу на скелетні м'язи при ішемії/реперфузії. Зокрема показано, що інгібітор протеаз FOY зменшував ступінь адгезії нейтрофілів до стінки посткапілярних венул, що досліджувалися шляхом прижиттєвої мікроскопії *m. gracilis* у щурів [144].

Основна терапевтична властивість інгібіторів полягає у полівалентному антипротеїназному ефекті, здатності гальмувати активність ряду ферментів: трипсину, хімотрипсину, плазміну, тромбіну, еластази, колагенази [145,146]. Інгібітори протеїназ беруть участь у регуляції активності ферментів систем фібринолізу, згортання крові, кінінообразовання, є основними регуляторами протеолітичної активності в осередках запалення, знижують токсемію, гальмують аутолиз тканин [147-149].

Одним з найбільш ефективних сучасних представників антипротеїназних препаратів є апротинін. Раніше він був найбільш відомий тільки як один з основних препаратів, що входять в схеми базової терапії

хворих на гострий панкреатит. Апротинін - поліпептид, який отримують з легенів великої рогатої худоби. Виявляє антипротеолітичну, антифібринолітичну і гемостатичну дію. Утворюючи оборотний стехіометричний ензим-інгібуючий комплекс, інактивує найважливіші протеїнази: трипсин, плазмін, плазмовий і тканинної калікреїн, хімотрипсин, кініногеназу. Гальмує як сумарну протеолітичну активність, так і активність окремих протеолітичних ферментів [150,151].

За рахунок антипротеїназної активності апротинін ефективний при ураженнях підшлункової залози та інших станах, що супроводжуються високим вмістом калікреїну та інших протеїназ в плазмі і тканинах. Знижує фібринолітичну активність крові, гальмує фібриноліз і надає гемостатичну дію при коагулопатіях. Інгібування калікреїн-кінінової системи визначає ефективність препарату для профілактики і терапії різних типів шоків станів [152-154]

В останні десятиліття апротинін отримав більш широке розповсюдження в медичній практиці і використовується при впливі екстремальних факторів, в терапії критичних станів. Інтерес до використання апротиніна, з позицій застосування його при критичних станах, зокрема при перитоніті, обумовлений його ефективністю гальмувати вплив запального компонента (перешкоджаючи звільненню кінінів), виявляє фібринолітичну дію, а так само інгібувати вивільнення запальних цитокінів і підтримувати гомеостаз глікопротеїнів. Апротинін зменшує втрату глікопротеїнів тромбоцитами і перешкоджає експресії прозапальних адгезивних глікопротеїнів гранулоцитами [155,156]. У зв'язку з цим пригніченням активності протеолітичних ферментів і збільшення ендогенних антипротеїназ може перешкоджати розвитку важких ускладнень.

Враховуючи механізм дії і фармакологічні ефекти корвітину та інгібіторів протеїназ ми вважаємо, що вивчення їх коригуючого впливу на метаболічні порушення при реперфузійних ураженнях представляє значний практичний і науковий інтерес.

У доступній літературі практично відсутні відомості про використання апротиніна і кверцетину при реперфузійного синдрому, а основна увага дослідниками приділялася ізольованому використанню цих препаратів. У зв'язку з цим, представляється актуальним використання комбінації препаратів апротиніна і кверцетину, як засобів патогенетичної корекції дисрегуляторних і дисметаболических порушень при реперфузійному синдромі. Крім того, використання в даному комплексі аналога природного простагландину E1 може ще поліпшити ефект від застосовуваного лікувального комплексу за рахунок стабілізації ендотелію та зменшення судинних ушкоджень.

Підводячи підсумки огляду літератури, слід зазначити, що проблема ішемічних і реперфузійних порушень і його наслідків, через поширеність і високу летальності, становить значний науковий і практичний інтерес. У доступній літературі відсутні відомості про ефективність поєднаного застосування антиоксидантів, інгібіторів протеїназ та аналогів природного простагландину E1 для патогенетичної корекції синдрому ішемії/реперфузії, у зв'язку з цим, представляється актуальним експериментальне обґрунтування поєднаного застосування даних груп препаратів з акцентом на вивчення місцевих змін в м'язовій тканині при її реперфузії. Можна припустити, що ефективна корекція локальних змін і протекція м'язової тканини у вогнищі реперфузії сприятиме зменшенню ризику розвитку системних ускладнень при реперфузійного синдрому і сприяти підвищенню ефективності лікування.

ГЛАВА 2. МАТЕРІАЛ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Загальна характеристика експериментального матеріалу

Експериментальні дослідження проведено на 116 білих щурах-самцях лінії «Wistar», масою 180-200 грам. Тварини утримувалися в стандартних ідентичних умовах. Утримання тварин, харчування, дослідження та евтаназія відповідали державним і міжнародним умовам про гуманне ставлення до тварин. Комісія з біомедичної етики Кримського державного медичного університету імені С.І. Георгіївського (протокол № 2 від 06.11.2014 р.) встановила, що дослідження проведені з дотриманням основних положень «Правил проведення робіт з використанням експериментальних тварин», затверджених указом МОЗ України № 753 від 12 серпня 1997р., Конвенції Ради Європи про охорону хребетних тварин, які використовуються в експериментах та інших наукових цілях (1986), Директиви ЕСЄ № 609 (1986), Указу МОЗ України № 281 від 01.11.2000г. «Про заходи з подальшого вдосконалення організаційних норм роботи з використанням експериментальних тварин» та Закону України № 3447- IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» (2006).

2.2. Модель синдрому ішемії/реперфузії. Структура та обсяги досліджень

Ішемію формували шляхом накладення гумових джгутів на рівні пахової складки на задні кінцівки терміном 6 годин під ефірним наркозом, використовуючи модифікацію В.З. Харченка (посвідчення на раціоналізаторську пропозицію №1786, видане Кримським державним медичним інститутом 28.09.1989 р.). Сила тиску накладених джгутів складала від 150 до 170 Ньютонів. Ширина перетискання 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 накладення джгутів кровообіг у кінцівках щурів повністю блокується, тобто при використанні експериментальної моделі відтворювалася повна ішемія кінцівок. Крім того показано, що застосування ефірного наркозу не впливає на досліджувані в роботі біохімічні показники сироватки крові щурів. Реперфузійний синдром моделювали шляхом відновлення кровообігу у раніше ішемізованих кінцівках через 6 годин після накладення джгутів. Дослідження проводили через 6, 12, 24, 48 годин після зняття джгутів. Розподіл тварин на групи при моделюванні ішемії та реперфузійного синдрому представлено в таблиці 2.1.

Таблиця 2.1

**Розподіл тварин по серіях експерименту без
медикаментозної корекції**

| Серії дослідів | Кількість тварин |
|---------------------------------|------------------|
| | Щури, шт. |
| Контрольна група | 18 |
| Ішемія 6 годин | 10 |
| Реперфузійний синдром 6 годин | 10 |
| Реперфузійний синдром 12 годин | 10 |
| Реперфузійний синдром 24 години | 8 |
| Реперфузійний синдром 48 годин | 12 |
| Всього: | 68 |

Вивчення ефективності експериментальної корекції з використанням інгібітору протеїназ, антиоксиданту і аналога природного простагландину E_1 проводилося шляхом одноразового інтраперитонеального введення препаратів за 30 хвилин до відновлення кровообігу у кінцівках. Розподіл тварин в групах з медикаментозною корекцією представлено в таблиці 2.2.

В якості інгібітору протеїназ застосовували «Гордокс» (aprotininum, Gedeon Richter, Угорщина). Як антиоксидант використовували «Корвітин», що є водорозчинною формою біофлавоноїду кверцетину (ЗАТ НВЦ "Борщагівський хіміко-фармацевтичний завод", м. Київ). Як аналог природного простагландину E1 використовували «Алпростан» («Zentiva», Чехія). Дози препаратів, що вивчаються були підібрані, виходячи з середніх

Таблиця 2.2

**Розподіл тварин по серіях на тлі застосування
антиоксиданту і інгібітора протеїназ**

| Серії дослідів | Кількість тварин Щури, шт. |
|---|-------------------------------|
| Реперфузійний синдром 12 годин + лікування кверцетин | 10 |
| Реперфузійний синдром 12 годин + лікування апротинін | 10 |
| Реперфузійний синдром 12 годин + лікування аналогом природного простагландину E1 | 8 |
| Реперфузійний синдром 12 годин + поєднане лікування кверцетин і апротинін | 10 |
| Реперфузійний синдром 12 годин + поєднане лікування кверцетин, апротинін та аналогом природного простагландину E1 | 10 |
| Всього: | 48 |

терапевтичних доз, що використовуються в клініці на 1 кг маси. Апротинін вводили в дозі 20000 КМО / кг, розведений у фізіологічному розчині натрію хлориду, з розрахунку 10 мл / кг маси. Кверцетин вводили в дозі 10 мг / кг маси тіла, розведений у фізіологічному розчині натрію хлориду, з розрахунку 10 мл / кг маси. Алпростан вводили в дозі 20 мкг / кг маси тіла. Щурам

контрольної та експериментальних груп без лікування вводили ізотонічний розчин натрію хлориду з розрахунку 10 мл / кг.

Евтаназію щурів здійснювали шляхом декапітації під ефірним наркозом через 6 годин після накладення джгутів, через 6, 12, 24, 48 годин після відновлення кровообігу у кінцівках, після чого призводили забір біологічного матеріалу. Кров для дослідження отримували з яремної вени піддослідних щурів шляхом катетеризації яремної вени перед декапітацією. Сироватку крові виділяли з нестабілізованої крові, шляхом центрифугування протягом 15 хвилин при 3000 об / хв. після попереднього охолодження. Гемолізат отримували шляхом додавання до 0,1 мл цільної крові 1,9 мл дистильованої води. Шматочки м'язів, отримані з м'язової тканини стегна нижче місця накладення джгута промивали в охолоджену фізіологічному розчині після чого обсушували фільтрувальною папером, очищали від жиру і сполучної тканини і ретельно подрібнювали ножицями в кашицю. Наважку цієї маси (1-2 г) поміщали в ступку з кварцовим піском і ретельно розтирали до отримання гомогенної маси. Після цього додавали 10 обсягів фізіологічного розчину (10 мл на 1г тканини) і перемішували скляною паличкою. Отриманий екстракт м'язів фільтрували через чотири шари вологої марлі і центрифугували протягом 15 хв при 1500g. Надосадову рідину використовували для біохімічних досліджень.

Біохімічні зміни в крові визначали через 6 годин після розвитку ішемії, через 6, 12, 24 і 48 годин після відновлення кровообігу у кінцівках і через 12 годин після відновлення кровообігу у кінцівках на тлі лікування вище переліченими препаратами.

2.3. Методи досліджень

2.3.1. Методи визначення показників вільно радикального окислення ліпідів і антиоксидантів

Інтенсивність вільно радикального окислення ліпідів та активність антиоксидантів в сироватці крові та гемолізаті визначали за допомогою

спектрофотометричних методів з вимірюванням оптичної щільності на спектрофотометрі «BioMate 5» (Великобританія).

Критерієм інтенсивності перекісного окислення ліпідів служило вміст ТБК-активних продуктів (ТБК-АП) в сироватці крові. Рівень ТБК-АП оцінювали по кольоровій реакції з 2-тіобарбітуровою кислотою (ТБК) в присутності іонів Fe^{3+} [157]. У пробірку з 0,05 мл сироватки крові додавали 0,2 мл 0,27% розчину FeCl_3 і через 10 хвилин доводили до 1,8 мл 0,2 М гліціновим буфером (рН 3,6). Після додавання 1,55 мл 0,8% розчину ТБК суміш кип'ятили на водяній бані 15 хвилин, охолоджували, додавали 1 мл 20% трихлороцтової кислоти (ТХУ), 2 мл хлороформу, ретельно струшували і центрифугували 15 хвилин при 3000 об/хв. Верхній шар колориметрировали при 532 нм і виражали результати в нМолях МДА, що міститься в 1 мл або 1 мг ліпідів сироватки.

Каталазоподобну активність (КПА) визначали на основі реєстрації залишкової кількості перекису водню після її інкубації з біологічним матеріалом при рН 7,4 і 25°C. Перекис водню визначали шляхом утворення забарвленого комплексу з солями молібдену [158]. Для здійснення реакції 0,025-0,1 мл біологічного матеріалу доводили 0,05 М трис- HCl буфером (рН 7,4) до 1,0 мл, додавали 2 мл 9 мМ H_2O_2 і інкубували при 25° С протягом 10-30 хвилин в залежності від біологічного матеріалу. Після інкубації реакцію зупиняли внесенням 2 мл 4% розчину молібдату амонію. Оптичну щільність вимірювали при 410 нм. Результати виражали в мМ інактивованого перекису 1 л матеріалу за 1 с.

Рівень церулоплазміну (ЦП) визначали модифікованим методом Ревіна, заснованому на окисненні р-фенілендіамін, за участю церулоплазміну із зупинкою реакції розчином фтористого натрію [159]. У пробірки вносили по 0,1 мл сироватки. У контрольну пробірку додавали 2,0 мл розчину фтористого натрію з метою інактивації ферментативної активності церулоплазміну. Потім в усі пробірки додавали по 8,0 мл ацетатного буферу і по 1 мл розчину р-фенілендіаміну, використовуваного в якості субстрату.

Пробірки протягом 1 год інкубували при 37°C. Після чого в усі пробірки, за винятком контрольної, доливали по 2,0 мл розчину фтористого натрію і витримували протягом 30 хв при 4°C. Оптичну щільність вимірювали при 540 нм. Результати виражали в мг/л.

Активність супероксиддисмутази (СОД) в гемолізаті визначали в модельній системі освіти супероксидних аніонів при взаємодії НАДН₂ і феназінметасульфату (ФМС) [160,161]. Здатність СОД конкурувати за супероксидні аніони виявлялася за ступенем інгібування відновлення НСТ до гідразінтетразолію. У пробірку вносили 0,1 мл крові, гемолізовали додаванням 0,4 мл дистильованої води і 0,5 мл 0,1 М трис-НСІ буфера (рН - 7,4). До 1 мл гемолізату додавали 0,25 мл етанолу і 0,15 мл хлороформу, 300 мг кристалічного КН₂РО₄. Розчин перемішували скляною паличкою протягом 15 хв і центрифугували при 12000 об/хв 15 хв. У дослідну пробірку вносили 2,0 мл розчину НСТ, 0,1 мл розчину ФМС, 0,05 мл надосадової рідини і доводили об'єм фосфатним буфером 0,15 М, рН 7,8 до 3,85 мл. Контрольна проба містила всі компоненти, крім біологічного матеріалу. Проби інкубували при 25°C протягом 10 хв. Величину оптичної щільності визначали при 540 нм проти суміші, що містить всі компоненти, крім НАДН. Результати виражали в умовних одиницях, приймаючи 50% інгібування за 1 умовну одиницю. Активність виражали в умовних одиницях, розрахованих на 1 мл біологічного матеріалу.

2.3.2. Методи вивчення стану протеїназ-інгібіторної системи

У сироватці крові і супернатанті гомогенатів м'язів визначали показники протеїназ-інгібіторної системи за допомогою ензиматичних методів [162]. Оптичну щільність вимірювали на спектрофотометрі «BioMate 5» (Великобританія).

Трипсиноподобну активність (ТПА) сироватки крові вимірювали спектрофотометричним методом, заснованому на реєстрації швидкості

відщеплення N-бензоїл-L-аргініну (BA) від синтетичного субстрату N-бензоїл-L-аргініну етилового ефіру (BAEE) (Sigma, США). Для її визначення біологічний матеріал (0,03 мл сироватки крові, 1,0 мл БАС, 0,2 мл супернатантів гомогенатів печінки або нирок) розводили до 2 мл 0,05 М трис-НСІ буфером (рН - 8,0) і після преінкубації протягом 5 хв додавали 1 мл 1,5 мМ розчину BAEE. Реакцію проводили в термостатованому кюветі (25°C) спектрофотометра, реєструючи приріст оптичної щільності при 253 нм з інтервалом 2-3 хв протягом 10-15 хв проти контрольної проби на спонтанний гідроліз BAEE. Розрахунок активності проводили за приростом оптичної щільності в пробі за 1 хв і виражали в мкмоль БА, звільненого 1 мл біологічного матеріалу за 1 хв. Трипсиноподібну активність супернатантів гомогенатів м'язів виражали в мкмоль БА, звільненого 1 мл біологічного матеріалу за 1 хв на 1 мг загального білка, що міститься в пробі.

Вимірювання еластазоподібної активності (ЕПА) сироватки крові проводили на основі реєстрації швидкості приросту оптичної щільності проби при довжині хвилі 347,5 нм за рахунок ферментативного гідролізу синтетичного субстрату Nt-BOC-аланіл-р-нітрофінілового ефіру (BANFE) (Sigma). Для цього в термостатованому кюветі спектрофотометра (25°C) змішували 0,01 мл сироватки або 0,1 - 1,0 мл іншого біологічного матеріалу з 0,05 Na-фосфатним буфером (рН - 6,5) до кінцевого об'єму проби 2,9 мл. Через 15 хв до проби додавали 0,1 мл 0,01 М розчину BANFE в ацетонітрилі. Вимірювали приріст оптичної щільності. Еластазоподібну активність виражали в нмоль гідролізованного субстрату за 1 хв в розрахунку на 1 мл для сироватки крові або на 1 мг білка супернатантів гомогенату м'язів.

Визначення антитриптичної активності (АТА) сироватки крові та гомогенату м'язів проводили за уніфікованим методом В. Ф. Нартікова і Т. С. Пасхіна. Використовували трипсин «Spofa» (Чехія). Для визначення антитриптичної активності сироватку крові розводили в 50 разів, супернатант гомогенатів використовували нерозведеним. В термостатованих кюветах спектрофотометра (25°C), готували 2 проби - дослідну і контрольну.

Досвідчена проба містила 1.8 мл 0,05 М трис-НСІ буфера (рН 8,0), 0,1 мл розведеної 1:50 сироватки крові і 0,1 мл розчину трипсину (10 мкг) в 1 мМ НСІ, що містить 10 мМ СаСІ₂. Контрольна проба містила ті ж компоненти, крім сироватки крові. Обидві проби витримували 5 хв при 25°C, потім додавали в кожен по 1 мл 1,5 мМ розчину ВАЕЕ, швидко перемішували, приріст оптичної щільності вимірювали при 253 нм проти проби на спонтанний гідроліз субстрату. Відліки робили кожну хвилину протягом 4-5 хв. З лінійної ділянки кривої залежності приросту оптичної щільності від часу реакції оприділяли приріст оптичної щільності за 1 хвилину для дослідної та контрольної проб. Різницю між цими показниками використовували для обчислення АТА в ІО/мл або на 1 мг білка супернатантів гомогенатів м'язів.

Для визначення кислотостабільних інгібіторів протеїназ (КСІ) в сироватці крові та гомогенатах, проби попередньо 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°C протягом 20 хв. Після охолодження пробу нейтралізували 0,5 н розчином NaOH і обсяг доводили 0,05 М трис-НСІ буфером (рН 8,0) до 1,9 мл. Для визначення рівня кислотостабільних інгібіторів протеїназ м'язових тканин 1 мл супернатантів гомогенатів обробляли 0,112 мл 50% ТХУ і здійснювали експозицію на водяній бані при 60°C. Після охолодження і нейтралізації розчином 3 н NaOH отриманий 5% - ний ТХУ-екстракт центрифугували при 5000 об / хв. Подальше визначення рівня кислотостабільних інгібіторів протеїназ проводили за алгоритмом, аналогічним методиці визначення антитриптичної активності. Зміст кислотостабільних інгібіторів висловлювали в інгібіторних одиницях, що припадають на 1 мл сироватки крові або на 1 мг білка 5% ТХУ-екстракту супернатантів гомогенатів м'язових тканин. Отримані результати визначення показників в супернатантах гомогенатів м'язів перераховували на 1г білка, який визначали методом Лоурі.

2.3.3. Забір і обробка матеріалу для світлової та електронної мікроскопії

Для гістологічного дослідження виділяли м'язову тканину нижньої кінцівки щура нижче місця накладення джгутів з подальшою фіксацією в 10% розчині нейтрального формаліну. Мінімальний термін фіксації складав 10 днів, протягом яких фіксуюча рідина змінювалася двічі. Фіксатор відмивали в проточній водопровідній воді 24 г. Тканину зневоднювали в батареї спиртів висхідної концентрації (50%, 60%, 70%, 80%, 96% і абсолютний спирт), прояснювали в ксилолі, витримували в насиченому при + 37°C розчині парафіну, поміщали в парафін при + 56°C, з подальшою заливкою в суміш парафіну і бджолиного воску і виготовлення парафінових блоків. З парафінових блоків готували серійні зрізи товщина 4-5 мкм. З метою оглядового забарвлення, гістологічні зрізи забарвлювали гематоксиліном і еозином. Для виявлення компонентів сполучної тканини забарвлювали пікрофуксином за Ван Гізоном, сполучнотканинні волокна забарвлювалися в червоний колір.

Перегляд і цифрові фотографії мікропрепаратів здійснювали за допомогою світлового мікроскопа «Olympus CX-41».

Фіксацію матеріалу для електронної мікроскопії здійснювали 2,5% розчином глютаральдегіду на фосфатному 1М буфері (pH 7,4) при + 4 ° C протягом години. Відмивання фіксатора проводили 1М фосфатного буферу (pH 7,4). Потім протягом години в холодильнику проводили дофіксацію матеріалу 1,3% розчином оксиду осмію (OsO₄). Надалі здійснювалася провідка по спиртах висхідної концентрації (етанол). Потім матеріал проводили через ацетон 2 рази по 25 хв і поміщали в суміш ацетон-смола (1:1) на 1 г із закритими пробками, на 1 годину з відкритими пробками. Заливка матеріалу в смоли здійснювалася з використаних рівних кількостей суміші А (Епон-812 62 мл + ДДСА 100 мл) і суміші Б (Епон-812 100 мл + MNA 89 мл) з додаванням ДМР-30 з розрахунку 0,15 мл на кожні 5 мл

суміші. Полімеризацію здійснювали протягом 1,5 діб в термостаті при 37 ° C на ніч, 45 ° C - на день, 54 ° C - на ніч. Напівтонкі зрізи (1 мкм) виготовляли на ультратомі "Reichert" і після забарвлення метиленою синню вивчали за допомогою світлового мікроскопа. На тому ж ультратомі виготовляли тонкі зрізи (30-60 нм), які після забарвлення за Рейнольдсу фотографували і вивчали за допомогою електронного мікроскопа "Jem 1010" (JEOL) при збільшенні в 2500, 3000, 5000, 6000, 8000 , 10 000 и 15 000 разів.

2.3.4. Статистична обробка результатів

Необхідні статистичні розрахунки та побудову діаграм проводили за допомогою EOM 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 [163,164]. Дані у таблицях подані як середні значення та їх стандартні похибки ($M \pm m$), коефіцієнт R відображає ступінь кореляції.

Всі вимірювання и дослідження здійснювалися на устаткуванні, що пройшло метрологічну перевірку и експертизу.

РОЗДІЛ 3. ПАТОФІЗІОЛОГІЧНІ МЕХАНІЗМИ, ЩО ОБУМОВЛЮЮТЬ МОРФОЛОГІЧНІ УРАЖЕННЯ СКЕЛЕТНИХ М'ЯЗІВ ПРИ ІШЕМІЇ/РЕПЕРФУЗІЇ

Визначення протеолітичної активності та антипротеїназного інгібіторного потенціалу у різних біологічних середовищах є раннім і вельми чутливим тестом, що свідчить про патологічні зміни у тканинах, зокрема про наявність і ступінь деструктивного компоненту [24]. Проте їх участь у патогенезі ішемічно-реперфузійних пошкоджень на локальному рівні вивчено недостатньо, тому видається важливим дослідження протеолітичних механізмів пошкодження м'язової тканини при ішемії/реперфузії. Також викликають цікавість дослідження стану процесів вільнорадикального окислення ліпідів, як системи, яка нерідко односпрямовано реагує з протеїназ-інгібіторною.

3.1. Поведінкові реакції експериментальних щурів при синдромі ішемії/реперфузії

При оцінці дії ішемічно-реперфузійного пошкодження на стан організму найважливішим інтегральним показником є поведінка тварин. У зв'язку з цим у ході проведення експерименту виконувалося спостереження за поведінковими реакціями і станом експериментальних тварин.

У тварин експериментальних груп у момент накладення джгутів спостерігалися характерні прояви гострої реакції: неспокійна поведінка, писк, тварини гризли рукавичку, спостерігалось сечовиділення. Потім, протягом 30-40 хвилин, тварини гризли дерев'яні палички, а якщо їх не було, то задні кінцівки або джгути. Через 1-2 г після накладення джгутів тварини ставали гіподинамічними. Зниження рухової і орієнтовно-дослідницької активності в умовах експерименту у даних тварин, очевидно, пов'язано з процесами перебудови вищої нервової діяльності, які пристосовують нервові центри до незвичних умов середовища. Впродовж 6 - годинного дослідження

(до моменту зняття джгутів) їх стан не змінювався. Іноді тварини пересувалися по клітці за допомогою передніх кінцівок, слабо реагували на подразники. Отже, на тлі ослаблення функціональної здатності нервових клітин, прогресивно розвивалося охоронне гальмування.

Після зняття джгутів із задніх кінцівок щурів, показники емоційної активності зростали, зазначалося короткочасне рухове збудження, поряд з цим мало місце збільшення дефекації і сечовиділення. Через 2-5 хв таке рухове збудження у експериментальних тварин швидко змінювалося загальмованістю: з'являлася гіподинамія, тварини лежали у клітці, відмовлялися від їжі і води, у всіх щурів спостерігалася блідість видимих слизових оболонок, шкіра раніше ішемізованих тканин була набрякла, гіперемована.

Через 3 г стан щурів погіршувався: тварини як і раніше лежали нерухомо, відмовлялися від їжі і води. Деякі тварини після дотику до них намагалися пересуватися по клітці за допомогою передніх кінцівок. Забарвлення видимих слизових оболонок і шкірних покривів ставало ціанотичним.

До шостої години спостереження щурі залишалися загальмованими: лежали на боці із закритими очима, продовжували відмовлятися від води та їжі. У тварин відзначався ціаноз шкіри і слизових оболонок, кінчика носа і вух, тьмяність рогівки очей. Під час маніпуляції вони надавали слабкий опір, намагалися гризти предмети, якими до них доторкалися.

На 12 годину спостереження стан тварин залишався важким: щурі лежали на боці, забившись в один куток клітки, відмовлялися від їжі і води, слабо реагували на зовнішні подразники. Зберігався ціаноз видимих шкірних покривів, особливо дистальних відділів тіла (хвіст, ніс, вуха). У переважної більшості щурів очі були закриті, рогівка тьмяна. Реакції на зовнішні подразники були вкрай слабкими. Наростав набряк кінцівок, значно збільшувався їх об'єм; бліді до цього шкірні покриви набували нерівномірне багряно-синюшне забарвлення, з'являлися крововиливи, пухирі з серозним

або серозно-геморагічним вмістом. При пальпації визначалися тканини дерев'янистої щільності. Рухи кінцівок різко обмежувалися, спроби їх провести супроводжувалися писком тварин. З наростанням місцевих явищ загальний стан тварин прогресивно погіршувався. Починаючи з першої години після зняття джгутів, у щурів протягом усього наступного періоду їх життя спостерігалось прогресуюче зниження температури тіла.

Через 24 г, у щурів, які вижили, відзначалася гангрена кінцівок. Вони реагували на зовнішні подразники, пили воду. По клітці пересувалися за допомогою передніх кінцівок. Видимі слизові облонки і шкірні покриви були рожевими. Загальний стан був задовільним, тварини добре реагували на подразники, пили воду, приймали їжу.

Моделювання синдрому ішемії-реперфузії супроводжувалося високою летальністю тварин, яка наростала в міру збільшення термінів реперфузії. Через 6 г після реперфузії загинуло 9% експериментальних тварин, через 12 годин - 23%, після закінчення 24 годин після відновлення кровообігу відзначалася загибель 39% тварин, а через 48 годин - 60%.

3.2. Стан протеїназ-інгібіторної системи сироватки крові і гомогенатів м'язів при ішемії/реперфузії скелетних м'язів

В результаті виконаних експериментів було встановлено, що при моделюванні ішемії задніх кінцівок у щурів спостерігалась тенденція до зростання рівня ЕПА у сироватці крові у порівнянні з інтактними тваринами (табл. 3.1.1). Через 6 г після відновлення кровообігу у задніх кінцівках щурів було відзначено суттєве зниження рівня еластазоподібної активності, який виявився у 3,8 рази нижче показника здорових щурів.

Через 12 г після зняття джгутів ЕПА була вже у 5,3 рази нижче показника контрольної групи. Розвиток реперфузійного синдрому тривалістю 24 г і 48 г виявив зменшення ЕПА практично у 2 рази у порівнянні з показниками здорових тварин.

Поряд із зазначеними змінами ЕПА, значні зрушення були відзначені і щодо трипсиноподібної активності. Так, при моделюванні ішемії задніх кінцівок у щурів була відзначена тенденція до зниження ТПА сироватки крові у порівнянні з аналогічним показником здорових щурів.

Таблиця 3.1.1

**Активність протеолітичних ферментів та їх інгібіторів у сироватці крові
в умовах моделювання ішемії/реперфузії**

| Умови досліджу | ЕПА (мкМ/мл×хв), M±m | ТПА (мкМ/мл×хв), M±m | АТА (Од/мл), M±m | КСІ (Од/мл), M±m |
|----------------------------------|----------------------------|----------------------------|------------------------|------------------------|
| Контрольна група (n=18) | 2,19±0,14 | 0,26±0,06 | 34,67±1,57 | 6,10±0,49 |
| 6 годин ішемія (n=10) | 2,31±0,09 | 0,20±0,07 | 38,04±1,46 | 3,82±0,37 ***** |
| 6 годин реперфузія (n=10) | 0,57±0,05 ***** | 0,50±0,03 *** | 20,61±1,20 ***** | 3,19±0,31 ***** |
| 12 годин реперфузія (n=10) | 0,41±0,02 *** | 0,73±0,01 *** | 25,76±1,76 ***** | 3,40±0,30 ***** |
| 24 години реперфузія (n=8) | 1,10±0,13 *** | 0,46±0,12 *** | 16,06±0,68 ***** | 3,08±0,24 ***** |
| 48 годин реперфузія (n=12) | 1,14±0,19 *** | 0,49±0,09 *** | 20,75±2,04 ***** | 2,10±0,34 ***** |

Примітка. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,005, ****p<0,001, *****p<0,0005, *****p<0,0001 порівняно з контрольною групою.

Моделювання 6-годинної реперфузії викликало значне збільшення даного показника, який перевищив рівень ТПА інтактних тварин на 92,3% ($p < 0,001$). Збільшення тривалості постішемичного періоду супроводжувалося подальшим зростанням трипсиноподібної активності сироватки крові. Так, при моделюванні РС тривалістю 12 г відбувалося збільшення ТПА у 2,8 рази у порівнянні зі значеннями контрольних тварин.

При розвитку РС тривалістю 24 г було виявлено збільшення ТПА у 1,8 рази у порівнянні з групою інтактних щурів. Реперфузійний синдром тривалістю 48 г - рівень супроводжувався збільшенням трипсиноподібної активності у 1,9 рази у порівнянні з показниками контрольної групи.

Поряд зі змінами протеїназної активності, при моделюванні ішемічно-реперфузійного пошкодження спостерігалася зміна антипротеїназного інгібіторного потенціалу сироватки крові експериментальних тварин. Так, вивчення антитриптичної активності у сироватці крові щурів з моделлю ішемії виявило тенденцію до зростання даного показника у порівнянні з інтактними тваринами.

Розвиток реперфузійного синдрому протягом усіх термінів досліджень супроводжувався зниженням даного показника. Так, через 6 г після зняття джгутів спостерігалася зниження рівня АТА на 40,5% ($< 0,001$) порівняно з групою контрольних щурів.

Через 12 г реперфузії рівень АТА знизився на 25,7% ($p < 0,001$) порівняно зі контрольними щурами. Збільшення тривалості постішемичного періоду супроводжувалося більш значним зниженням антитриптичної активності сироватки крові. Так, через 24 г після зняття джгутів АТА знизилася у 2 рази порівняно з контрольною групою. Через 48 г реперфузії досліджуваний показник був на 40,1% ($p < 0,001$) нижче рівня інтактних тварин.

В ході досліджень було виявлено зниження кількості кислотостабільних інгібіторів протеїназ у сироватці крові щурів з моделлю ішемії: на 37,4% ($p < 0,001$) порівняно з показниками групи інтактних тварин.

Моделювання 6-годинної реперфузії також супроводжувалося зниженням кількості КСІ у сироватці крові експериментальних щурів, при цьому даний показник знизився на 47,7% ($p < 0,001$) порівняно з інтактними тваринами.

Через 12 г після зняття джгутів було відзначено зниження досліджуваного показника на 44,3% ($p < 0,001$) порівняно зі контрольними щурами. Через 24 г після зняття джгутів рівень КСІ знизився на 49,5% ($p < 0,001$) порівняно з інтактними тваринами. Найнижчий рівень кислотостабільних інгібіторів протеїназ був зафіксований у сироватці щурів через 48 г після зняття джгутів; у даній групі досліджуваний показник був у 2,9 рази нижче значень контрольних тварин.

Таким чином, у ході проведених досліджень у сироватці крові щурів з моделями ішемії-реперфузії різної тривалості були виявлені значні порушення рівноваги у протеїназ-інгібіторній системі зі зрушенням у бік активації протеолітичної активності на тлі виснаження антипротеїназного інгібіторного потенціалу.

Поряд з вивченням протеолітичної активності на системному рівні - у сироватці крові, нами було проведено дослідження активності неспецифічних протеїназ та їх інгібіторів на місцевому рівні - у супернатантах гомогенатів скелетних м'язів. Як показали проведені дослідження, при моделюванні реперфузійного синдрому у супернатантах гомогенатів скелетних м'язів також були відзначені певні зміни компонентів протеїназ-інгібіторної системи. Так, при моделюванні 6-годинної ішемії була відзначена тенденція до зниження еластазоподібної активності порівняно з інтактними тваринами (табл. 3.1.2).

Формування реперфузійного синдрому супроводжувалося збільшенням активності еластази у супернатантах гомогенатів скелетних м'язів протягом усіх термінів досліджень. Так, через 6 г після зняття джгутів було відзначено збільшення ЕПА на 37,9% ($p < 0,01$) порівняно з інтактними щурами. Через 12 та 24 г після відновлення кровообігу у кінцівках було відзначено практично однакове збільшення ЕПА, дані показники зросли на

58,4% ($p < 0,001$) і 58,5% ($p < 0,001$) відповідно у порівнянні з групою контрольних тварин. Максимальний рівень еластазоподібної активності зафіксовано через 48 г після зняття джгутів і був на 68,8% ($p < 0,001$) вище показника інтактних щурів.

Таблиця 3.1.2

Активність протеолітичних ферментів та їх інгібіторів у супернатантах гомогенатів скелетних м'язів в умовах моделювання ішемії/реперфузії

| Умови досліджу | ЕПА (мкМ/мл×хв), M±m | ТПА (мкМ/мл×хв), M±m | АТА (Од/мл), M±m | КСІ (Од/мл), M±m |
|----------------------------------|----------------------------|----------------------------|------------------------|------------------------|
| Контрольна група (n=18) | 34,20±1,77 | 7,40±0,32 | 0,07±0,005 | 1,52±0,30 |
| 6 годин ішемія (n=10) | 31,91±1,23 | 6,79±0,67 | 0,09±0,004 * | 0,21±0,02 ***** |
| 6 годин реперфузія (n=10) | 47,17±3,72 *** | 11,50±0,99 *** | 0,19±0,01 ***** | 0,53±0,04 ***** |
| 12 годин реперфузія (n=10) | 54,19±4,49 ***** | 12,03±1,49 *** | 0,17±0,02 **** | 0,51±0,09 **** |
| 24 години реперфузія (n=8) | 54,21±2,40 ***** | 11,34±2,31 * | 0,20±0,02 ***** | 0,47±0,04 ***** |
| 48 годин реперфузія (n=12) | 56,72±1,68 ***** | 12,00±0,60 **** | 0,17±0,01 **** | 0,19±0,03 ***** |

Примітка. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$, **** $p < 0,001$, ***** $p < 0,0005$,
***** $p < 0,0001$ порівняно з контрольною групою.

Аналогічні зміни були відзначені при аналізі трипсиноподібної активності у супернатантах гомогенатів тканин кінцівок щурів експериментальних груп. Так, при розвитку ішемії кінцівок було відзначено недостовірне зниження ТПА у порівнянні з контрольними щурами.

Через 6 г після відновлення кровообігу в кінцівках мало місце збільшення ТПА, яка зросла на 55,4% ($p < 0,001$) порівняно з інтактними тваринами. Збільшення реперфузійного періоду до 12 г супроводжувалося подальшим зростанням досліджуваного показника, при цьому рівень ТПА зріс на 62,5% ($p < 0,001$) порівняно з групою здорових тварин.

Через 24 г після зняття джгутів рівень ТПА був достовірно вище показника контрольних тварин на 53,2% ($p < 0,05$). Через 48 г після відновлення кровообігу трипсиноподібна активність зросла на 62,1% ($p < 0,001$) порівняно з групою контрольних тварин.

Вивчення активності інгібіторів протеїназ у супернатантах гомогенатів скелетних м'язів щурів з моделлю ішемії виявило зростання антитриптичної активності на 28,5% ($p < 0,05$) порівняно з інтактними тваринами.

Моделювання реперфузійного синдрому супроводжувалося значним зростанням АТА. Так, через 6 г після зняття джгутів рівень антитриптичної активності виріс у 2,7 рази у порівнянні з контрольними тваринами. Через 12 та 48 г після відновлення кровообігу в кінцівках був відзначений практично однаковий ріст АТА, рівень якої у 2,4 рази перевищив показник контрольної групи. Найвищий рівень антитриптичної активності було зафіксовано в супернатантах гомогенатів скелетних м'язів щурів з моделлю 24-годинної реперфузії; при цьому даний показник був достовірно вище значень інтактних тварин у 2,9 рази.

Поряд зі збільшенням антитриптичної активності, у результаті проведених досліджень, було виявлено різке зниження кількості кислотостабільних інгібіторів протеїназ у супернатантах гомогенатів скелетних м'язів щурів з моделлю ішемії.

Даний показник достовірно знизився у 7,2 рази у порівнянні з інтактними тваринами.

Моделювання реперфузійного синдрому також супроводжувалося падінням рівнів кислотостабільних інгібіторів протеїназ. Так, через 6 та 12 г після зняття джгутів було відзначено практично однакове зниження рівнів КСІ, які знизилися у 2,8 та 2,9 рази відповідно у порівнянні з контрольною групою. Збільшення тривалості постішемичного періоду супроводжувалося подальшим зниженнями рівні кислотостабільних інгібіторів протеїназ. Через 24 г кількість КСІ зменшилася у 3,2 рази у порівнянні з контрольними тваринами. Через 48 г даний показник достовірно зменшився у 8 разів порівняно з інтактними тваринами.

Таким чином, дослідження неспецифічних протеїназ та їх інгібіторів у супернатантах гомогенатів скелетних м'язів щурів з моделлю ішемії виявило тенденцію до зниження рівнів протеолітичної активності, поряд з незначним зростанням АТА і різким падінням КСІ у порівнянні з інтактними тваринами. У свою чергу, розвиток реперфузійного синдрому викликав зростання рівня протеолітичної активності, яке супроводжувалося зростанням АТА і вираженим зниженням рівня КСІ протягом усіх термінів дослідження у порівнянні з інтактними тваринами.

Аналізуючи кореляційні зв'язки між показниками неспецифічних протеїназ та їх інгібіторів у 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 ($R = -0,82$, $p = 0,041$). Одночасно в умовах ішемії зворотня залежність зберігається лиш для АТА та КСІ ($R = -0,58$, $p = 0,099$).

Таким чином, моделювання експериментального синдрому ішемії-реперфузії супроводжується зміною активності неспецифічних протеїназ та їх інгібіторів у м'язовій тканині. Реперфузійні порушення характеризуються накопиченням трипсино- і еластазоподібних протеїназ, що володіють

високим деструктивним потенціалом, здатним призводити до подальшої деградації і руйнації м'язової тканини. При активації протеїназ відбувається зниження локального антипротеїназного потенціалу, у першу чергу за рахунок зменшення синтезу місцевосинтезуючих кислотостабільних інгібіторів протеїназ. Виразність локального дисбалансу протеїназ та їх інгібіторів у м'язовій тканині наростає при трансформації ішемічного ушкодження у реперфузійне і залежить від термінів реперфузії.

3.3. Стан прооксидантно-антиоксидантної системи крові та гомогенатів м'язів щурів при ішемії / реперфузії скелетних м'язів

Стан показників ВРО ліпідів і антиоксидантів, як і компонентів протеолізу, залежить від характеру та тривалості експериментального впливу. Проведені дослідження показали, що моделювання ішемії і реперфузійного синдрому супроводжується вираженим зростанням рівня ТБК-активних продуктів у сироватці крові експериментальних щурів у порівнянні з інтактними щурами. Так, рівень ТБК-АП у сироватці крові з розвитком ішемії і 6-годинної реперфузії кінцівок перевищив показник контрольних щурів більш ніж у 2 рази (табл. 3.1.3). Збільшення тривалості реперфузійного періоду супроводжувалося зростанням ТБК-АП сироватки крові. Через 12 г після зняття джгутів кількість ТБК-активних продуктів була достовірно вище показника інтактних тварин в 2,3 рази. Через 24 та 48 г досліджуваний показник перевищив показник контрольної групи у 2,6 та 2,8 рази відповідно. Підвищення рівня ТБК-АП на всіх стадіях впливу пошкоджуючого агента свідчить про зростання інтенсивності процесів вільнорадикального окислення ліпідів. Максимальне зростання ТБК-АП при тривалому реперфузійному періоді свідчить про виснаження резервних і компенсаторних можливостей організму.

Моделювання ішемії супроводжувалося тенденцією до зниження каталазоподібної активності порівняно з інтактними тваринами. При цьому

моделювання реперфузійного синдрому сприяло значному збільшенню активності каталази у гемолізаті експериментальних тварин у порівнянні з інтактними тваринами.

Таблиця 3.1.3

Процеси вільнорадикального окислення ліпідів та активність ферментів антиоксидантного захисту крові щурів в умовах моделювання ішемії/реперфузії

| Групи тварин | ТБК-похідні (нмоль/мл), M±m | КПА (нмоль/мл×с), M±m | СОД (Од/мгHb), M±m | ЦП (мг/мл), M±m |
|-------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------|--------------------------|-----------------------|
| Контрольна група (n=18) | 31,00 ± 0,4 | 0,38 ± 0,05 | 0,79 ± 0,05 | 208,60±17,2 |
| 6 годин ішемія (n=10) | 67,68 ± 2,06 **** | 0,31 ± 0,03 | 0,73 ± 0,07 | 291,2 ± 6,04 **** |
| 6 годин реперфузія (n=10) | 65,16 ± 5,26 **** | 0,63 ± 0,09 *** | 0,84 ± 0,06 | 294,39±12,32 **** |
| 12 годин реперфузія (n=10) | 71,45 ± 4,18 ***** | 0,63 ± 0,07 *** | 0,40 ± 0,06 **** | 295,84±11,85 **** |
| 24 години реперфузія (n=8) | 80,11 ± 5,29 ***** | 0,90 ± 0,20 ***** | 0,36 ± 0,06 ***** | 329,25±20,35 ***** |
| 48 годин реперфузія (n=12) | 86,82 ± 3,22 ***** | 0,89 ± 0,12 ***** | 0,20 ± 0,02 ***** | 428,19±13,97 ***** |

Примітка. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,005, ****p<0,001, *****p<0,0005, *****p<0,0001 порівняно з контрольною групою.

Реперфузійний синдром тривалістю 6 та 12 г супроводжувався практично однаковим збільшенням рівня КПА на 65,8% ($p < 0,001$) порівняно з групою контрольних тварин. Збільшення реперфузійного періоду до 24 та 48 г також викликало практично однаковий ріст КПА - у 2,3 рази у порівнянні з інтактними тваринами.

У щурів з моделлю ішемії була виявлена тенденція до зниження рівня супероксидисмутази у гемолізаті у порівнянні з інтактними тваринами. При цьому через 6 г після зняття джгутів була відзначена тенденція до зростання даного показника у порівнянні з контрольною групою. Збільшення тривалості реперфузійного періоду супроводжувалося зниженням рівня СОД. Так, через 12 г після зняття джгутів рівень супероксидисмутази знизився на 49,4% ($p < 0,001$) порівняно з групою контрольних тварин. Через 24 г після зняття джгутів рівень СОД був на 54,4% ($p < 0,001$) нижче показника групи контролю. Найнижчий рівень супероксидисмутази був виявлений у групі тварин з 48-годинним реперфузійним періодом: даний показник знизився на 74,7% ($p < 0,001$) порівняно з контролем.

Вивчення змін основного антиоксиданту сироватки крові - церулоплазмину у експериментальних груп тварин виявило послідовне зростання даного показника усіх груп у порівнянні з інтактними щурами. Так, розвиток ішемії супроводжувався зростанням церулоплазмину плазми крові, який перевищив показник контрольної групи на 39,6% ($p < 0,001$). Через 6 г після відновлення кровообігу у кінцівках рівень ЦП зріс на 41,1% ($< 0,001$) порівняно з інтактними тваринами. Через 12 г після зняття джгутів рівень ЦП збільшився на 41,8% ($< 0,001$) порівняно з інтактними тваринами. Після 24 г реперфузії рівень ЦП збільшилась на 57,8% ($p < 0,001$) порівняно з інтактними тваринами. Найвищий рівень церулоплазмину був зафіксований через 48 г після зняття джгутів і перевищив показник контрольних тварин у 2 рази.

Отже, при ішемії має місце зниження локальних антиокисних ферментів (КПА, СОД) і зростання ЦП - основного антиоксиданту плазми

крові, що можна розглядати як активацію антиокисних систем більш високого порядку. Дані, отримані на початковому етапі розвитку реперфузійного синдрому, свідчать про відносну ефективність антиоксидантних систем організму та їх здатність утримувати процеси ВРО ліпідів на безпечному рівні. Зі збільшенням тривалості реперфузійного періоду відзначається збільшення швидкості витрачання антиокисних ресурсів, пригнічення їх синтезу і суттєва активація ВРО ліпідів.

Таким чином, при ішемічно-реперфузійному пошкодженні спостерігається підвищення інтенсивності процесів вільнорадикального окислення ліпідів і зниження концентрації локальних антиоксидантних ферментів, поряд зі зростанням церулоплазміну плазми крові.

Розвиток ішемічного ушкодження та реперфузійного синдрому супроводжувався змінами окислювально-антиоксидантного гомеостазу і на місцевому рівні - у супернатантах гомогенатів скелетних м'язів, проте зміни були різними у залежності від характеру та тривалості дії пошкоджуючого агента. Так, ішемія протягом 6-ти годин практично не впливала на вміст ТБК-АП в супернатантах гомогенатів скелетних м'язів щурів у порівнянні з інтактними тваринами (табл.3.1.4).

Одночасно, розвиток реперфузійного синдрому на всіх стадіях характеризувався збільшенням концентрації вторинних продуктів ПОЛ. Так, через 6 г після відновлення кровообігу у кінцівках щурів було відзначено зростання рівня ТБК-АП на 65,0% ($p < 0,001$) порівняно з інтактними тваринами. Через 12 г після відновлення кровообігу у кінцівках щурів рівень ТБК-АП збільшився на 61,9% ($p < 0,001$) порівняно з контролем. Реперфузійний період тривалістю 24 г викликав зростання ТБК-активних продуктів на 50,7% ($p < 0,001$) порівняно з інтактними тваринами. Найвищий рівень ТБК-АП був відзначений при реперфузійному періоді тривалістю 48 г, даний показник зріс на 67,5% ($p < 0,001$) порівняно з контрольною групою.

**Процеси ПОЛ та активність ферментів антиоксидантного захисту в
гомогенатах скелетних м'язів в умовах моделювання ішемії/реперфузії**

| Групи тварин | ТБК-похідні (нмоль/мл), M±m | КПА (нмоль/мл×с), M±m | СОД (Од/мгHb), M±m | ЦП (мг/мл), M±m |
|----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------|--------------------------|-----------------------|
| Контрольна група (n=18) | 2,86 ± 0,32 | 18,21 ± 2,17 | 52,15 ± 5,94 | 25,05 ± 1,83 |
| 6 годин ішемія (n=10) | 2,86 ± 0,34 | 23,72 ± 1,15 * | 17,22 ± 3,6 ***** | 24,12 ± 1,40 |
| 6 годин реперфузія (n=10) | 4,72 ± 0,64 * | 4,85 ± 1,08 ***** | 30,86 ± 1,56 *** | 26,02 ± 1,82 |
| 12 годин реперфузія (n=10) | 4,63 ± 0,41 * | 8,73 ± 1,39 ***** | 35,55 ± 3,42 * | 28,86 ± 2,54 |
| 24 годин реперфузія (n=8) | 4,31 ± 0,95 | 4,27 ± 0,89 ***** | 34,55 ± 3,48 * | 26,47 ± 3,21 |
| 48 годин реперфузія (n=12) | 4,79 ± 0,80 * | 6,66 ± 0,71 ***** | 34,09 ± 3,34 * | 20,38 ± 2,37 * |

Примітка. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,005, ****p<0,001, *****p<0,0005, *****p<0,0001 порівняно з контрольною групою.

Моделювання ішемії кінцівок у щурів викликало зміни активності антиоксидантних ферментів. Так, при ішемії протягом 6-ти годин мало місце зростання КПА на 30,3% (<0,001) порівняно з інтактними тваринами. В свою чергу розвиток реперфузійного синдрому сприяв зниженню даного

показника у супернатантах гомогенатів скелетних м'язів щурів у порівнянні з інтактними тваринами. Так, розвиток 6-годинного реперфузійного синдрому викликав зниження КПА на 73,3% ($p < 0,001$) порівняно з контролем.

Через 12 годин після зняття джгутів рівень каталазоподібної активності був на 52,0% ($p < 0,001$) нижче аналогічного показника інтактних тварин. Найнижчий рівень КПА був виявлений у супернатантах гомогенатів скелетних м'язів щурів з моделлю 24-годинної реперфузії: на 76,5% ($p < 0,001$) нижче відповідного показника контрольної групи. Через 48 г після зняття джгутів рівень каталазоподібної активності був достовірно нижче контрольних значень на 63,4% ($p < 0,001$).

Результатами досліджень встановлено, що моделювання ішемії і подальшої реперфузії різної тривалості характеризувалося зниженням активності супероксидисмутази у супернатантах гомогенатів скелетних м'язів у порівнянні з інтактними тваринами. Причому найнижчий рівень даного ферменту був відзначений при розвитку ішемії: на 66,9% ($p < 0,001$) нижче відповідного показника контрольних тварин. Через 6 г після зняття джгутів активність СОД була на 40,8% ($p < 0,001$) нижче контрольних значень. Розвиток 12-годинного реперфузійного синдрому викликав зниження активності супероксидисмутази на 31,8% ($p < 0,001$) порівняно з інтактними тваринами.

Подальше збільшення тривалості постішемичного періоду призвело до прогресування зниження активності СОД. Так, через 24 г після відновлення кровообігу у кінцівках активність СОД була на 33,7% ($p < 0,001$) нижче відповідного показника контрольних тварин. Через 48 г після зняття джгутів було відзначено зниження активності супероксидисмутази на 34,6% ($p < 0,001$) порівняно з контрольними значеннями.

Проведені дослідження виявили тенденцію до зниження кількості ЦП у супернатантах гомогенатів скелетних м'язів щурів з розвитком ішемії у порівнянні з інтактними тваринами. Так при моделюванні реперфузійного синдрому тривалістю 6, 12 та 24 г було відзначено лише недостовірне

зростання досліджуваного показника у супернатантах гомогенатів скелетних м'язів експериментальних груп тварин у порівнянні з контрольними. Розвиток реперфузійного синдрому, тривалістю 48 г викликав достовірне зниження рівня ЦП, який знизився на 18,6% ($p < 0,05$) порівняно з інтактними тваринами.

Дослідження кореляційного зв'язку між величиною компонентів окислювально-антиоксидантного гомеостазу в гомогенатах скелетних м'язів продемонструвало, що додатня кореляція характерна для ферментів антиоксидантного захисту у 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 ($R = 0,74$, $p = 0,008$). А збільшення концентрації продуктів ТБК супроводжується підвищенням активності ферментів антиоксидантного захисту ($R = 0,89$, $p = 0,006$). У ішемізованій м'язовій тканині відмічено додатню кореляцію лише між СОД та церулоплазміном ($R = 0,67$, $p = 0,023$).

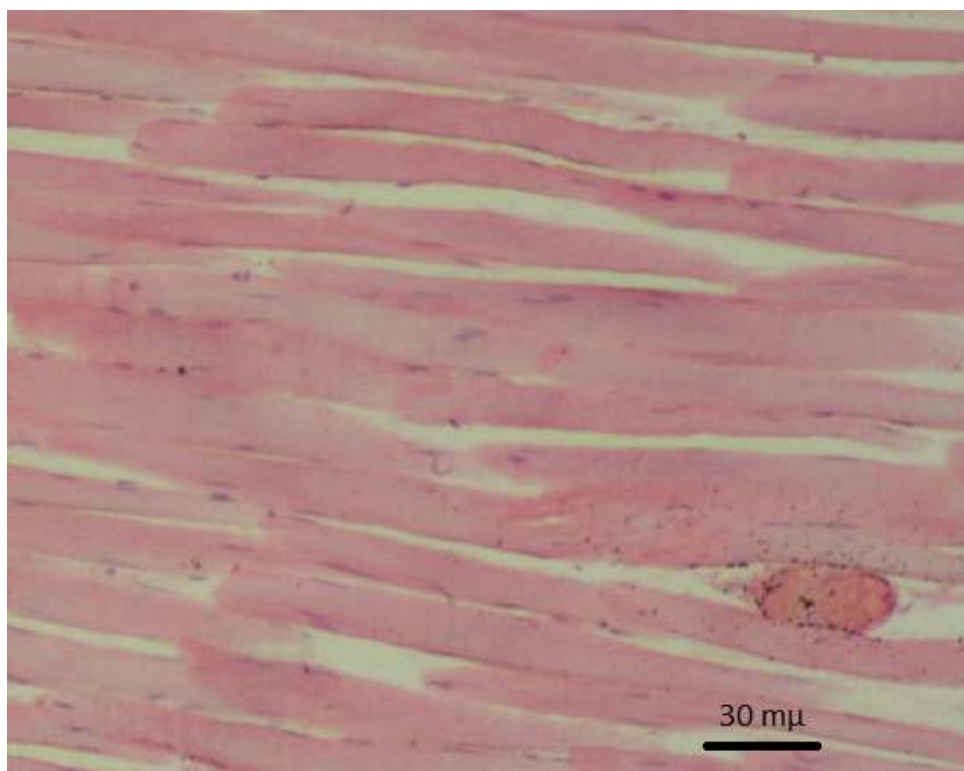
Таким чином, у результаті проведених досліджень було виявлено, що моделювання ішемії і реперфузійного синдрому викликає зростання вільнорадикального окислення ліпідів у супернатантах гомогенатів скелетних м'язів на тлі падіння вмісту антиоксидантних ферментів. В даному випадку, на нашу думку, накопичення токсичних продуктів ВРО ліпідів можна розцінювати як наслідок недостатньої активності ключових ферментів антиоксидантного захисту.

Дані, отримані в експериментах з моделювання ішемічно-реперфузійного ураження, свідчать про активацію протеїназ та оксидантів, поряд зі зниженням рівня активності інгібіторів протеїназ та антиокислювальних ферментів; причому має місце односпрямований характер змін у протеїназ-інгібіторній та окислювально-антиоксидантній системах. Слід зазначити, що зі збільшенням тривалості реперфузійного періоду спостерігається виснаження антипротеїназного і антиоксидантного потенціалу і достовірне збільшення активності протеолітичних ферментів і

продуктів вільнорадикального окислення ліпідів, які є потужними пошкоджуючими факторами на місцевому та системному рівнях. Виявлені зміни в протеїназ-інгібіторній та окислювально-антиоксидантній системах слід розглядати як важливі патогенетичні ланки ушкодження скелетних м'язів при синдромі ішемії / реперфузії.

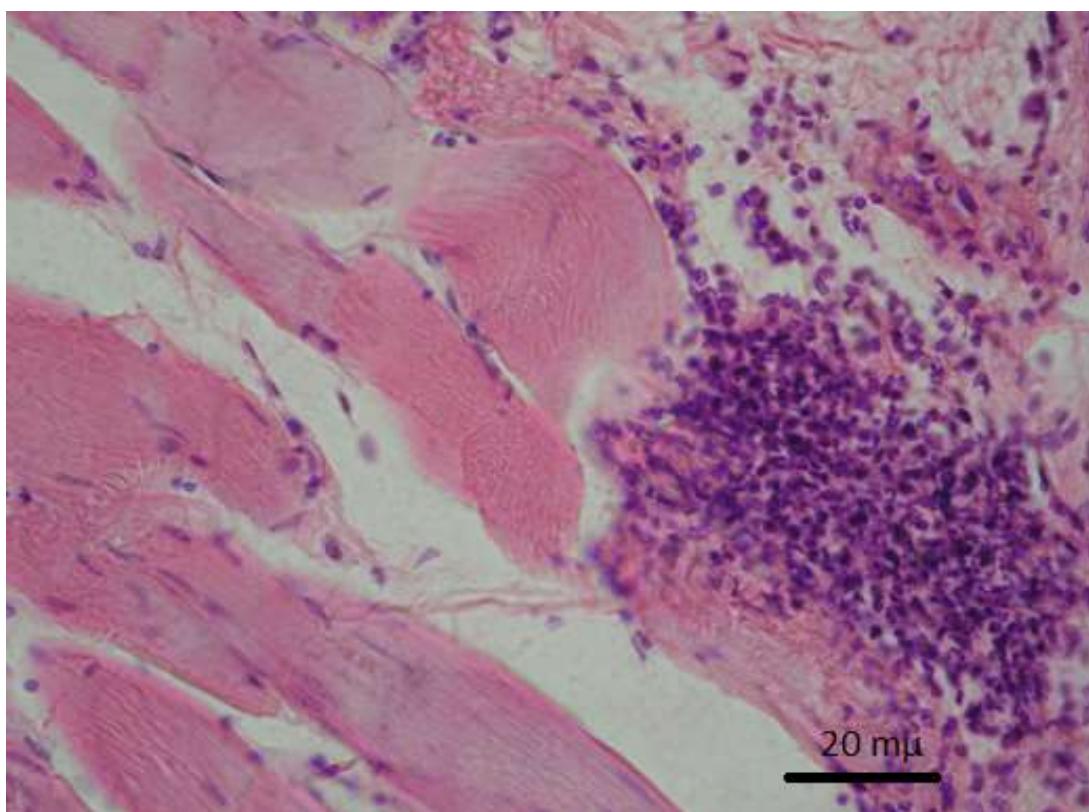
3.4. Характер патоморфологічних та ультраструктурних змін скелетних м'язів при синдромі ішемії/реперфузії

Проведені морфологічні дослідження показали, що у контрольних щурів скелетна м'язова тканина з досліджуваної області відрізнялася правильною структурою, з мінімальними міжклітинними проміжками, відсутністю клітинної інфільтрації (Мал. 3.1).



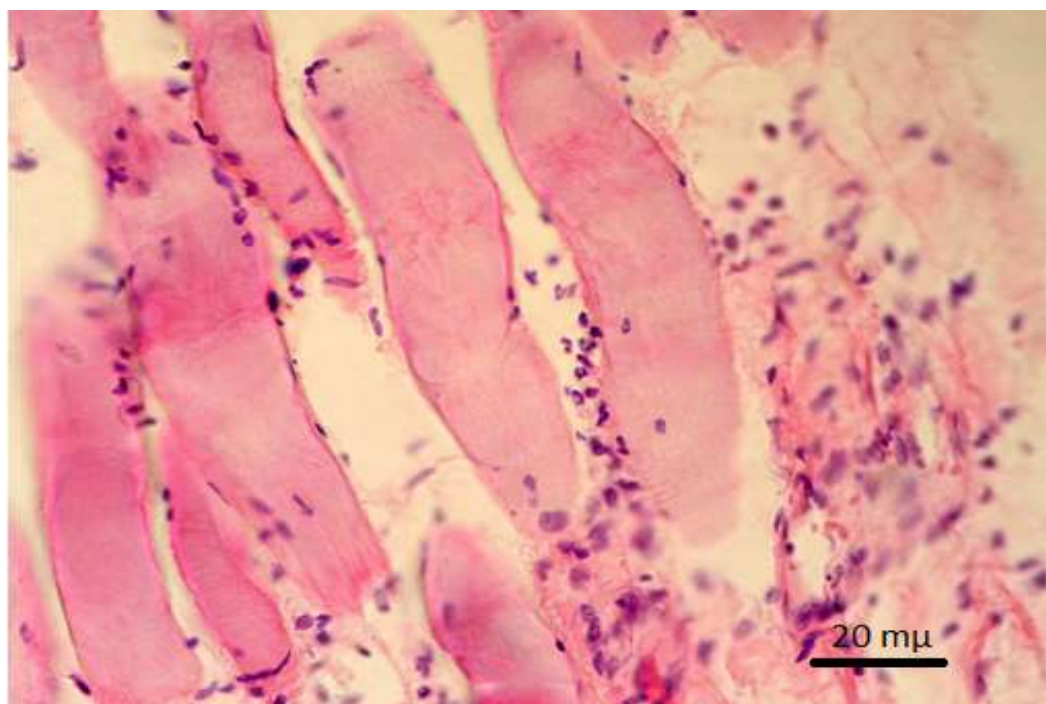
Мал. 3.1. Нормальна структура скелетної м'язової тканини. Контрольна група тварин. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Зб. x 100.

Патоморфологічна картина скелетної м'язової тканини щурів з розвитком 6-годинної ішемії кінцівок характеризувалася наявністю помірно виражених мікроциркуляторних змін. В результаті гістологічних досліджень було відмічено зникнення поперечної смугастості м'язової тканини (Мал.3.2). Також спостерігалися місця некрозу цитоплазми частини м'язових клітин з появою розривів м'язових волокон (Мал. 3.3).



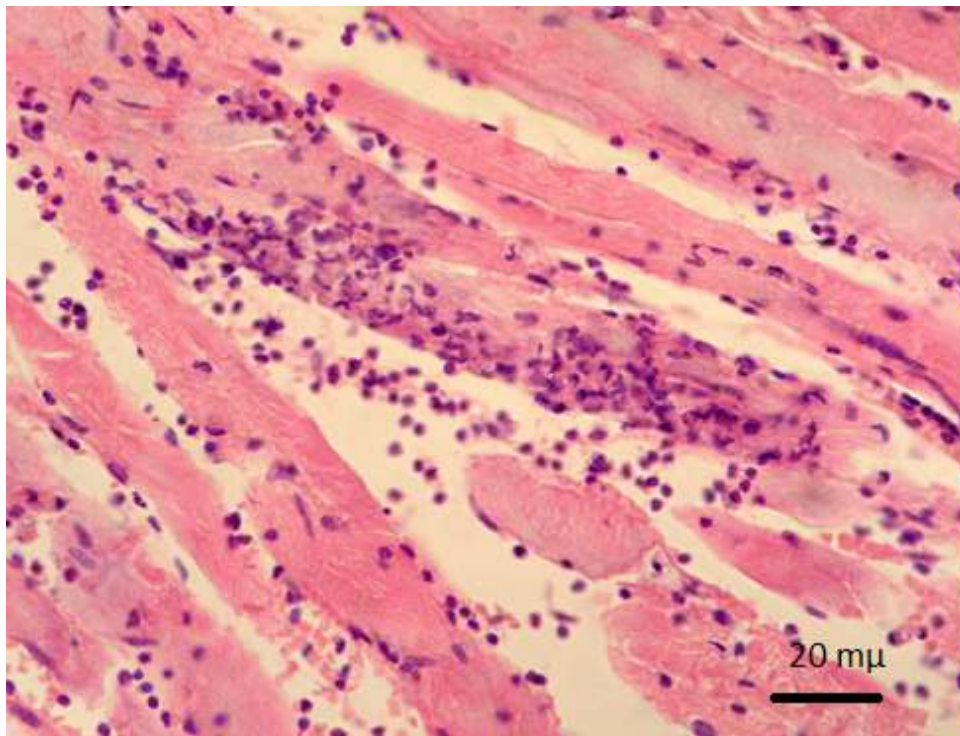
Мал. 3.2. Зникнення поперечної смугастості скелетної м'язової тканини. Розрив м'язових волокон. Група щурів з 6 годинною ішемією. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Зб. х 250.

Були відзначені ознаки внутрішньоклітинного набряку. Судинне русло зруйновується. На цьому тлі відзначаються ознаки набряку м'язової тканини: простори між окремими клітинами розширені за рахунок набряку міжклітинної рідини.



Мал. 3.3. Опустошення судин. Некроз міоцитів. Група щурів з 6 годинною ішемією. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Зб. х 250.

Дослідження скелетної м'язової тканини, проведені після 6 годинної реперфузії кінцівки показали, що її морфологічна картина неоднорідна і мозаїчна (Мал.3.4).



Мал. 3.4. Скупчення сегментоядрових лейкоцитів. Група щурів з 6 - годинною реперфузією. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Зб. х 250.

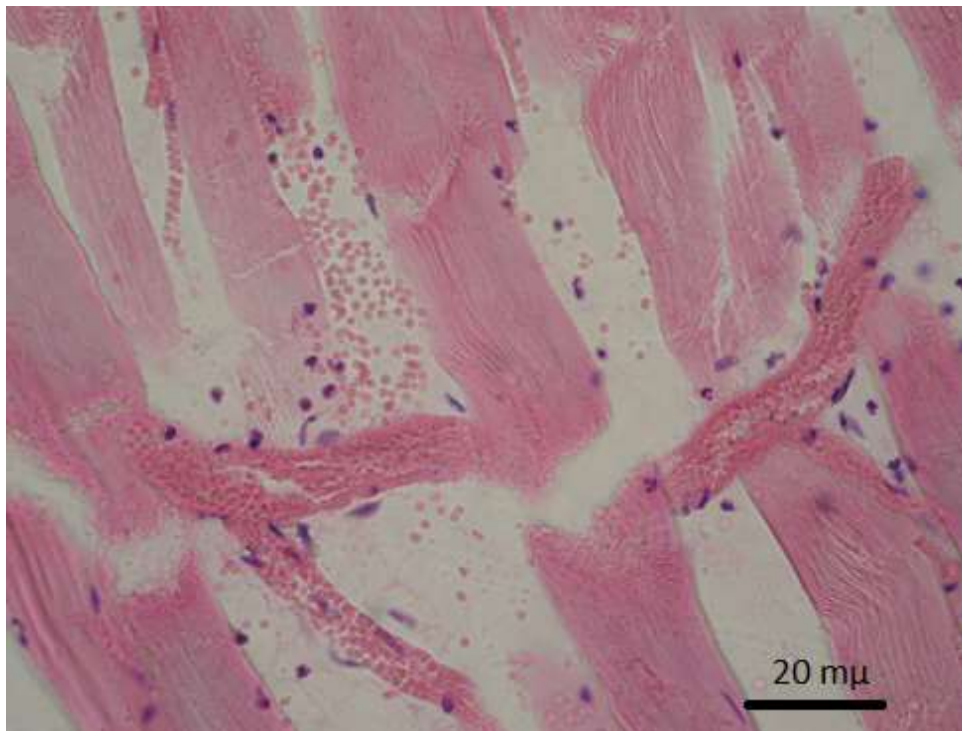
Були відзначені невеликі ділянки, де структура м'язових клітин практично не змінювалася у порівнянні з нормою, проте значна частина клітин мала проявлені у різному ступені ознаки некрозу. Так, мають місце зникнення поперечної смугастості м'язових клітин, поява ознак внутрішньоклітинного набряку, частковий розпад і лізис цитоплазми частини клітин, а також розпад і фрагментація самих м'язових волокон. Відзначаються ознаки набряку м'язової тканини - простори між окремими клітинами розширені, часом значно, за рахунок набрякової рідини. Клітинна запальна реакція представлена переважно сегментоядровими лейкоцитами і виражена у різних ділянках також по-різному: або вони практично відсутні, або їх дуже значна кількість.

Спостерігається тенденція до скупчення нейтрофілів навколо некротизованих клітин, а також периваскулярно. Дані зміни супроводжувалися певними біохімічними змінами м'язової тканини: розвитком дисбалансу неспецифічної протеїназ-інгібіторної системи, який

проявлявся зростанням активності неспецифічних протеїназ і зниженням їх інгібіторів.

Також спостерігається виражена реакція з боку судинного русла - судини паралітично розширені, заповнені еритроцитами. Спостерігаються ознаки помірно вираженого периваскулярного набряку, а також значна кількість петехіальних крововиливів (Мал.3.5).

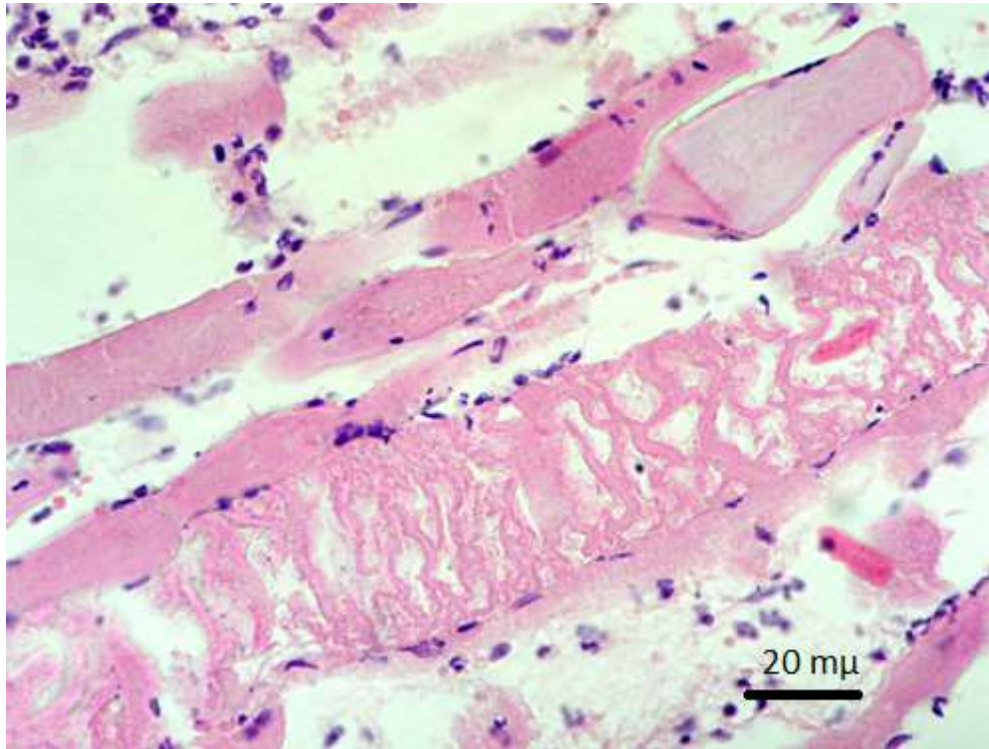
На окремих ділянках крововиливи зливаються і починають нагадувати геморагічну інфільтрацію. У просвіті частини судин відзначається наявність ознак складжа, а також можна відзначити досить велику кількість фібринових тромбів.



Мал. 3.5. Периваскулярний набряк, петехіальні крововиливи. Група щурів з 6 годинною реперфузією. Забарвлення гематоксиліном та еозином. 36. x 250.

У експериментальній групі тварин, що зазнали шестигодинної ішемії та реперфузії протягом 12 г, відзначається втрата м'язовими клітинами поперечної смугастості; значна їх кількість має гомогенізовану просвітлену

цитоплазму, у порівнянні з відносно збереженими клітинами, і ознаки набряку. У багатьох клітин спостерігається фрагментація, розпад і лізис цитоплазми, що веде до розпаду і м'язових волокон, часом з формуванням «булавоподібних» потовщень на кінцях фрагментів (Мал. 3.6). Ядра у таких клітинах або відсутні, або блідо фарбуються і збільшені у розмірах.

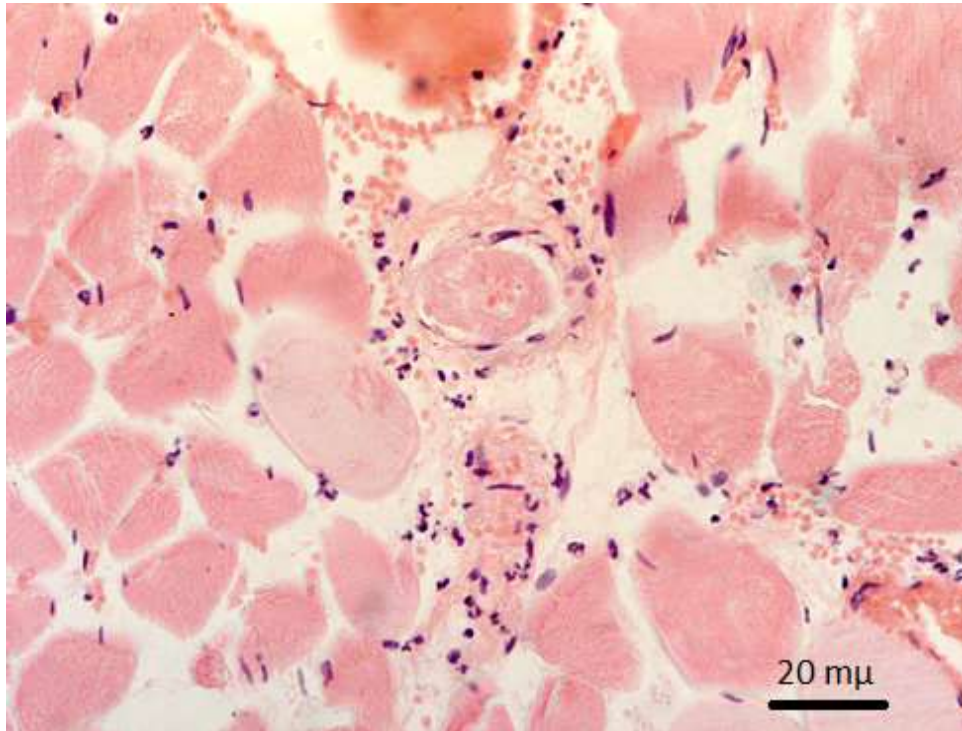


Мал. 3.6. Розпад м'язових волокон з формуванням «булавоподібних» потовщень на кінцях фрагментів. Група щурів з 12 годинною реперфузією. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Зб. х 250.

М'язові волокна розсунуті набряклою рідиною. Кількість і розміри крововиливів практично не відрізняються від таких у другій групі. Однак значна кількість судин, досить великого калібру, виглядає зруйнованою, а капілярне русло як і раніше з різко вираженими ознаками гіперемії.

Також спостерігається збільшення проявів набряку тканин з подальшим розволокненням м'язових волокон (Мал. 3.7). Кількість судин з фібриновими тромбами у їх просвіті дещо зменшується, однак залишається досить великою. Запальна реакція, навпаки, посилюється. Ексудат носить

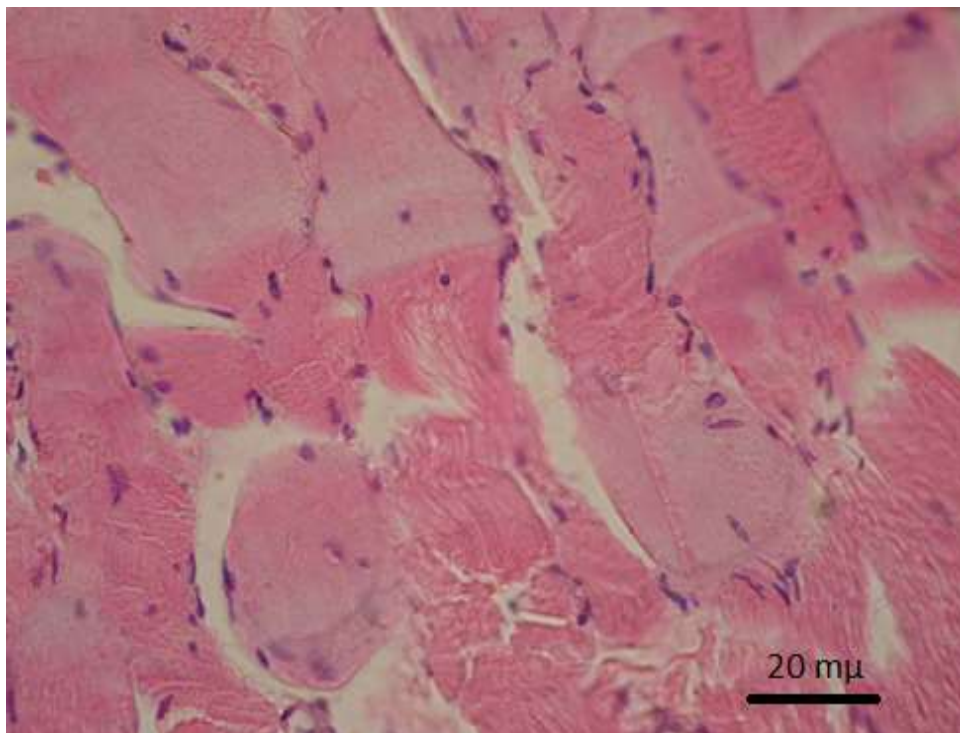
гнійний характер, набуваючи характер флегмонозного запалення, у той час як у другій групі клітини запалення розташовувалися переважно по ходу судин. Описані вище патоморфологічні зміни відповідали більш вираженому, порівняно з 6- годинною реперфузією, дисбалансу неспецифічної протеїназ-інгібіторної системи м'язової тканини, з подальшим зростанням активності неспецифічних протеїназ і зниженням їх інгібіторів.



Мал. 3.7. набряк тканини з розволокненням м'язових волокон . Група щурів з 12 годинною реперфузією. Забарвлення гематоксиліном та еозином. 36. х 250.

У тварин, що зазнали шестигодинної ішемії з 24-годинною реперфузією, відзначається подальше прогресування некротично-деструктивних змін м'язової тканини. М'язові волокна виглядають набряклими, цитоплазма у більшості клітин гомогенізована, з фрагментацією і розпадом на окремі грудочки, або ж зазначається розволокнення за рахунок вираженого набряку міждискових просторів, і тоді вони мають вигляд «пір'я». Ядра м'язових клітин практично повсюди відсутні. Відзначається

зниження і кількості клітин-сателітів. Збільшується кількість розривів м'язових волокон (Мал. 3.8). У даних зонах розірвані фрагменти волокон потощуються і дещо сильніше забарвлюються еозином. Ступінь міжклітинного набряку зростає, а запальні зміни залишаються практично на колишньому рівні; в ексудаті, як і раніше, переважають нейтрофільні лейкоцити (Мал. 3.9). Зіставлення морфологічної картини і біохімічних зрушень у даній групі тварин вказує на максимально виражений дисбаланс протеїназ-інгібіторної системи.



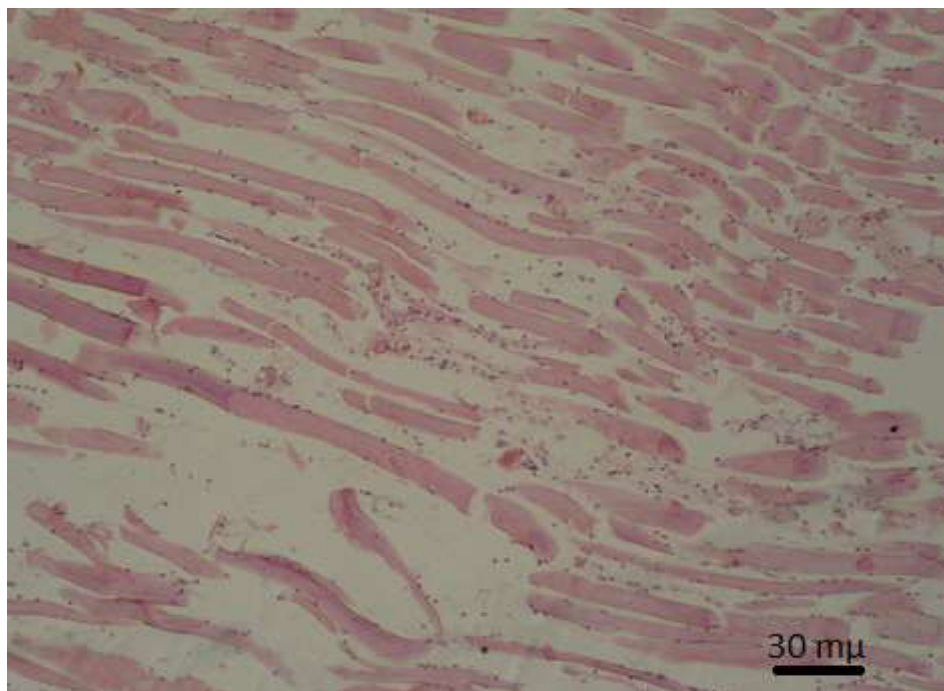
Мал. 3.8. М'язові волокна набряклі, цитоплазма гомогенізована. Набряк міждискових просторів, множинні розриви м'язових волокон. Група щурів з 24 годинною реперфузією. Забарвлення гематоксилином та еозином. 36. x 250.

У даній групі тварин має місце значний дефіцит активності інгібіторів неспецифічних протеїназ м'язової тканини.

Гіперемія капілярного русла як і раніше різко виражена, хоча, на перший погляд, розширення капілярного русла пов'язане більшою мірою зі

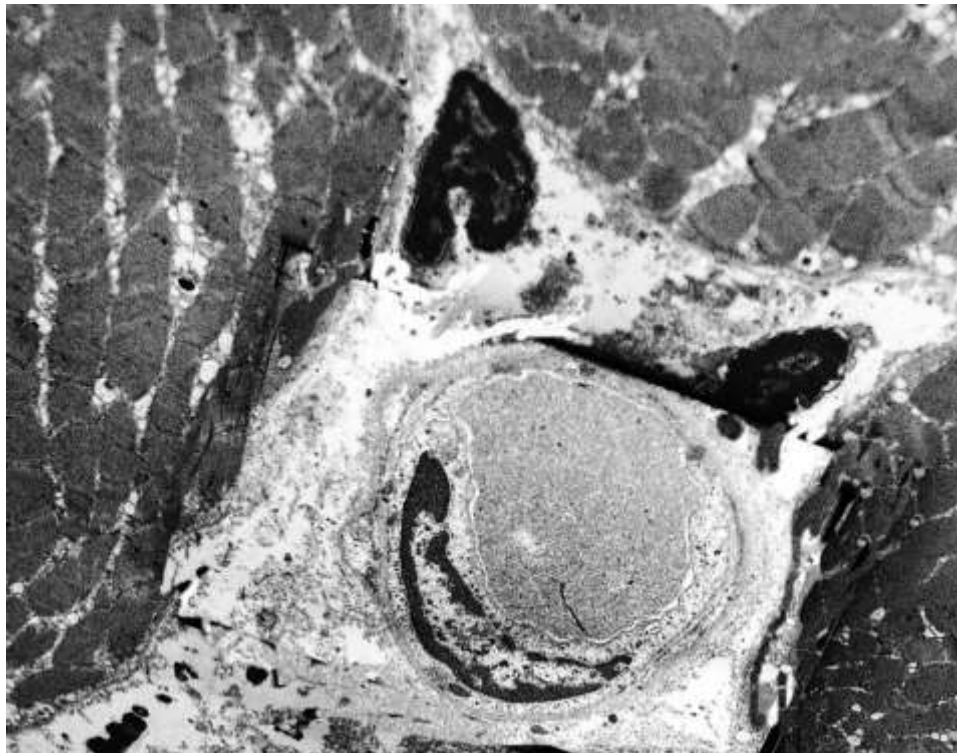
збільшенням кількості плазми у їх просвітах, ніж зі збільшенням кількості клітин крові. Більш великі судини, на різних ділянках, виглядають то зруйнованими, то - повнокровними.

Таким чином, проведені дослідження показали, що при експериментальному синдромі ішемії-реперфузії у скелетної м'язовій тканині мають місце значні морфологічні зміни, які проявляються зникненням поперечної смугастості, внутрішньоклітинним набряком, вираженими у різному ступені ознаками некрозу, запальною реакцією з переважанням в екссудаті нейтрофільних гранулоцитів. Ступінь вираженості даних змін безпосередньо залежить від тривалості реперфузії і супроводжується виснаженням антипротеїназного інгібіторного потенціалу неспецифічних протеїназ та антиоксидантів м'язової тканини.



Мал. 3.9. Міжклітинний набряк. Множинні нейтрофільні лейкоцити. Група щурів з 24 годинною реперфузією. Забарвлення гематоксиліном та еозином. 36. x 100.

Електронно-мікроскопічні дослідження скелетної м'язової тканини ішемізованої кінцівки щурів протягом 6 г без реперфузії, які склали першу групу, виявили мінімальні структурні пошкодження (Мал. 3.10). У даній групі тварин відзначаються ознаки набряку м'язової тканини, за рахунок якого простори між окремими міофібриллами нерівномірно розширені. Також спостерігається велика кількість гетерогенних мітохондрій з просвітленим матриксом між міофібриллами, що відображає компенсаторно-приспосувальні реакції. Ультраструктура ендотелію стінки капілярів збережена, але присутні помірний периваскулярний і інтерстиціальний набряки. У ядрі ендотеліоцита спостерігається нерівномірна конденсація хроматину поблизу каріолеми.

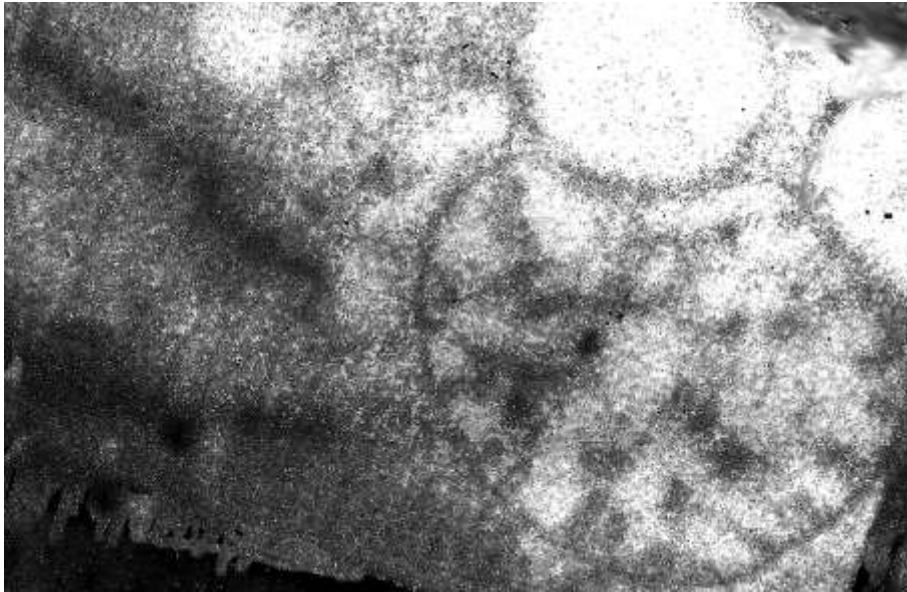


Мал. 3.10. Набряк м'язової тканини, нерівномірне розширення простору між окремими міофібриллами. Група щурів з 6 годинною ішемією. Електринограмма. Збільшення x 6000.

Цитоплазма сильно просвітлена. Просвіт судин заповнений аморфними масами. Периваскулярно розташовані сегментоядрові лейкоцити. Також на деяких ділянках відзначається ушкодження мітохондрій по

вакуолярно-літичному типу. У місцях пошкодження мітохондрій спостерігалася втрата міофібриллами смугастості. (Мал. 3.11).

Дані електронно-мікроскопічні зміни супроводжувалися появою дисбалансу у місцевій неспецифічній протеїназ-інгібіторній системі м'язової тканини і характеризувалися зростанням активності неспецифічних протеїназ на тлі незначного зниження їх інгібіторів. У тварин даної групи мало місце посилення процесів вільнорадикального окислення ліпідів на фоні зниження активності локальних антиоксидантних ферментів.



Мал.3.11. Вакуолярно-літичні пошкодження мітохондрій. Група щурів з 6 годинною ішемією. Електронограмма. Збільшення x 22000.

У другій експериментальній групі, яку склали тварини що перенесли 6 г реперфузії, електронно-мікроскопічні дослідження м'язової тканини виявили набухання мітохондрій, деформацію їх крист аж до їх повної деструкції, релаксацію міофібрил. На деяких ділянках з'являється тенденція до утворення гігантських мітохондрій за рахунок злиття мембран сусідніх мітохондрій (Мал. 3.12). У просвіті деяких мітохондрій відзначається накопичення щільних осміофільних преципітатів, що свідчить про незворотні пошкодження мітохондріальних мембран.

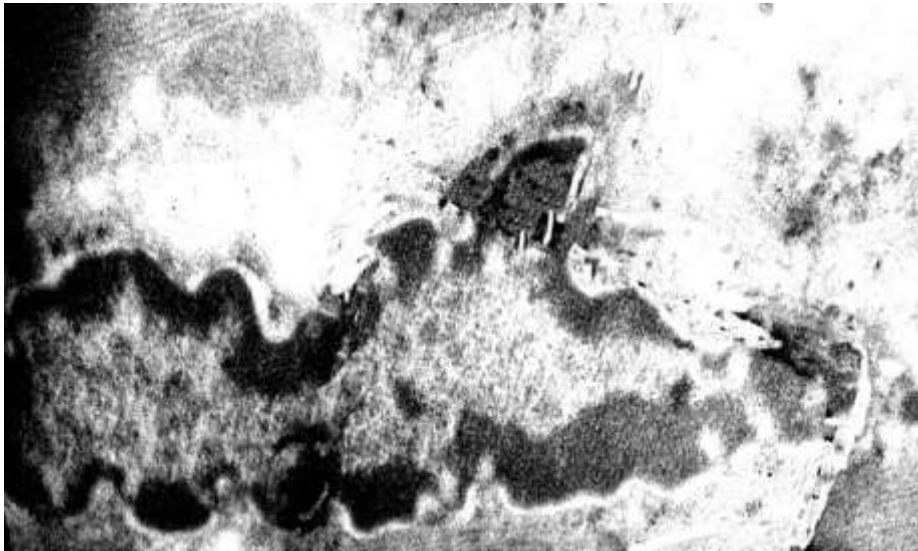
На деяких ділянках відбувається розволокнення і розрив міофібрил за рахунок вираженого набряку. Також спостерігається міоліз.

У третій експериментальній групі тварин, що зазнали шестигодинної ішемії та реперфузії протягом 12 г, на електронограммах скелетної м'язової тканини визначаються яскраво виражені прояви ушкодження м'язів, розволокнення міофібрил, втрата структури мітохондрій. Мають місце розриви сарколеми і вакуолізація міофібрил, відкладення аморфного матеріалу (кальцію) в мітохондріях, руйнування їх крист, конденсація хроматину і поява гетерохроматина у нечисленних ядрах міоцитів та ендотеліоцитів.



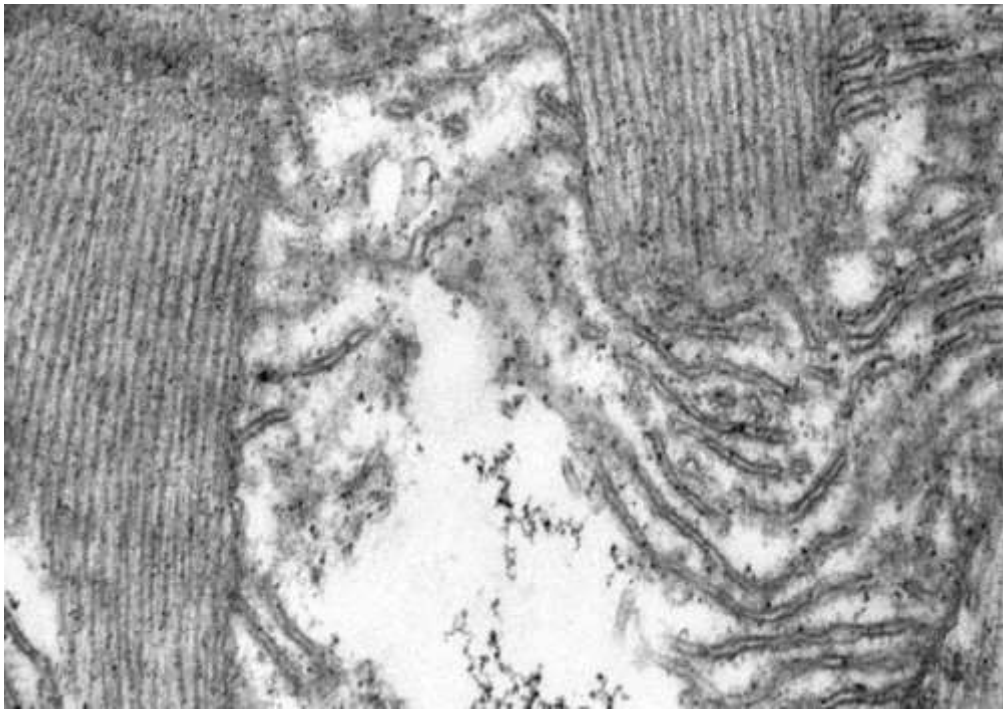
Мал. 3.12. Злиття мембран сусідніх мітохондрій, гігантська мітохондрія. Група щурів з 6 годинною реперфузією. Електронограма. Збільшення $\times 20000$.

У стромі простежується значний набряк і велика кількість поліморфно-ядерних лейкоцитів, які можна спостерігати також і при світловій мікроскопії. При цьому частина міофібрил зберігає відносно нормальну структуру. У ядрі таких клітин зустрічається конденсація хроматину на ядерній мембрані, є велика кількість гострих інвагінатів, що свідчить про виражений цитоплазматичний набряк (Мал. 3.13).



Мал. 3.13. Ядро міоциту. Конденсація хроматину на ядерній мембрані. Група щурів з 12 годинною реперфузією. Електронограмма. Збільшення $\times 18600$.

Описана електронно-мікроскопічна картина відповідає більш вираженому, у порівнянні з попередньою групою, дисбалансу протеїназ-інгібіторної і окислювально-антиоксидантної систем м'язової тканини. При проведенні електронної мікроскопії м'язової тканини у тварин з реперфузійним синдромом тривалістю 24 г відзначається подальше прогресування некротично-деструктивних змін м'язової тканини. Спостерігається посилення явищ міолізу, вакуолізації і деструкції міофібрил. Структура Z-дисків порушена. Між міофібрилами виявляється скупчення аморфних електроннощільних мас. У ці терміни спостерігався набряк і руйнування мітохондрій, відкладення аморфного матеріалу (кальцію) у матриксі мітохондрій (Мал. 3.14), створення гігантських мітохондрій за рахунок руйнування і злиття мембран сусідніх мітохондрій. Зазначалося пошкодження мітохондрій по вакуолярно-літичному типу. Мало місце розволокнення міофібрил за рахунок набряку рідини.



Мал. 3.14. Відкладення аморфного матеріалу (кальцію) у матриксі мітохондрій. Група щурів з 24 годинною реперфузією. Електронограма. Збільшення x 26000.

Спостерігається набряк субсарколемарного простору, деяке розширення саркоплазматичного ретикулума і Т-системи міоцитів, зміна структури саркомерів (непаралельний хід волокон, зони саркомера визначаються погано). Відзначалося значне число гетерогенних конденсованих або набряклих мітохондрій з повністю зруйнованими кристами. Наявність контрактурних пошкоджень свідчить про кальцієве перевантаження міоцитів і гіперактивацію симпатичної нервової системи. Розвивається дисбаланс протеїназ-інгібіторної і окислювально-антиоксидантної систем, у даній групі тварин проявляється максимально вираженим дефіцитом активності інгібіторів неспецифічних протеїназ і локальних антиокисних ферментів м'язової тканини.

Таким чином, світлова та електронна мікроскопія скелетної м'язової тканини при моделюванні ішемії/реперфузії показали, що при розвитку реперфузійного синдрому морфологічна картина супроводжується системними різко вираженими порушеннями мікроциркуляції з розвитком

дегенеративних і деструктивних процесів у м'язовій тканині, наростаючих зі збільшенням тривалості постішемичного періоду. Слід також зазначити, що при експериментальному синдромі ішемії-реперфузії у м'язовій тканині ступінь вираженості змін безпосередньо корелює з виснаженням інгібіторного потенціалу неспецифічних протеїназ та антиоксидантів м'язової тканини.

Основні результати даного розділу опубліковані в наукових працях

1. 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
2. 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
3. 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
4. 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.
5. 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.

РОЗДІЛ 4. ОСОБЛИВОСТІ МОДИФИКАЦІЇ ПАТОФІЗІОЛОГІЧНИХ МЕХАНІЗМІВ ПРИ СИНДРОМІ ІШЕМІЇ/РЕПЕРФУЗІЇ ШЛЯХОМ ФАРМАКОЛОГІЧНОЇ КОРЕКЦІЇ.

Провідна роль системного дисбалансу протеїназ-інгібіторної системи та інтенсифікація процесів вільнорадикального окислення у патогенезі синдрому ішемії/реперфузії стає приводом і викликає інтерес щодо вивчення ефективності поєднаного застосування інгібіторів протеїназ, антиоксидантних і вазопротекторних препаратів для патогенетичної корекції патології, що досліджується. Найбільш перспективним є пошук ефективних засобів серед регуляторів метаболізму, мікроциркуляції, які підвищують стійкість тканин до гіпоксії.

Згідно з даними сучасних досліджень, що при лікуванні ряду патологій найкращий ефект досягається при використанні інгібіторів протеолізу у поєднанні з антиоксидантами [165]. Це пояснюється з точки зору блокування активації протеїназ, калікреїн-кінінової системи, антифібринолітичного ефекту, здійснюваних інгібіторами протеолізу, зниження продукування цитотоксичного супероксид-аніону, інгібування мембранотропних ферментів, які впливають на деградацію фосфоліпідів клітинних мембран, що реалізуються за рахунок властивостей антиоксидантів, а також можливістю блокування окислення інгібіторів протеїназ.

Разом з тим, враховуючи патогенетичні механізми формування синдрому ішемії / реперфузії, у даний час все більшого значення надається вивченню впливу простагландинів і їх синтетичних аналогів для корекції цих станів. Відомо, що простагландин E1 володіє вазодилатуючими і ендотелій-стабілізуючими властивостями, є ефективним інгібітором агрегації тромбоцитів, інгібує активацію нейтрофілів, знижуючи вивільнення вільних радикалів, лізосомальних ферментів, медіаторів хемотаксису, цитокінів [166]. У зв'язку з цим, включення його у лікувальний комплекс поряд з

використанням інгібіторів протеолізу і антиоксидантів може потенційно розширити спектр впливу на основні ланки патогенезу синдрому ішемії/реперфузії і підвищити ефективність лікування та виживання пацієнтів з критичними станами.

Саме цим пояснюється наш вибір інгібітора протеїназ аprotиніну, антиоксиданту кверцетину і аналогу простагландину E1 для корекції метаболічних порушень, які виникають при розвитку РС.

4.1 Патолофізіологічні зміни процесів протеолізу у скелетних м'язах та плазмі крові при синдромі ішемії/реперфузії в умовах застосування кверцетину, аprotиніну, простагландину E1 та їх комбінованої дії

Попередніми дослідженнями було встановлено, що розвиток синдрому ішемії/реперфузії супроводжувався суттєвими поведінковими реакціями, підвищенням активності трипсиноподібних протеїназ на тлі зниження антипротеїназної активності протягом всього терміну спостереження (з максимумом значення у термін 48 г після зняття джгутів). Використання лікарських препаратів при моделюванні синдрому ішемії/реперфузії сприяло модифікації перебігу патологічного процесу. Так, до 12 г після відновлення кровообігу у кінцівках у переважної більшості щурів, які отримували лікування зазначеними препаратами, тяжкість постішемічних розладів була менш вираженою, ніж у нелікованій групі. Тварини більш активно реагували на зовнішні подразники, деякі з них пересувалися по клітці, пили воду. Цианоз і набряклість шкірних покривів були незначними.

Після 24 г спостереження стан більшості щурів дещо покращився, вони пересувалися по клітці за допомогою передніх кінцівок, пили воду, їли їжу. На зовнішні подразники реагували добре, видимі слизові оболонки мали більш світлий рожевий колір. Надалі стан основної частини тварин покращився.

Проведені біохімічні дослідження показали тенденцію до нормалізації ЕПА сироватки на тлі використання інгібітора протеїназ апротиніна для корекції 12-годинного реперфузійного синдрому (таб. 4.1.1). При цьому рівень ЕПА був у 2,8 рази вище аналогічного показника групи тварин без лікування, однак дещо нижче значень групи здорових тварин. Використання водорозчинної форми кверцетину надавало аналогічний вплив на еластазоподібну активність сироватки крові щурів з синдромом ішемії / реперфузії. Введення аналога простагландину E1 також сприяло нормалізації рівня ЕПА. Одночасне застосування антиоксиданту і інгібітора протеїназ надавало більш виражену, у порівнянні з ізольованим застосуванням препаратів, дію, проте рівень ЕПА все ще не досягав значень групи інтактних тварин. Використання потрібної комбінації: антиоксиданту, інгібітора протеїназ і аналога простагландину E1 було більш ефективним у цьому відношенні.

Результати досліджень показали, що застосування інгібітора протеїназ для корекції 12-годинного реперфузійного синдрому сприяло зниженню ТПА сироватки крові на 24,7% ($p < 0,001$) порівняно з аналогічним показником групи тварин без лікування, при цьому тріпсіноподібна активність в 2,1 рази перевищувала контрольні параметри. Введення водорозчинної форми кверцетину для патогенетичної корекції зазначеного стану викликало більш істотне зниження рівня ТПА - на 60,3% ($p < 0,001$) у порівнянні зі значеннями групи тварин без лікування, при цьому даний показник достовірно не відрізнявся від аналогічного показника інтактної групи. Використання простагландину E1 також сприяло нормалізації рівня ТПА сироватки крові: рівень даного показника знизився на 58,9% ($p < 0,001$) у порівнянні зі значеннями групи тварин без лікування і достовірно не відрізнявся від аналогічного показника групи контролю.

Найбільш ефективним виявилось поєднане застосування препаратів. Так, використання антиоксиданту і інгібітора протеїназ сприяло зниженню ТПА на 71,2% ($p < 0,001$) у порівнянні зі значеннями групи тварин без

лікування. Одночасне застосування антиоксиданту, інгібітора протеїназ та простагландину E1 сприяло зниженню ТПА на 64,8% ($p < 0,001$) у порівнянні з показником групи нелікованих тварин. При цьому показник тріпсиноподібної активності практично не відрізнявся від значень групи контролю.

Таблиця 4.1.1

Активність протеолітичних ферментів та їх інгібіторів у плазмі крові за умов корекції фармакологічними препаратами

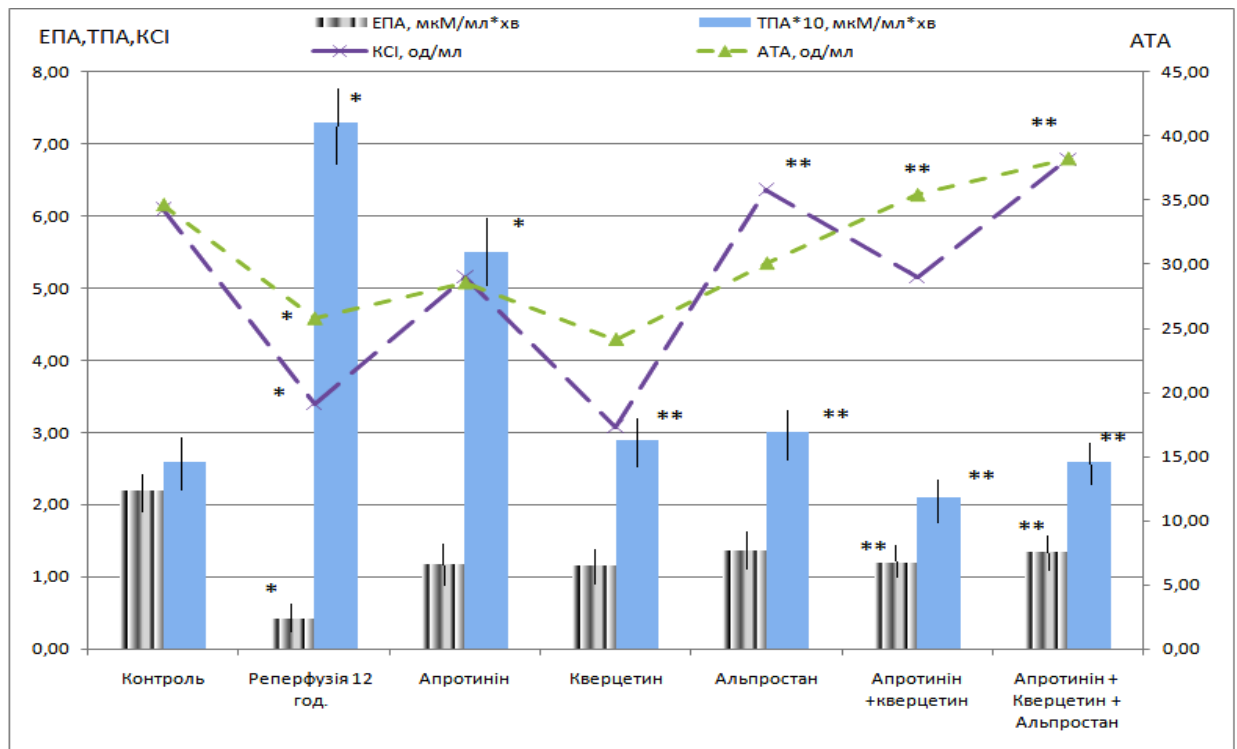
| Умови досліджу | ЕПА (мкМ/мл×хв), M±m | ТПА (мкМ/мл×хв), M±m | АТА (Од/мл), M±m | КСІ (Од/мл), M±m |
|---|----------------------------|----------------------------|------------------------|------------------------|
| Контрольна група (n=18) | 2,19±0,14 | 0,26±0,06 | 34,67±1,57 | 6,10±0,49 |
| 12 годин реперфузія (n=10) | 0,41±0,02 | 0,73±0,01 | 25,76±1,76 | 3,40±0,30 |
| Апротинін 20000 од/кг (n=10) | 1,17±0,08 ***** | 0,55±0,06 ***** | 28,57±2,70 | 5,16±0,44 **** |
| Кверцетин 10 мг/кг (n=10) | 1,15±0,14 ***** | 0,29±0,07 ***** | 24,13±2,62 | 3,08±0,23 |
| Аналог простагландину E1 20 мг/кг (n=8) | 1,37±0,16 ***** | 0,30±0,05 * | 30,08±2,18 | 6,37±0,75 **** |
| Апротинін + Кверцетин (n=10) | 1,20±0,10 ***** | 0,21±0,02 | 35,43±1,65 **** | 5,16±0,45 **** |
| Апротинін + Кверцетин + Аналог простагландину E1 (n=10) | 1,35±0,09 ***** | 0,26±0,03 | 38,29±0,84 **** | 6,79±0,44 ***** |

Примітка. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$, **** $p < 0,001$, ***** $p < 0,0005$,
***** $p < 0,0001$ порівняно з групою без протективних середників

При використанні інгібітора протеїназ для патогенетичної корекції досліджуваного стану була відзначена тенденція до зростання АТА сироватки крові порівняно з показниками нелікованої групи, при цьому даний показник залишався на 10,9% ($p > 0,5$) нижче рівня групи інтактних щурів. При використанні антиоксиданту кверцетину антитриптична активність незначно і недостовірно знизилася у порівнянні з показником тварин без лікування. При моделюванні реперфузійного синдрому тривалістю 12 годин на тлі поєднаного використання водорозчинної форми кверцетину та інгібітора протеїназ спостерігався достовірний ріст АТА на 37,5% ($p < 0,001$) у порівнянні зі значеннями групи без лікування. При цьому рівень АТА був вище контрольних значень на 2,2% ($p > 0,5$). «Потрійна» комбінація: використання антиоксиданту, інгібітора протеїназ та простагландину E1 супроводжувалося найбільш вираженим збільшенням антитриптичної активності: на 48,6% ($p < 0,001$) вище у порівнянні зі значеннями групи без лікування; при цьому показник тріпсिनоподібної активності був вище значень групи контролю на 10,4% ($p < 0,05$).

Застосування інгібітора протеїназ апротиніна для патогенетичної корекції 12-годинного реперфузійного синдрому виявило збільшення рівня КСІ на 51,8% ($p < 0,001$) у порівнянні з групою без лікування. При цьому рівень кислотостабільних інгібіторів протеїназ був нижче контрольних значень на 15,4%, однак ці зміни не були достовірними. Використання водорозчинної форми антиоксиданту кверцетину не дало істотного ефекту, при цьому не було виявлено достовірних відмінностей між показником цієї групи і групи без лікування. Рівень КСІ у цій групі залишався на 49,5% ($p < 0,001$) нижче показників здорових тварин. Більш ефективним виявилось застосування аналога простагландину E1, яке викликало зростання рівня КСІ на 87,4% ($p < 0,001$) порівняно з показником групи без лікування. Рівень КСІ при цьому достовірно не відрізнявся від аналогічного показника контролю. У групі з поєднаним використанням інгібітора протеїназ та антиоксиданту також мало місце підвищення кількості КСІ сироватки крові на 51,8% (p

<0,001) у порівнянні з показником групи без лікування і достовірно не відрізнялося від показника здорових щурів. У групі з комбінованим використанням антиоксиданту, інгібітора протеїназ і аналога простагландину Е1 було відзначено найбільш значне збільшення рівня КСІ, який у 2 рази перевищив значення нелікованої групи і був дещо вищим показника групи контролю.



Мал. 4.1. 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.

Таким чином, експериментальними дослідженнями було виявлено, що патогенетична терапія РС тривалістю 12 годин з використанням інгібіторів протеазних і антиоксидантних препаратів сприяє нормалізації як протеолітичної активності, так і рівня інгібіторів протеїназ сироватки крові (Мал. 4.1). Слід зазначити, при одночасному використанні інгібітора протеїназ, антиоксиданту і аналога простагландину Е1 відзначалася більш

виражена, порівняно з ізольованим застосуванням препаратів, позитивна динаміка протеолітичної активності сироватки крові.

Введення апротиніну для корекції реперфузійного ураження супроводжувалося значним зниженням еластазоподібної активності супернатантів гомогенатів скелетних м'язів, при цьому рівень ЕПА був на 39,6% ($p < 0,001$) нижче показника групи тварин без лікування і наблизився до показника групи інтактних тварин (табл. 4.1.2). Використання водорозчинної форми кверцетину зробило менш виражений ефект. Так, у даній групі відбулося зниження ЕПА на 22,7% ($p < 0,01$) порівняно з аналогічним показником групи тварин без лікування, при цьому рівень ЕПА залишався на 22,5% ($p < 0,001$) вище значень групи контролю. Введення аналога простагландину E1 також виявилось недостатньо ефективним: рівень еластазоподібної активності був на 18,3% ($p < 0,001$) нижче значень групи з РС без лікування, залишаючись при цьому на 29,4% ($p < 0,001$) вище значень групи здорових тварин. Використання комбінації антиоксиданту і інгібітора протеїназ сприяло більш вираженій нормалізації ЕПА, рівень якої знизився на 29,1% ($p < 0,001$) у порівнянні з показником щурів без лікування і достовірно не відрізнявся від значень контрольної групи.

При одночасному застосуванні антиоксиданту, інгібітора протеїназ і аналога простагландину E1 також було відзначено ще більш виражений вплив на рівень ЕПА, який знизився на 32,9% ($p < 0,001$) у порівнянні з показником щурів без лікування і достовірно не відрізнявся від значень групи інтактних тварин.

Експериментальними дослідженнями встановлено, що застосування інгібітора протеїназ апротиніна для корекції 12-годинного реперфузійного синдрому також дало найбільш виражений ефект і сприяло зниженню ТПА супернатантів гомогенатів скелетних м'язів у 2,9 рази у порівнянні з аналогічним показником групи тварин без лікування.

**Активність протеолітичних ферментів та їх інгібіторів у
гомогенатах скелетних м'язів за умов корекції
фармакологічними препаратами**

| Умови досліджу | ЕПА (нмоль/мл/хв) M±m | ТПА (нмоль/мл/хв) M±m | АТА (мкмоль/мг) M±m | КСІ (мкмоль/мг) M±m |
|---|-----------------------------|-----------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Контрольна група (n=18) | 34,20±1,77 | 7,40±0,32 | 0,07±0,005 | 1,52±0,30 |
| 12 год. реперфузія (n=10) | 54,19±4,49 | 12,03±1,49 | 0,17±0,02 | 0,51±0,09 |
| Апротинін 20000 од/кг (n=10) | 32,76±1,02 **** | 4,04±0,88 *** | 0,28±0,03 | 0,80±0,16 |
| Кверцетин 10 мг/кг (n=10) | 41,90±2,35 ** | 8,17±0,33 ***** | 0,12±0,02 ***** | 0,76±0,02 |
| Аналог простагландину Е1 20 мг/кг (n=8) | 44,26±3,31 *** | 7,31±0,36 ***** | 0,07±0,01 *** | 0,58±0,06 |
| Апротинін + Кверцетин (n=10) | 38,39±3,23 **** | 5,68±0,69 ***** | 0,25±0,02 *** | 1,53±0,19 ***** |
| Апротинін + Кверцетин + Аналог простагландину Е1 (n=10) | 36,36±1,69 **** | 5,72±0,41 ***** | 0,09±0,01 * | 1,06±0,19 * |

Примітка. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,005, ****p<0,001, *****p<0,0005,
*****p<0,0001 порівняно з групою без протективних середників

При цьому даний показник став на 45,4% ($p < 0,001$) нижче показника контрольної групи. Введення водорозчинної форми кверцетину сприяло менш істотному зниженню тріпсиноподібної активності, рівень якої знизився на 32,0% ($p < 0,001$) у порівнянні зі значеннями групи тварин без лікування і достовірно не відрізнявся від аналогічного показника контролю.

Застосування аналога простагландину E1 викликало зниження рівня ТПА на 39,2% ($p < 0,01$) у порівнянні з показником без лікування. Сумісне використання антиоксиданту і інгібітора протеїназ сприяло значному падінню тріпсиноподібної активності, рівень якої знизився на 52,8% ($p < 0,001$) у порівнянні з показником щурів без лікування і став на 23,24% ($p < 0,01$) нижче рівня тріпсиноподібної активності здорових тварин. При комбінованому застосуванні антиоксиданту, інгібітора протеїназ і аналога простагландину E1 також спостерігалось зниження рівня ТПА, який був на 52,4% ($p < 0,001$) нижче показника щурів без лікування і на 22,7% ($p < 0,001$) нижче показника контрольної групи.

Корегуючий вплив досліджуваних препаратів було відзначено і щодо підвищення антипротеїназного інгібіторного потенціалу супернатантів гомогенатів скелетних м'язів, хоча ефективність впливу була різною. Так, застосування інгібітора протеїназ апротиніна для корекції 12-годинного реперфузійного синдрому дало виражений ефект і сприяло підвищенню рівня АТА в супернатантах гомогенатів скелетних м'язів на 64,7% ($p < 0,001$) порівняно з аналогічним параметром групи тварин з РС без лікування. При цьому даний показник виявився в 4 рази вище показника інтактних тварин.

Введення водорозчинної форми кверцетину викликало менш значне зростання АТА, даний показник достовірно не відрізнявся від показника групи тварин без лікування і був на 71,43% ($p < 0,001$) вище аналогічного показника контролю. Застосування аналога простагландину E1 також не зробило істотного впливу на рівень АТА. Даний показник залишився на 58,8% ($p < 0,01$) нижче рівня антитриптичної активності щурів без лікування і при цьому достовірно не відрізнявся від значень контрольної групи. Сумісне

використання антиоксиданту і інгібітора протеїназ сприяло значному зростанню АТА, який на 47,0% ($p < 0,001$) перевищив показник щурів без лікування і у 3,5 рази - показник групи інтактних тварин. Комбіноване застосування антиоксиданту, інгібітора протеїназ і аналога простагландину не викликало значного приросту антитриптичної активності, яка виявилася на 47,0% ($p < 0,001$) нижче показника щурів без лікування і виросла на 28,5% ($p < 0,001$) порівняно з показником групи здорових тварин.

Експериментальними дослідженнями було встановлено, що патогенетична терапія реперфузійного синдрому сприяла зростанню рівня КСІ в супернатантах гомогенатів скелетних м'язів щурів у порівнянні з групою без лікування. Так, застосування інгібітора протеїназ апротиніна викликало підвищення КСІ на 56,9% ($p < 0,001$) порівняно з аналогічним показником групи тварин без лікування. При цьому рівень кислотостабільних інгібіторів протеїназ залишався на 47,4% ($p < 0,05$) нижче показника інтактних тварин. Введення водорозчинної форми кверцетину викликало менш виражене зростання рівня КСІ, який збільшився на 49,2% ($p < 0,001$) порівняно з показником групи тварин без лікування, але виявився на 50,0% ($p < 0,001$) нижче аналогічного показника контрольної групи. Застосування аналога простагландину E1 не зробило істотного впливу на рівень КСІ. У цій групі була відзначена тенденція до зростання кислотостабільних інгібіторів протеїназ у порівнянні з групою щурів без лікування, при цьому рівень КСІ був на 61,8% ($p < 0,001$) нижче контрольних значень.

Одночасне введення препаратів зробило найбільш виражений вплив на рівень КСІ, сприяючи його нормалізації. Так, застосування антиоксиданту і інгібітора протеїназ сприяло значному зростанню КСІ, який у 3 рази перевищив показник щурів без лікування і досяг рівня кислотостабільних інгібіторів протеїназ контрольної групи. Одночасне застосування антиоксиданту, інгібітора протеїназ і аналога простагландину також викликало виражене підвищення КСІ, рівень яких у 2 рази перевищив

показник щурів з РС без лікування і при цьому достовірно не відрізнявся від показника групи здорових тварин.

Таким чином, в ході проведених експериментальних досліджень було виявлено, що застосування інгібітора протеїназ апротиніна надавало найбільш виражений ефект щодо зниження протеазної активності (ЕПА і ТПА) в супернатантах гомогенатів скелетних м'язів щурів з моделлю реперфузійного синдрому тривалістю 12 годин. При цьому поєднана дія препаратів викликала максимальне зростання інгібіторної активності у супернатантах гомогенатів скелетних м'язів.

4.2. Стан вільнорадикального окислення ліпідів крові та гомогенатів м'язів при моделюванні синдрому ішемії/реперфузії, на тлі медикаментозної корекції

У результаті проведених експериментів було встановлено, що моделювання синдрому ішемії/реперфузії супроводжується активацією вільнорадикального окислення ліпідів, про який свідчить збільшення рівня ТБК-АП у порівнянні з показниками контрольної групи. Так, рівень ТБК-АП у сироватці крові з розвитком ішемії і 6-годинної реперфузії кінцівок перевищив показник групи контрольних щурів більш ніж у 2 рази. Збільшення тривалості реперфузійного періоду супроводжувалося подальшим зростанням ТБК-активних продуктів сироватки крові: у 2,3 рази. Застосування антиоксидантного препарату кверцетину сприяло зниженню концентрації ТБК-активних продуктів у групі з реперфузійним ураженням. Так, при моделюванні реперфузійного синдрому на тлі застосування водорозчинної форми кверцетину вміст ТБК-АП був на 17,9% ($p < 0,01$) нижче, ніж у тварин, які піддавалися аналогічному впливу без введення препарату (табл. 4.2.1). Проте рівень ТБК-активних продуктів залишався вище контрольних значень на 89,3% ($p < 0,001$).

Таблиця 4.2.1

**Процеси ПОЛ та активність ферментів антиоксидантного захисту у
плазмі крові за умов фармакологічної корекції**

| Умови досліджу | ТБК-похідні (нмоль/мг), M±m | КПА (нмоль/мл×с), M±m | СОД (Од/мг), M±m | ЦП (мг/мл), M±m |
|---|-----------------------------------|-----------------------------|------------------------|-----------------------|
| Контрольна група (n=18) | 31,00 ± 0,4 | 0,38 ± 0,05 | 0,79 ± 0,05 | 208,60±17,2 |
| 12 годин реперфузія (n=10) | 71,45 ± 4,18 | 0,63 ± 0,07 | 0,40 ± 0,06 | 295,84±11,85 |
| Апротинін 20000 ОД/кг (n=10) | 62,95 ± 2,51 | 0,58 ± 0,13 | 0,41 ± 0,06 | 294,96 ± 6,27 |
| Кверцетин 10 мг/кг (n=10) | 58,68 ± 2,08 ** | 0,41 ± 0,11 | 0,51 ± 0,06 | 210,18±11,84 **** |
| Аналог простагландину Е1 20 мг/кг (n=8) | 57,16 ± 1,62 ** | 0,42 ± 0,09 * | 0,45 ± 0,11 | 243,69±12,26 ** |
| Апротинін + Кверцетин (n=10) | 58,41 ± 1,19 ** | 0,39 ± 0,05 ** | 0,59 ± 0,08 ** | 227,32 ± 8,04 **** |
| Апротинін + Кверцетин + Аналог простагландину Е1 (n=10) | 46,89 ± 1,61 **** | 0,38 ± 0,05 ** | 0,77 ± 0,07 **** | 223,01±14,33 **** |

Примітка: *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,005, ****p<0,001, *****p<0,0005, *****p<0,0001 порівняно з групою без протективних середників

Аналогічний вплив на ПОЛ надавала комбінація кверцетину з апротиніном. Ізольоване введення апротиніну не зробило достовірного впливу на рівень ТБК-АП сироватки крові при моделюванні реперфузії протягом 12 годин. Введення аналога простагландину Е1 зробило більш

істотний вплив на рівень вторинних продуктів ПОЛ. Так, при застосуванні альпростану ТБК-АП спостерігалась тенденція до зниження на 20,0% у порівнянні з групою тварин з РС без корекції. При цьому рівень вільнорадикального окислення залишався підвищеним: на 84,4% ($p < 0,001$) вище показників контролю.

Найбільш ефективно пригнічувала зростання в результаті ішемічно-реперфузійного пошкодження активність вільних радикалів «потрійна» комбінація. ТБК-АП при цьому знизилися на 34,4% ($p < 0,001$).

Експериментальними дослідженнями було встановлено, що при моделюванні реперфузійного синдрому до 12-ти годин РС спостерігалось зменшення супероксиддисмутази на 49,4% ($p < 0,001$) порівняно з показниками контрольної групи. Застосування антиоксидантного препарату кверцетин супроводжувалося тенденцією до збільшення вмісту СОД: на 27,5% ($p > 0,25$) вище, ніж у тварин, які піддавалися аналогічному впливу без введення препарату, проте рівень СОД залишався нижче контрольних значень на 35,4% ($p < 0,001$). Інгібітор протеїназ апротинін не чинив значимого достовірного ефекту на кількість супероксиддисмутази у крові щурів з РС 12 годин. Аналог простагландину E1 діяв у відношенні вмісту антиоксидантів крові дещо краще, проте отримані дані не були достовірними. Одночасне застосування кверцетину і апротиніну було значно ефективнішим. При цьому концентрація супероксиддисмутази зросла на 47,5% ($p < 0,05$) у порівнянні з аналогічним ураженням без застосування препаратів і залишалось на 25,3% ($p < 0,05$) нижче, ніж у тварин контрольної групи. Комбіноване використання антиоксидантна, інгібітора протеїназ і аналога простагландину E1 виявлялося щодо впливу на ендогенний антиоксидантний потенціал найбільш значущим і ефективним. Застосування вищевказаної комбінації сприяло нормалізації рівня СОД, значення якого не відрізнялися від параметрів контрольної групи.

У ході проведених досліджень було виявлено, що 12-годинний реперфузійний синдром супроводжувався компенсаторним збільшенням

таких антиоксидантних ферментів, як каталаза і церулоплазмін. Введення екзогенного антиоксиданту кверцетину сприяло тенденції до нормалізації значень КПА і ЦП, які наближалися до контрольних. Аналог простагландину E1 діяв відносно КПА аналогічним чином, на відміну від інгібітора протеїназ апротиніна, введення якого не супроводжувалося значущими змінами каталазоподібної активності.

Комбіноване використання препаратів надавало щодо КПА найбільш виражену дію: каталазоподібна активність при цьому поверталася до нормальних значень.

Апротинін не чинив достовірного впливу на рівень церулоплазміну плазми крові: значення ЦП практично не відрізнялися від даних групи з РС без лікування. Аналог простагландину E1 сприяв відновленню базових значень основного антиоксиданту плазми крові, однак, комбіноване використання препаратів патогенетичної корекції надавало більш виражену дію відносно нормалізації церулоплазміну.

Експериментальними дослідженнями було встановлено, що при моделюванні реперфузійного синдрому до 12-ти годин спостереження у супернатантах гомогенатів скелетних м'язів на тлі використання апротиніну мало місце недостовірне зниження рівня ТБК-АП у порівнянні з щурами без лікування (табл. 4.2.2). При цьому рівень ТБК-активних продуктів у групі щурів, яким вводили інгібітор протеїназ апротинін, залишався вище показника здорових тварин на 50,4% ($p < 0,001$).

У групі експериментальних тварин, яким вводили водорозчинну форму кверцетину, рівень ТБК-АП залишався досить високим: на 56,3% ($p < 0,001$) вище аналогічного показника інтактних тварин. У групі із застосуванням аналога простагландину E1 рівень ТБК-АП був на 34,6% ($p < 0,001$) вище значень контролю. У групі щурів, яким одночасно вводили водорозчинну форму кверцетину та інгібітор протеїназ апротинін, рівень ТБК-активних продуктів був на 36,0% ($p < 0,01$) вище показника групи інтактних тварин. Комбіноване застосування антиоксиданту, інгібітора

протеїназ і аналога простагландину виявлялося найбільш ефективним щодо зниження вільнорадикального окислення ліпідів.

Таблиця 4.2.2

**Стан вільнорадикального окислення ліпідів та активність ферментів
антиоксидантного захисту у гомогенатах скелетних м'язів за умов
фармакологічної корекції**

| Умови дослідів | ТБК-похідні (нмоль/мг), M±m | КПА (нмоль/гр × с), M±m | СОД (Од/мг), M±m | ЦП (мг/мл), M±m |
|--|-----------------------------------|-------------------------------|------------------------|-----------------------|
| Контрольна група (n=18) | 2,86 ± 0,32 | 18,21 ± 2,17 | 52,15 ± 5,94 | 25,05 ± 1,83 |
| 12 год. реперфузія (n=10) | 4,63 ± 0,41 | 8,73 ± 1,39 | 35,55 ± 3,42 | 28,86 ± 2,54 |
| Апротинін 20000 ОД/кг (n=10) | 4,30 ± 0,24 | 18,12 ± 3,03 **** | 29,75 ± 2,72 | 14,82 ± 1,15 ***** |
| Кверцетин 10 мг/кг (n=10) | 4,47 ± 0,44 | 28,08 ± 2,60 ***** | 67,89 ± 9,93 * | 17,49 ± 1,13 ***** |
| Аналог простагландину Е1 20 мг/кг (n=8) | 3,85 ± 0,20 | 25,53 ± 3,01 ***** | 26,16 ± 5,64 * | 18,14 ± 1,13 ***** |
| Апротинін + Кверцетин (n=10) | 3,89 ± 0,31 | 21,04 ± 2,61 **** | 41,52 ± 4,37 | 17,41 ± 1,85 **** |
| Апротинін + Кверцетин + Аналог простагландину Е1 (n=10) | 3,67 ± 0,67 | 17,77 ± 2,71 * | 75,10 ± 1,11 *** | 28,06 ± 2,12 |

Примітка: *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,005, ****p<0,001, *****p<0,0005,
*****p<0,0001 порівняно з групою без протективних середників

Патогенетична терапія 12-годинного реперфузійного синдрому сприяла підвищенню каталазоподібної активності, яка була значно знижена у супернатантах гомогенатів скелетних м'язів в результаті ішемічно-реперфузійного пошкодження. Так, використання інгібітора протеїназ апротиніна викликало збільшення КПА у 2 рази у порівнянні з групою без лікування, при цьому даний показник досяг рівня КПА інтактних тварин.

Більш виражений вплив на КПА зробило введення водорозчинної форми кверцетину: у супернатантах гомогенатів скелетних м'язів щурів рівень КПА виріс у 3,2 рази у порівнянні з щурами без лікування і на 54,2% ($p < 0,01$) перевищив показник контрольної групи.

Також істотний вплив на каталазоподібну активність зробило введення аналога простагландину E1. У цій групі рівень КПА виріс у 3 рази у порівнянні з тваринами без лікування і на 40,2% ($p < 0,01$) порівняно з показником групи здорових тварин.

Одночасне застосування антиоксиданту і інгібітора протеїназ сприяло підвищенню КПА у 2,4 рази у порівнянні з групою без лікування. При цьому даний показник достовірно не відрізнявся від аналогічного показника контролю. У групі щурів з використанням «потрійної» комбінації: антиоксиданту, інгібітора протеїназ і аналога простагландину рівень КПА у 2,4 рази перевищив показник нелікованих тварин і практично не відрізнявся від показника групи здорових тварин.

Використання інгібітора протеїназ для патогенетичної корекції реперфузійного синдрому не дало істотного впливу на рівень СОД в супернатантах гомогенатів скелетних м'язів. У цій групі супероксиддисмутаза була на 42,9% ($p < 0,01$) нижче показника групи інтактних тварин. Застосування водорозчинної форми антиоксиданту кверцетину зробило більш виражений вплив на рівень СОД. Супероксиддисмутаза у даній групі у 1,9 рази перевищила показник нелікованих тварин і досягла рівня контрольної групи. Введення аналога

простагландину E1 не дало значущого ефекту на кількість СОД, яка була на 49,0% ($p < 0,01$) нижче показника групи здорових тварин.

Одночасне введення антиоксиданту, інгібітора протеїназ і аналога простагландину надавало виражений ефект щодо підвищення супероксиддисмутази в супернатантах гомогенатів скелетних м'язів. Так, рівень супероксиддисмутази у даній групі у 2,1 рази перевищив показник щурів без лікування і на 44,0% ($p < 0,01$) показник групи інтактних тварин.

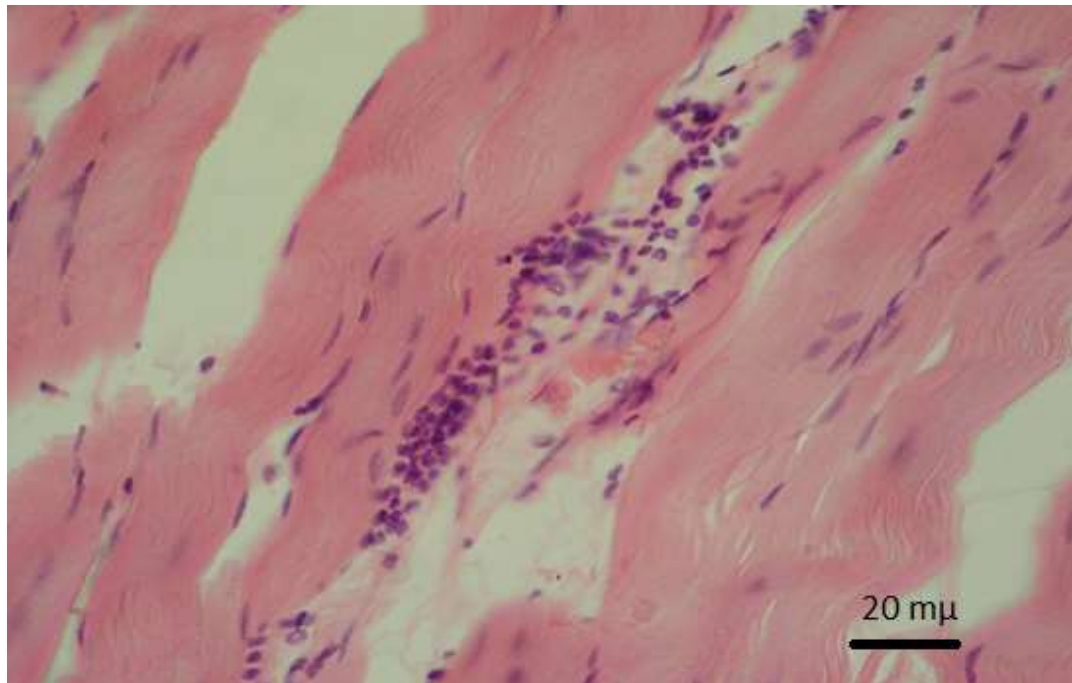
Підводячи підсумок даного підрозділу, необхідно відзначити провідну роль неконтрольованої активації процесів вільнорадикального окислення ліпідів у патогенезі реперфузійного синдрому. Моделювання зазначеної патології призводить до вираженого зростання активності продуктів перекісного окислення ліпідів як на системному рівні - у сироватці крові, так і локально - у скелетної м'язовій тканині. Ці зміни супроводжуються виснаженням антиоксидантного потенціалу. Порівняльний аналіз результатів ізольованого та поєднаного застосування кверцетину, апротиніна і альпростану дозволяє зробити висновок, що поєднане застосування препаратів є більш ефективним щодо підтримки стану антиоксидантної системи в умовах розвитку зазначеної патології.

4.3. Характер патоморфологічних та ультраструктурних змін скелетних м'язів при синдромі ішемії/реперфузії в умовах застосування кверцетину, апротиніну, простагландину E1 та їх комбінованої дії

Мікроскопічні дослідження скелетної м'язової тканини ішемізованої кінцівки щурів через 12 г після реперфузії на тлі корекції інгібітором протеїназ апротинін показали досить різноманітну морфологічну картину. Є ділянки, у яких переважають ознаки некрозу, які характеризуються втратою смугастості, гомогенізацією і фрагментацією цитоплазми клітин і м'язових волокон в цілому. Також спостерігаються виражені ознаки набряку і запальної реакції, а більшість судин у таких ділянках виглядають

розширеними і спустошеними. Але є й інші ділянки, в яких м'язові клітини хоча і не мають поперечної смугастості, але так само і не мають ознак розпаду цитоплазми і порушення цілісності клітинної мембрани, і, відповідно, немає фрагментації м'язових волокон.

Зміни з боку судин у таких ділянках зводилися до нерізко вираженого повнокров'я і ознакам спазмів частини судин. При цьому запальна інфільтрація у більшості випадків локалізувалася по ходу судинних пучків і мала помірну вираженість (Мал. 4.2). У зонах розпаду відзначається поява невеликих скупчень макрофагів.

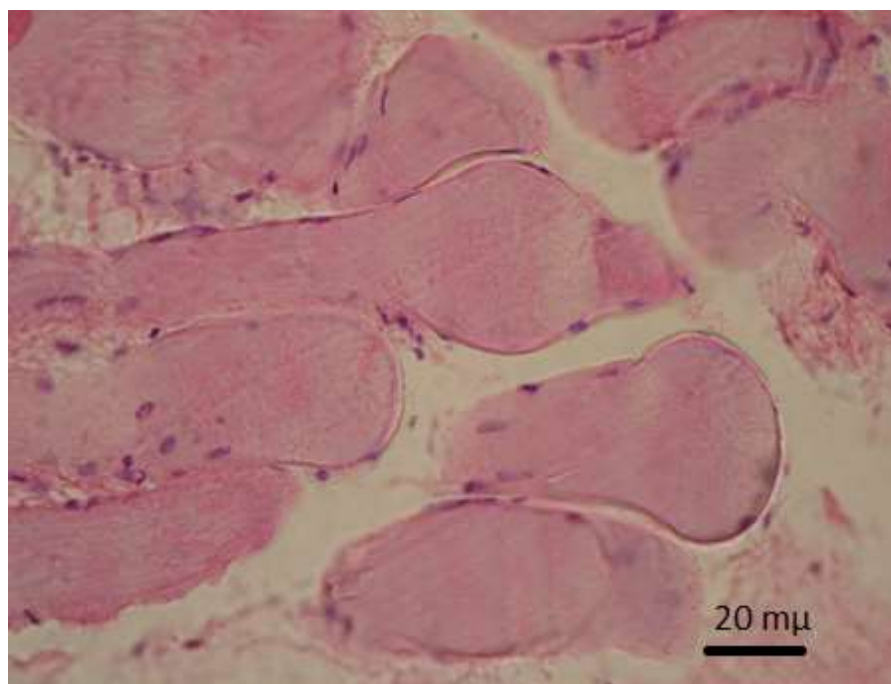


Мал. 4.2. Помірно виражена місцева періваскулярна інфільтрація. Група щурів з реперфузією 12 г при використанні апротиніну. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Зб. х 250.

У групі тварин після 6 г ішемії і 12 г реперфузії на тлі корекції альпростаном у порівнянні з попередньою групою відзначається збільшення кількості та площі крововиливів і ступеня вираженості проявів набряку. При цьому гіперемії судинного русла, як капілярів, так і більш великих судин не спостерігається. Дрібні судини з ознаками спазму: стінка їх товста, просвіт

звужений, базальна мембрана гофрована та ендотелій розташований у вигляді «частоколу». Поперечна смугастість зустрічається лише у поодиноких клітинах, але і одночасно набагато більша кількість м'язових клітин містить ядра.

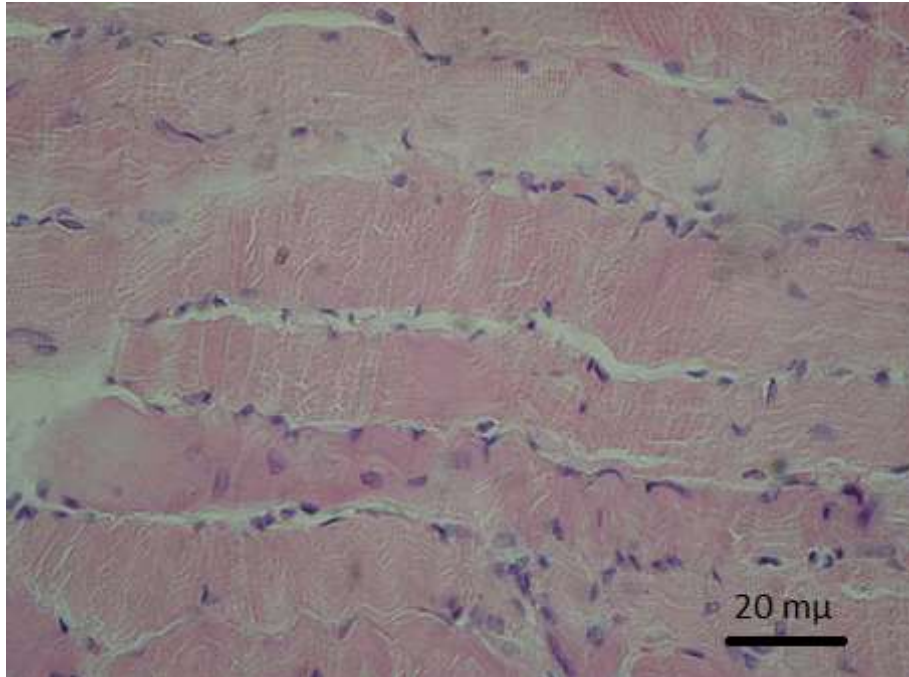
Звертає на себе увагу і велика кількість розривів м'язових волокон з формуванням «булавоподібних» потовщень на їх кінцях (Мал. 4.3). Запальна інфільтрація носить частково періваскулярний характер і в складі інфільтратів починають переважати лімфоцити.



Мал. 4.3. «Булавоподібні» потовщення м'язових волокон. Група щурів з реперфузією 12 г при використанні аналогу простагландину E1. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Зб. х 250.

Морфологічні прояви у групі тварин після 6 г ішемії з наступною 12-ти годинною реперфузією на тлі застосування кверцетину характеризувалися, у першу чергу, набряком тканин від помірного до вираженого, а так само тим, що ступінь змін структури м'язових клітин так само була схильна до значних коливань.

Так, зустрічалися ділянки тканин, які перебували у стані дистрофії та некрозу, що проявлялося відсутністю поперечної смугастості, гомогенізацією цитоплазми, або появою у ній значних розмірів просвітлень (тобто виражений набряк цитоплазми) (Мал.4.4). Також, у даних ділянках відзначається фрагментація м'язових волокон і розшарування їх за рахунок вираженого набряку.



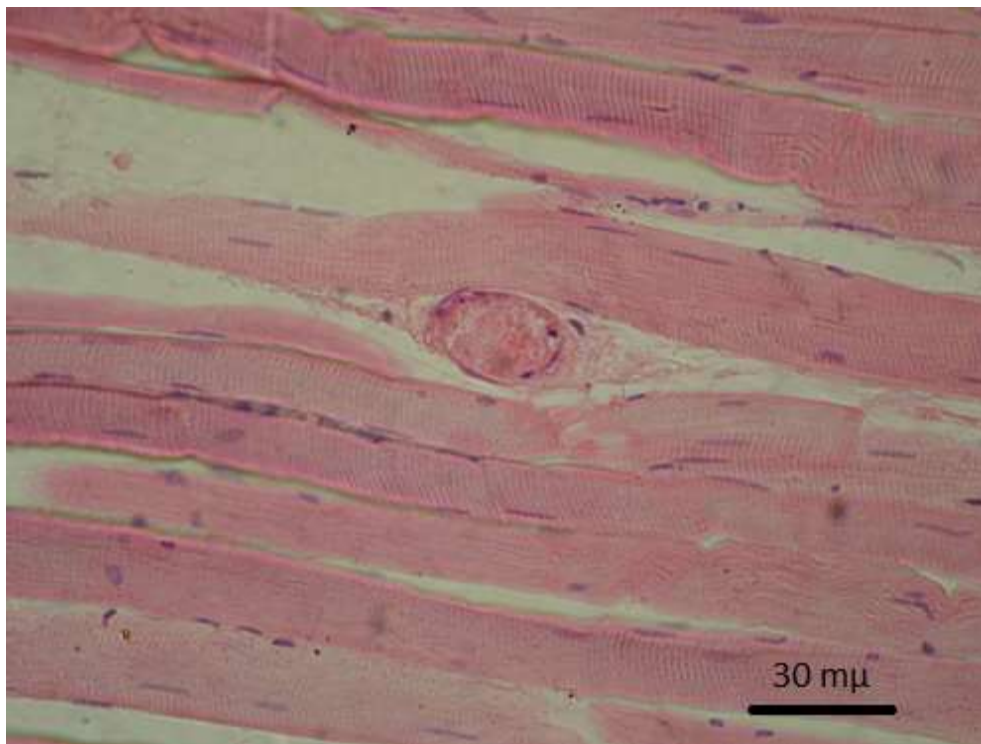
Мал. 4.4. Часткова відсутність поперечної смугастості і гомогенізація цитоплазми. Група щурів з реперфузією 12 г при використанні кверцетину. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Зб. х 250.

Спостерігаються розлади кровообігу у вигляді повнокров'я судин, як капілярного русла, так і більшого калібру; зустрічаються дрібні крововиливи. Прояви запалення у даній групі незначні і представлені переважно невеликими періваскулярними скупченнями лімфоцитів і нейтрофілів, і тільки у зоні тканин з максимальними некротичними змінами ця інфільтрація поширюється і між м'язовими волокнами.

Одночасно простежуються наявність м'язових клітин, будова яких наближалася до норми: відзначалася добре виражена поперечна смугастість,

яка була відсутня лише на окремих ділянках; мінімізувалися прояви набряку цитоплазми, ядра клітин добре візуалізувались і мали звичайну форму, розміри і ступінь сприйняття барвників.

У групі тварин, яким корекція ішемічно-реперфузійних змін проводилася комбінацією препаратів кверцетину і апротиніну, спостерігалися зміни, які мали тенденцію до нормалізації структур клітин і волокон м'язової тканини або з мінімальним обсягом пошкодження (Мал. 4.5).



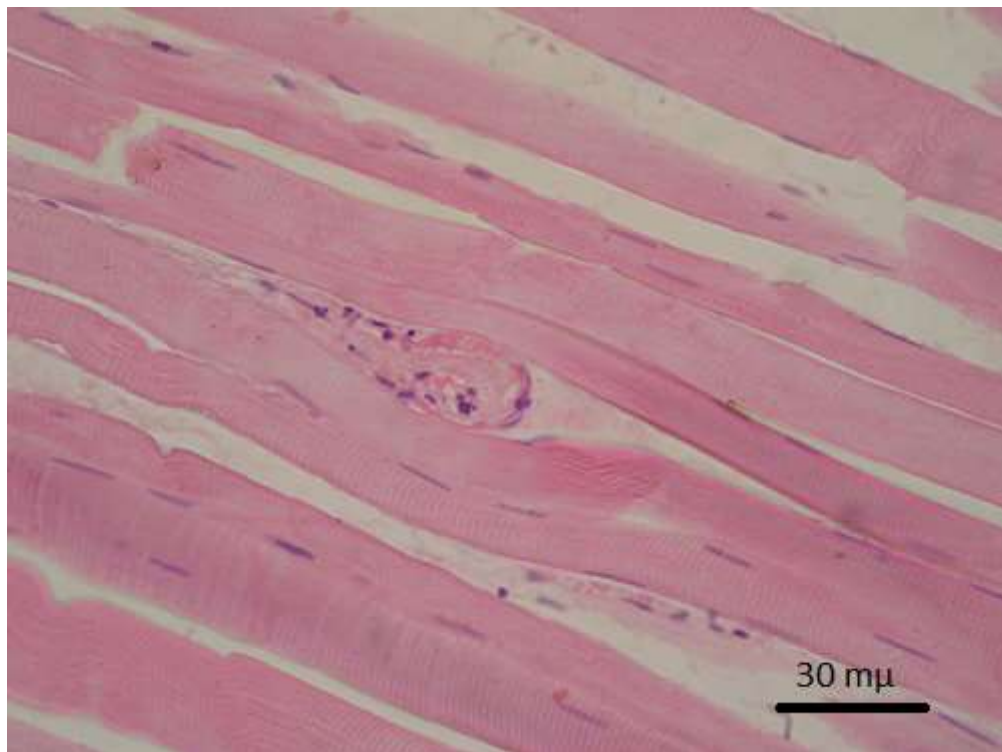
Мал.4.5. Нормалізація структур клітин і волокон м'язової тканини. Зниження явищ набряку. Група щурів з реперфузією 12 г при використанні апротиніну і кверцетину. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Зб. х 100.

Основна маса структурних компонентів скелетної м'язової тканини при гістологічному дослідженні виглядала досить збережено: відзначається зниження вираженості проявів набряку, що супроводжувалося зниженням розволокненням м'язових пучків; поперечна смугастість присутня практично у всіх м'язових клітинах. Ядра у таких клітинах мали звичайні розміри і

ступінь забарвлення. Відзначається так само деяке зниження вираженості гіперемії судинного русла і крововиливів, у порівнянні з групою, у якій застосовувався у якості лікарського засобу кверцетин.

Однак, як і раніше зустрічалися ділянки, у яких м'язові клітини не мали поперечної смугастості, спостерігалися зміни у ядрах, аж до їх відсутності, а так само набряк, фрагментація і лізис цитоплазми, і, відповідно, розпад м'язових волокон. У таких зонах відзначалося збільшення проявів набряку тканин і розладів кровообігу, з'являлися дрібні періваскулярні лімфоцитарні інфільтрати з невеликою кількістю сегментоядерних лейкоцитів, відсутні у більш збережених ділянках.

Корекція ішемічно-реперфузійного впливу «потрійною» комбінацією препаратів: альпростан + кверцетин + аprotинін сприяла прогресивному зниженню вираженості проявів набряку та порушень кровообігу (Мал.4.6).



Мал. 4.6. Слабке повнокров'я і набряк, незначна кількість лімфоцитів у періваскулярних зонах. Група щурів з реперфузією 12 г при використанні аprotиніну, кверцетину і аналогу простагландину E1. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Зб. х 100.

Внаслідок цього структура м'язових клітин також більшою мірою відповідала їх нормальній будові. Лише поодинокі клітини не мали ядер і поперечної смугастості, але при цьому не спостерігалось і фрагментації даних волокон. Відзначається деяка гіперемія капілярного русла, яка не поширюється на більші судини. Запальна інфільтрація вкрай слабка і проявляється наявністю у періваскулярних зонах незначної кількості лімфоцитів.

Електронно-мікроскопічні дослідження скелетної м'язової тканини щурів з ішемічно-реперфузійним пошкодженням на тлі застосування кверцетину продемонструвало позитивну динаміку у морфологічній картині. Мабуть, кверцетин, як антиоксидант, за рахунок зниження концентрації вільних радикалів і токсичних продуктів пероксидації сприяв стабілізації стану м'язової тканини у групи тварин, які перенесли шестигдинну ішемію, ускладнену подальшою реперфузією.

На електронограммах виявлялися неоднорідні ділянки м'язової тканини, які перебували у стані дистрофії та некрозу, що проявлялося відсутністю поперечної смугастості, гомогенізацією цитоплазми, або появою у ній значних розмірів просвітлень (тобто виражений набряк цитоплазми) (Мал.4.7).

З лізованими міофібрилами знаходилися переважно великі мітохондрії, які містили зруйновані кристи з електронно-щільними включеннями. Ядра одиничних міоцитів мали виражені загострені інвагінації з розширенням перінуклеарного простору. Також на даних ділянках відзначається фрагментація м'язових волокон і розшарування їх за рахунок вираженого набряку.

Застосування апротиніну, як інгібітора протеїназ у тварин, які перенесли шестигдинну ішемію, ускладнену реперфузією, також сприяло стабілізації стану м'язової тканини.



Мал. 4.7. Великі мітохондрії із зруйнованими кристами з електронно-щільними включеннями. Група щурів з реперфузією 12 г при використанні кверцетину. Електронограмма. Збільшення $\times 24000$.

Електронно-мікроскопічне дослідження довело, що ділянки вираженого міолізу зустрічалися рідко. Також відзначалося зниження вираженості проявів набряку, яке супроводжувалося зниженням розволокнення м'язових пучків; поперечна смугастість присутня практично у всіх м'язових клітинах.

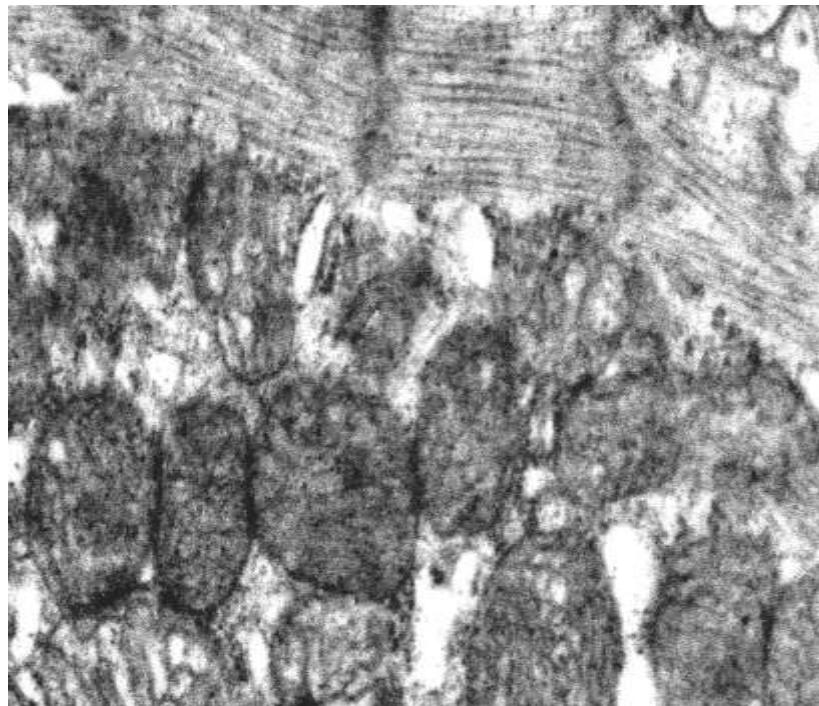
При цьому просвіти судин були розширеними і повнокровними. Звернуло на себе увагу зменшення інтенсивності перикапілярного набряку і мала кількість сегментоядерних клітин в періваскулярних і інтерстиціальних просторах. Зазначалася велика кількість гетерогенних мітохондрій, як малих і округлих, так і великих і витягнутих. Більшість великих мітохондрій мали збережені пластинчасті кристи.

Застосування «потрійної» комбінації кверцетину як антиоксиданту, інгібітора протеїназ апротиніна і ангіопротектора аналога простагландину E1 у тварин які перенесли шестигодинну ішемію, ускладнену подальшою реперфузією, сприяло більшому збереженню скорочувального апарату,

меншій вираженості деформації Z-дисків, збереження ультраструктури ендотелію стінки капілярів, а також незначною мірою периваскулярного і інтерстиціального набряку.

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 (Мал.4.8).

Судини мікроциркуляторного русла повнокровні. Кількість аморфних мас у них знижена, у порівнянні з попередніми серіями. У інтерстиції виявлялися поодинокі макрофаги з великою кількістю цитоплазматичних відростків. Однак навколо деяких судин зберігався периваскулярний набряк.



Мал. 4.8. Дрібні округлі мітохондрії, з тісними контактами і неушкодженими кристами. Група щурів з реперфузією 12 г при використанні апротиніну, кверцетину і аналогу простагландину E1. Електроннограма. Збільшення x 16000.

Таким чином, світлова та електронна мікроскопія м'язової тканини при моделюванні синдрому ішемії/реперфузії на тлі застосування препаратів патогенетичної корекції показали, що комбіноване використання інгібітора протеїназ, антиоксиданту і аналога простагландину E1 сприяє позитивній динаміці у структурах скелетної м'язової тканини і запобігає виникненню ознак вираженої морфологічної альтерації. Слід зазначити, що ізольоване застосування препаратів також надає певний вплив на ультраструктури м'язової тканини, проте ця дія була недостатньою. Саме поєднане застосування кверцетину, апротиніну і альпростану для корекції ішемічно-реперфузійного ураження попереджало розвиток грубих мікроциркуляторних і альтеративних змін.

Крім того, відмечено, що якщо за відсутності лікування через 12 г після реперфузії гинуло 23 % щурів, то монотерапія апротиніном знижувала летальність до 16 %, монотерапія кверцетином - до 9 %, монотерапія з використанням аналога простагландину E1 - до 17 %. При одночасному застосуванні апротиніну і кверцетину летальність склала ліше 3%, а застосування комбінації апротиніну, кверцетину і аналога простагландину E1 призводило до 100% виживання тварин в строки 12 г після відновлення кровообігу в кінцівці.

Основні результати даного розділу опубліковані в наукових працях

1. 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.
2. 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.

3. 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.
4. 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

РОЗДІЛ 5. АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

У даний час реперфузійний синдром розглядається як найважливіший патофізіологічний феномен, який ініціює важкі метаболічні розлади гомеостазису, сприяє розвитку порушень мікроциркуляторного русла і системної гемодинаміки, обумовлює розвиток поліорганної недостатності у хворих і потерпілих з критичними станами [167-170]. В основі патогенезу впливу ішемії та реперфузійного синдрому лежить складний комплекс фізико-хімічних, біохімічних і клітинних механізмів. Сучасний етап розробки проблеми патогенезу ішемічно-реперфузійних ушкоджень характеризується проведенням цілеспрямованих досліджень з вивчення структурно-функціональної основи ураження, його проявів на молекулярному, клітинному, органному, тканинному і системному рівнях. При цьому основна увага приділена таким патогенетичним механізмам, розвиток яких визначає більш тяжкий клінічний перебіг синдрому ішемії/реперфузії і викликає збільшення частоти несприятливих наслідків.

Фундаментальний погляд на проблему патогенезу ішемічно-реперфузійних ушкоджень констатує детермінованість набору механізмів пошкодження та відповідних реакцій на вплив факторів, більшість з яких стандартні, універсальні і сформовані у процесі філогенезу. Механізми розвитку ішемічних уражень і реперфузійного синдрому складні і багатогранні, і у даний час основна роль відводиться гуморальним ланкам патогенезу цих станів. Незважаючи на багаторічний досвід вивчення механізмів розвитку і способів корекції реперфузійних розладів, вивчення патогенезу метаболічних порушень є вельми актуальним завданням сучасної теоретичної та практичної медицини.

В основі реперфузійних ускладнень лежить надмірне надходження в умовах реканалізації судин електролітів, а також води, глюкози, кисню та інших субстратів до альтерірованих або некротизованих тканин, які втратили здатність їх метаболізувати у типових окисно-відновних реакціях, а також у

реакціях гліколізу, ліполізу, протеолізу [171]. На сучасному етапі у патогенезі реперфузійного синдрому все більше значення надається надмірній активації і викиду у системний кровотік великої кількості біологічно-активних речовин, а його розвиток розглядається з позиції формування синдрому системної запальної реакції (ССЗР) [172-174]. Причому відмічено, що розвиток ССЗР супроводжується надмірною системною активацією цитокінів, протеолітичних ферментів і вільнорадикального окислення, які поряд з компонентами інших біологічно активних систем призводять до порушень гемокоагуляції, ендотеліальної дисфункції, розвитку ДВС-синдрому [175-177].

Серед найбільш істотних факторів ушкодження тканин слід виділити неспецифічні протеїнази, надлишкова активація яких є важливою патогенетичною ланкою у розвитку ряду деструктивних і запальних реакцій організму [178-182]. Стан, пов'язаний зі збільшенням активності протеолітичних процесів, може зрушувати динамічну рівновагу протеїнази/інгібітору в організмі у бік протеолітичних ферментів. Дослідження останніх років показали, що зміна цього балансу є чинником розвитку багатьох видів патології, посилює реперфузійні порушення і має системні наслідки [183]. Однак особливості лізосомальної дисфункції, спричиненої дією різних подразників, і механізми її виникнення досі не встановлені. Більшість дослідників при РС у крові знаходили зростання активності протеолітичних ферментів [24,184]. При цьому величина протеолітичної активності крові змінювалася прямо пропорційно тривалості впливу пошкоджуючого агента. Отже, при формуванні ішемічно-реперфузійного ураження спостерігається, як правило, підвищення активності протеолітичних ферментів, вираженість якого має тканинну специфічність і залежить від тривалості ішемії та реперфузії.

Можливими механізмами впливу факторів на активність протеїназ можуть бути їх вплив на: проникність мембран лізосом, активність інгібіторів протеолітичних ферментів, структуру та функціональний стан

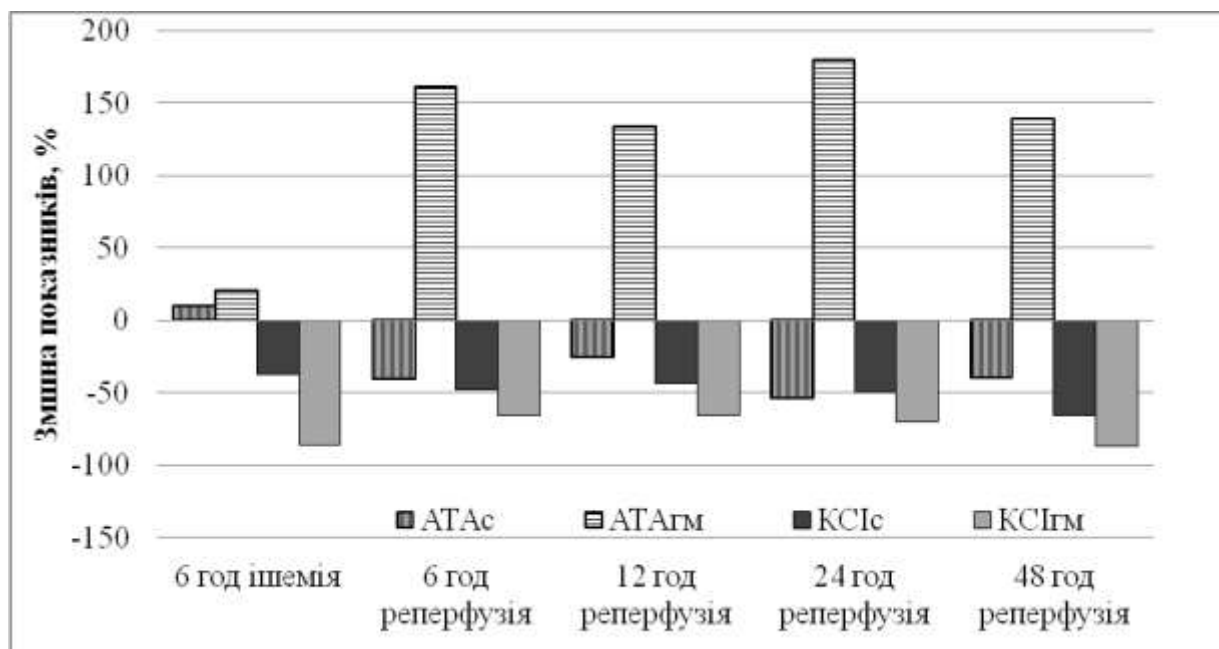
печінки, а також інтенсивність ВРО ліпідів. Встановлено, що однією з причин порушення функцій організму є зниження стабільності мембран лізосом, що приводить до клітинної загибелі, а також окислювальний стрес і вільнорадикальне пошкодження, які відіграють основну роль у загибелі клітин, індукованою дисфункцією лізосом [185].

Активація вільнорадикального окислення вважається одним з ключових механізмів як місцевого пошкодження тканин після їх реперфузії, так і впливу на формування системних ускладнень. Таким чином, стан неспецифічних протеїназ, їх інгібіторів і стан прооксидантно-антиоксидантної системи може робити істотний вплив на пошкодження м'язової тканини при реперфузійному синдромі і, отже, на розвиток системних ускладнень.

Слід зазначити, що якщо вивченню системного рівня ускладнень РС приділяється досить багато уваги [14, 186], то взаємозв'язки системних і місцевих змін, від яких у першу чергу залежить характер і ступінь вираженості ускладнень, вивчаються набагато менш інтенсивно [15, 187-189]. У зв'язку з цим, набуває зацікавленість встановлення патогенетичної ролі протеїназ, їх інгібіторів і показників ВРО ліпідів крові і м'язової тканини раніше ішемованої кінцівки щурів з РС.

Розуміння патогенетичних механізмів розвитку РС дозволяють вести розробку лікувальних підходів з впливом на певні ланки патогенезу. Серед актуальних проблем у вивченні реперфузійних розладів залишається експериментальне дослідження ефективності препаратів, здатних блокувати різні патогенетичні ланки, і доцільності їх поєднаного застосування. У зв'язку з цим, метою дослідження стало експериментальне обґрунтування патогенетичних шляхів фармакологічної корекції реперфузійних ушкоджень шляхом вивчення стану процесів перекисного окислення ліпідів і неспецифічних протеїназ та їх впливу на морфологічні та ультраструктурні зміни скелетної м'язової тканини кінцівок щурів при синдромі ішемії-реперфузії.

У результаті проведених досліджень встановлено, що розвиток реперфузійного синдрому супроводжувався змінами показників протеїназ-інгібіторної системи у гомогенатах скелетних м'язів. Найбільш характерними змінами було підвищення активності неспецифічних протеїназ. Збільшення активності протеолітичних ферментів супроводжувалося компенсаторним підвищенням АТА і падінням рівня КСІ у порівнянні з показниками інтактних тварин (Мал.5.1). При 12-ти годинній реперфузії мало місце підвищення активності еластази, ТПА - на 62,5%, і падіння КСІ у 2,9 рази у порівнянні з показниками інтактних тварин.



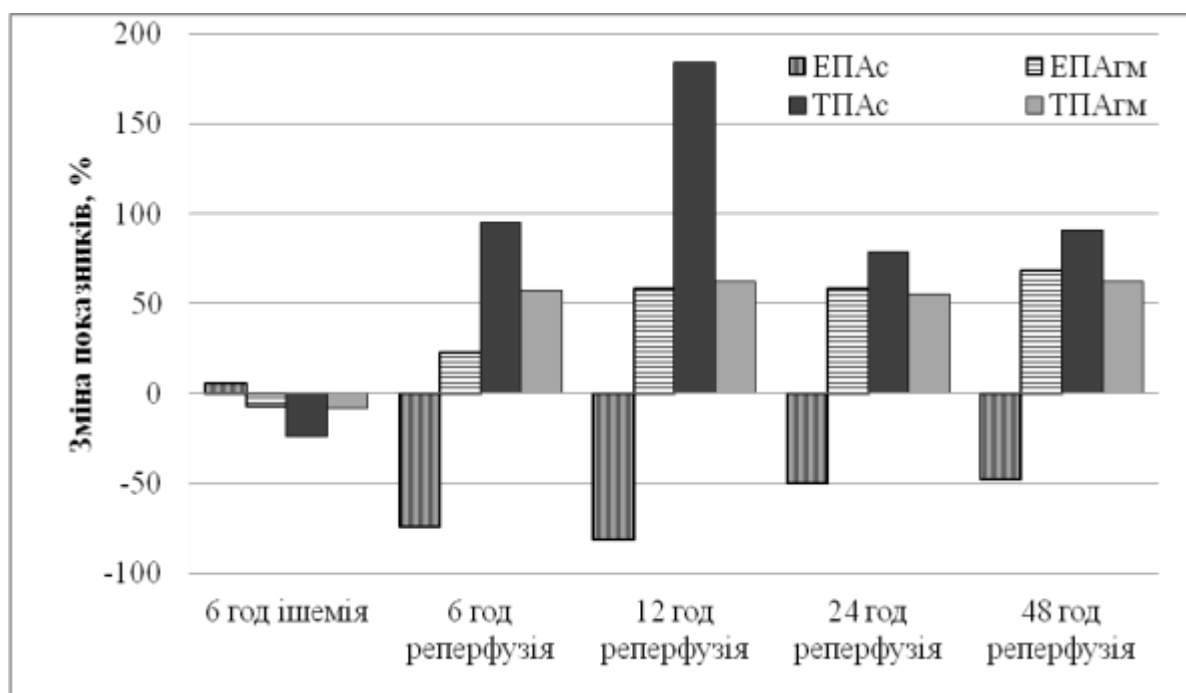
Мал. 5.1. Зміни антипротеїназної активності у сироватці крові (с) і гомогенатах скелетних м'язів (гм) раніше ішемізованих кінцівок в умовах моделювання ішемічно-реперфузійного ураження (у відсотках по відношенню к показникам щурів контрольної групи).

Описані зміни у протеїназ-інгібіторній системі скелетних м'язів раніше ішемізованих кінцівок, ймовірно, пояснюються тим, що в умовах вираженої токсемії і гіперпротеолізу, супроводжуючих РС, власний антипротеїназний інгібіторний потенціал виявляється недостатнім. Звертає на себе увагу факт

зниження саме КСІ, які, завдяки стійкості у кислому середовищі, відіграють головну інгібіруючу роль у протекції тканин від локальної деструктивної дії протеаз в умовах вираженої гіпоксії, що супроводжує розвиток досліджуваної патології.

Встановлені зміни на локальному рівні супроводжуються характерними змінами на системному рівні. У сироватці крові відзначена тенденція до зростання рівня ЕПА на тлі незначного падіння рівня ТПА у порівнянні зі здоровими тваринами (Мал. 5.2). Була відзначена тенденція до зниження активності даних ферментів у супернатантах гомогенатів м'язів щурів у 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% ($p < 0,001$) порівняно з показниками групи інтактних тварин. У супернатантах гомогенатів м'язів щурів також було відзначено зростання АТА на 28,5% ($p < 0,05$) і різке зниження кількості КСІ (у 7,2 рази) у порівнянні з групою контролю.

Вивчення реперфузійних розладів продемонструвало збільшення рівнів трипсиноподібної активності сироватки крові усіх експериментальних груп з реперфузійним синдромом, поряд з вираженим зниженням рівня інгібіторів неспецифічних протеаз. Так, при розвитку РС тривалістю 12 годин було виявлено збільшення ТПА у 2,8 рази у порівнянні з групою інтактних щурів. Описані зміни супроводжувалися падінням антитриптичної активності на 25,7%, а кислотостабільних інгібіторів протеїназ - на 44,3% порівняно з контролем.



Мал.5.2. Зміни активності протеолітичних ферментів у сироватці крові (с) і гомогенатах скелетних м'язів раніше ішемізованих кінцівок (гм) в умовах моделювання ішемії-реперфузії (у відсотках по відношенню к показникам щурів контрольної групи).

Настільки значне підвищення активності трипсиноподібних протеїназ 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 тлі розвиток реперфузійного синдрому супроводжується функціональним перенапруженням і подальшим виснаженням антипротеїназного інгібіторного потенціалу сироватки крові. Так, тривала реперфузія (24-48 годин від моменту відновлення кровообігу у кінцівках) супроводжується вираженим зниженням АТА і КСІ, що свідчить про недостатні можливості компенсаторних резервів та їх підвищене витрачання.

Таким чином, механізми антипротеазного захисту сироватки крові виявилися неспроможними, що й зумовило максимальну реалізацію

деструктивної дії трипсиноподібних протеїназ на системному рівні. У зв'язку з цим можна припустити, що при розвитку ішемічно-реперфузійного ураження системна активація процесів протеолізу пов'язана з надходженням протеїназ з раніше ішемізованих тканин, посилюється пригніченням процесів біосинтезу білків, у тому числі і інгібіторів протеїназ, викликаним шкідливою дією ендотоксинів на клітинні структури.

Розвиток ішемічно-реперфузійного ураження супроводжується дисбалансом у системі локального протеолізу, який проявляється посиленням протеолітичної активності на тлі зниження антипротеїназного потенціалу. При цьому, превалювання активності протеїназ над інгібіторним потенціалом спостерігається як у сироватці крові, так і локально, в органах-мішенях. Максимально ці зміни виражені через 12 г після відновлення кровообігу у кінцівках експериментальних тварин. Очевидно, що в цій ситуації застосування препаратів з антипротеазною активністю змогло б заблокувати агресивну дію неспецифічних протеїназ і сприяло відновленню антипротеїназного захисту органів, а значить, такий метод корекції є патогенетично обґрунтованим.

Відомо, що одним з провідних патогенетичних механізмів реперфузійного синдрому є активація процесів вільнорадикального окислення. Як правило, незалежно від специфіки шкідливого чинника, активація процесів вільнорадикального окислення обтяжується зривом природних механізмів антиоксидантного захисту [10,30]. Враховуючи важливу роль порушень стану окислювально-антиоксидантного гомеостазу у патогенезі реперфузійних розладів, являється актуальним вивчення механізмів метаболічних порушень і пов'язаного з ними розвитку органопатології при синдромі ішемії/реперфузії.

Отримані нами результати експериментальних досліджень показали, що при моделюванні ішемії спостерігається значна активація процесів вільнорадикального окислення ліпідів. Так, при дослідженні прооксидантно-антиоксидантної системи супернатантів гомогенатів м'язів щурів з моделлю

ішемії було відзначено збільшення каталазоподібної активності на тлі вираженого зниження СОД: на 66,9% нижче у порівнянні з відповідним показником інтактних тварин. Дане зниження можна пояснити процесами деструкції клітин м'язової тканини. Розвиток реперфузійного синдрому тривалістю 12 годин сприяло зниженню КПА і СОД у супернатантах гомогенатів скелетних м'язів щурів у порівнянні з інтактними тваринами. Так, через 12 годин після зняття джгутів КПА був на 52,0%, а рівень СОД – на 31,8% нижче аналогічного показника інтактних тварин.

Змінам окислювально-антиоксидантного гомеостазу на локальному рівні відповідали певні зрушення ПОЛ і в крові. Про це свідчить значне підвищення вмісту у сироватці крові ТБК-активних продуктів, яке більш, ніж у 2 рази перевищило показник інтактних тварин і свідчило про активацію процесів ВРО. Відомо, що ТБК-активні продукти є каталізаторами аутоокислення і створюють небезпеку розгортання вільнорадикальних ланцюгових реакцій, які призводять до деструкції клітинних мембран, а антиоксидантні системи утримують процеси вільнорадикального окислення на фізіологічному рівні за умови збереження прооксидантно-антиоксидантної рівноваги. При інтенсивному впливі факторів система антиоксидантного захисту відчуває виснаження, яке сприяє інтенсифікації процесів ліпопероксидації. У наших дослідженнях антиоксидантний потенціал при моделюванні ішемії залишався на досить високому рівні. На тлі тенденції до зниження каталази і СОД, було відмічено підвищення рівня основного сироваткового антиоксиданту церулоплазміну на 39,6% ($p < 0,001$) порівняно з інтактними щурами.

Розвиток реперфузійного синдрому також супроводжувався зростанням кількості ТБК-АП сироватки крові, причому максимальна кількість ТБК-активних продуктів спостерігалася через 48 годин після зняття джгутів: досліджуваний показник перевищив контроль у 2,8 рази. Активация процесів ПОЛ супроводжувалася зростанням КПА і ЦП. Це підтверджує, що антиоксидантної дії каталази і ЦП при розвитку ішемічно-реперфузійного

ураження виявилося недостатньо, і вміст у сироватці крові вторинних продуктів вільнорадикального окислення ліпідів продовжував підвищуватися.

Посиленню процесів ліпопероксидації сприяло і зниження активності внутрішньоклітинних антиоксидантних ферментів. Найнижчий рівень СОД був виявлений у групі тварин з 48-годинним реперфузійним періодом: на 74,7% нижче показника контрольної групи. При експериментальному ішемічно-реперфузійному пошкодженні звертає на себе увагу спостережуваний дисбаланс активності внутрішньоклітинних антиоксидантних ферментів крові, при якому падіння активності СОД поєднується з ростом КПА.

Таким чином, аналіз параметрів ліпопероксидації та системи антиоксидантного захисту у крові експериментальних тварин дозволяє констатувати, що висока інтенсивність вільнорадикальних процесів, що перевершує антиокислювальний потенціал, є важливою ланкою патогенезу реперфузійного синдрому.

На нашу думку, накопичення ТБК-АП при збільшенні терміну реперфузії як на місцевому, так і на системному рівнях свідчить про активацію процесів ПОЛ та розвитку прогресуючого дисбалансу прооксидантно-антиоксидантної системи. При збільшенні тривалості реперфузійного синдрому інтенсифікація процесів ПОЛ супроводжується виснаженням механізмів антиоксидантного захисту і призводить до зниження рівня як внутрішньоклітинних антиоксидантних ферментів (супероксиддисмутаза, каталаза), так і сироваткових (церулоплазмін). Зниження вмісту ЦП і каталази у гомогенатах скелетних м'язів кінцівок на тлі їх збільшення у сироватці крові у процесі розвитку реперфузійного синдрому свідчить про декомпенсацію механізмів антиоксидантного захисту на місцевому рівні та їх відносну збереженість на системному.

Таким чином, розвиток експериментального синдрому ішемії-реперфузії супроводжується зміною у прооксидантно-антиоксидантній системі і

характеризується прогресуючим збільшенням рівня ТБК-АП як у сироватці крові, так і у гомогенатах скелетних м'язів раніше ішемізованих кінцівок. Ці зміни відбуваються на тлі посилення активності антиоксидантних ферментів у сироватці крові та їх зниження у гомогенатах.

Також, розвиток експериментального синдрому ішемії-реперфузії супроводжується зміною активності неспецифічних протеїназ та їх інгібіторів у сироватці крові і м'язових тканинах. У м'язовій тканині більшою мірою активуються протеїнази, які володіють високим деструктивним потенціалом, а їх активація супроводжується пригніченням протекторного антипротеїназного потенціалу, насамперед за рахунок зниження активності місцевосинтезованих КСІ. На системному рівні реперфузійні порушення характеризуються збільшенням активності, у першу чергу, трипсиноподібних протеїназ, здатних призводити до активації великої кількості регуляторних протеолітичних систем і запускати каскад системних порушень. На нашу думку, системний дисбаланс протеїназ та їх інгібіторів сироватки крові, який розвивається, може відігравати ключову роль у прогресуванні патології та призводити до розвитку системних ускладнень, що включають ДВЗ-синдром і синдром поліорганної недостатності.

Описана нами динаміка біохімічних показників при розвитку реперфузійного синдрому супроводжувалася змінами морфологічної картини ішемізованих тканин, характеризувалася вираженими порушеннями мікроциркуляції, прогресуючими при збільшенні тривалості постішемічного періоду, а також дистрофічними і некробіотичними змінами. Так, у м'язовій тканині при моделюванні 12-ти годинного ішемічно-реперфузійного пошкодження мали місце розпад і лізис цитоплазми великого числа клітин, що вело до розпаду м'язових волокон, часом з формуванням «булавоподібних» потовщень на кінцях фрагментів. Повсюдно відзначалася втрата м'язовими клітинами поперечної смугастості; значна їх кількість мала гомогенізовану просвітлену цитоплазму і ознаки набряку. Ступінь вираженості даних змін безпосередньо залежала від тривалості реперфузії і

супроводжувалася виснаженням антипротеїназного інгібіторного потенціалу і антиоксидантів м'язової тканини.

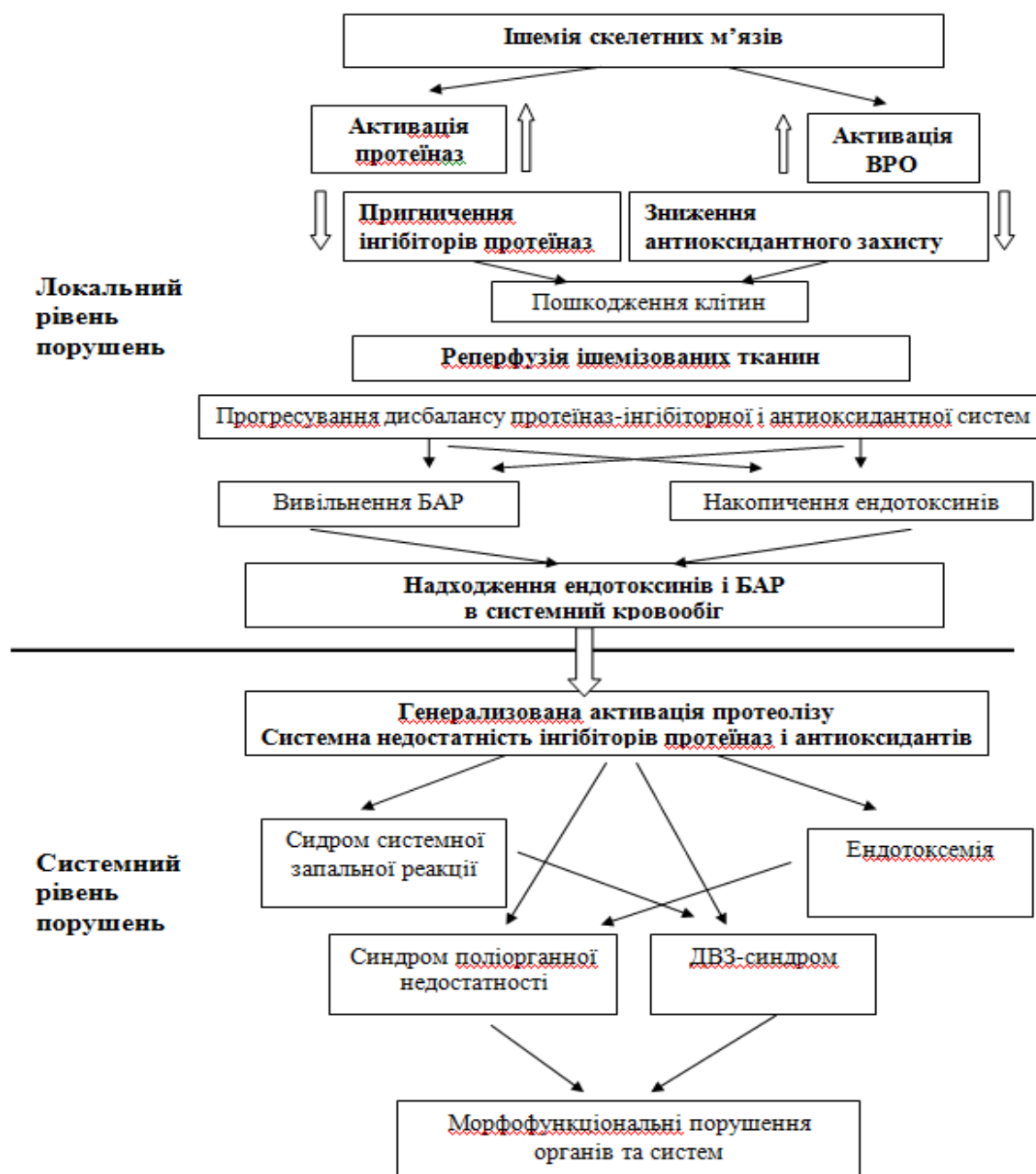
При експериментальному синдромі ішемії / реперфузії спостерігалися також певні ультраструктурні зміни. Так, на електронограммах скелетної м'язової тканини визначалися прояви ушкодження м'язів, розволокнистість міофібрил, втрата структури мітохондрій, руйнування їх крист. У стромі спостерігався значний набряк і велика кількість поліморфно-ядерних лейкоцитів, у ядрі клітин зустрічалася конденсація хроматину на ядерній мембрані, велика кількість інвагінатів, що свідчило про цитоплазматичний набряк.

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

Отримані у ході досліджень результати переконливо свідчать про те, що при розвитку реперфузійного синдрому розвивається комплекс метаболічних і структурно-функціональних порушень. При цьому важливими ланками патогенезу є дисбаланс неспецифічних протеїназ та їх інгібіторів, а також інтенсифікація процесів ВРО ліпідів на тлі виснаження антиоксидантних резервів організму. Зазначені зміни прогресують паралельно зі збільшенням тривалості реперфузійного періоду. Включення компенсаторних механізмів, що спостерігається у початкові терміни дослідження при розвитку ішемічно-реперфузійного ураження, виражені незначно і носять короткочасний характер.

Результати проведених нами досліджень, а також дані сучасної літератури, дозволили запропонувати схему, що демонструє можливий взаємозв'язок порушень протеїназ-інгібіторної системи та посилення

процесів ВРО ліпідів на локальному та системному рівні у патогенезі реперфузійного синдрому (Мал. 5.3).



Мал. 5.3. Патогенетична схема взаємозв'язку локальних та системних уражень при реперфузійному синдромі

Причому характер системних змін залежить від ступеня вираженості локальних ушкоджень при ішемії/реперфузії. По всій видимості від накопичення біологічно-активних речовин та продуктів розпаду тканин залежить ступінь вираженості системних змін, у тому числі формування синдрому поліорганної недостатності. Слід зазначити, що патогенетичні

механізми СПОН залишаються недостатньо вивченими, хоча останнім часом все більшого значення у формуванні системної органної патології надається синдрому системної запальної реакції (ССВР). В даний час ССВР розглядається як ключова патогенетична ланка великого числа критичних станів інфекційної і неінфекційної природи, до яких відносять і реперфузійний синдром. Вважається, що ССВР проявляється системної генералізацією маркерів пошкодження: цитокінів, продуктів тканинного розпаду, протеолітичних ферментів, змін кислотно-лужного балансу, гемокоагуляції та ін. [190-193].

Нашими дослідженнями встановлено, що компенсаторні механізми при досліджуваній патології не здатні нівелювати наслідки різко зростаючого навантаження і потребують підтримки за допомогою медикаментозних засобів. Беручи до уваги провідну роль системного дисбалансу протеїназ-інгібіторної системи та інтенсифікації процесів ВРО ліпідів у патогенезі синдрому ішемії/реперфузії, викликає зацікавлення вивчення ефективності застосування антиоксидантних препаратів, інгібіторів протеїназ та ангиопротекторів для патогенетичної корекції досліджуваної патології. Найбільш перспективним, на наш погляд, є пошук ефективних засобів серед регуляторів метаболізму, мікроциркуляції, що підвищують стійкість тканин до гіпоксії. Враховуючи патогенетичні механізми формування ССЗР і реперфузійного синдрому, на разі все більшого значення надається вивченню впливу простагландинів і їх синтетичних аналогів для корекції цих станів. Відомо, що простагландин E1 (ПГЕ1) володіє вазодилатуючими і ендотелій-стабілізуючими властивостями, є ефективним інгібітором агрегації тромбоцитів, інгібує активацію нейтрофілів, знижуючи вивільнення вільних радикалів, лізосомальних ферментів, медіаторів хемотаксису, цитокінів [194].

Слід припустити, що включення його у лікувальний комплекс поряд з використанням інгібіторів протеолізу і антиоксидантів розширить спектр впливу на основні ланки патогенезу синдрому ішемії-реперфузії і дозволить підвищити ефективність лікування і виживання пацієнтів при критичних

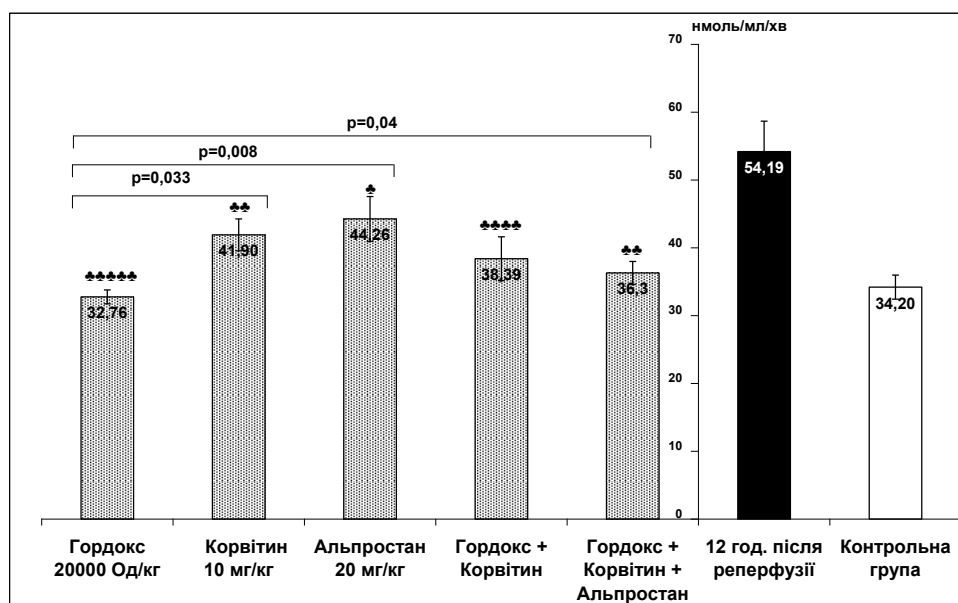
станах. Цим пояснюється наш вибір апротиніну, кверцетину та альпростану для корекції метаболічних порушень, що виникають при розвитку реперфузійного синдрому.

Отримані нами експериментальні дані дозволяють констатувати, що застосування кверцетину, апротиніну і альпростану дозволяє зменшити вираженість біохімічних змін, хоча ефективність при ізольованому застосуванні препаратів та їх комбінацій різна. Застосування антиоксиданту кверцетину і його поєднання з інгібітором протеїназ апротиніном сприяло зниженню вираженості біохімічних змін у стані протеїназ-інгібіторної системи сироватки крові. При цьому поєднане застосування препаратів характеризувалося значно більш вираженою динамікою до відновлення порушеної протеїназ-інгібіторної рівноваги. Так, трипсиноподібна активність на тлі лікування реперфузійного синдрому тривалістю 12 годин достовірно знижувалася, причому максимальне її зниження, у 3,5 рази, спостерігалось у групі, що отримувала комбінацію інгібітора протеолізу і антиоксиданту.

Також позитивний вплив комбінованого використання препаратів патогенетичної корекції було відзначено відносно інгібіторів протеїназ сироватки крові. Так, АТА досягла максимального рівня, при цьому ставши у 1,5 рази вище значення у нелікованій групі, при застосуванні інгібіторів протеолізу, антиоксидантів і аналогів природного ПГЕ1. Аналогічним чином «потрійна» комбінація впливала і на рівень кислотостабільних інгібіторів протеїназ. Дослідженнями встановлено, що максимально високі значення КСІ сироватки крові, у 2 рази вище у порівнянні з нелікованою групою, виявлені при застосуванні комбінації інгібітора протеїназ апротиніну, антиоксиданта кверцетину і альпростану.

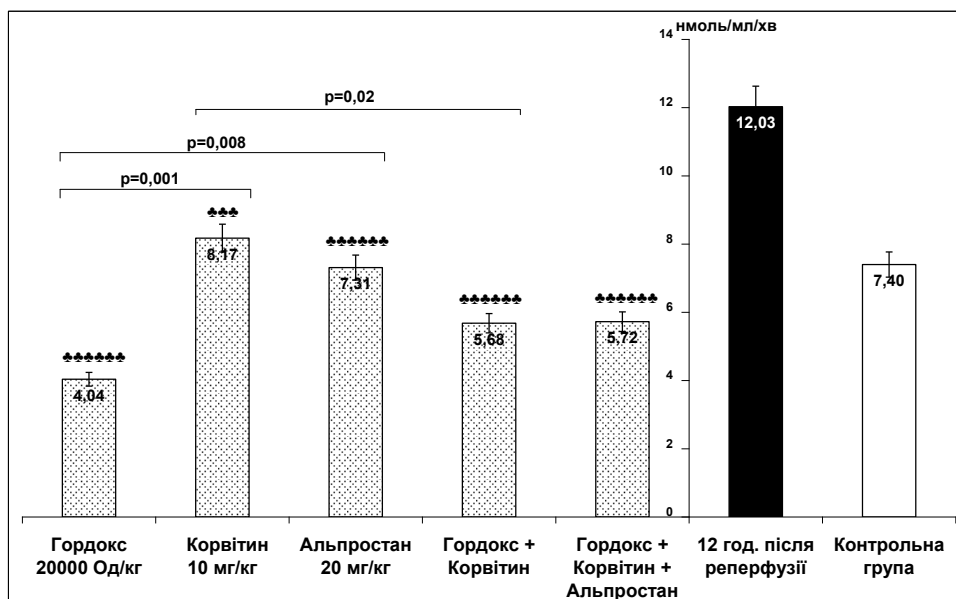
Аналіз динаміки змін протеїназ та їх інгібіторів у супернатантах гомогенатів скелетних м'язів виявив аналогічні відмінності ефективності ізольованого введення препаратів патогенетичної корекції та їх поєднань. У ході експериментальних досліджень було виявлено, що профілактичне самостійне та комбіноване застосування протективних середників для

патогенетичної терапії 12-годинного реперфузійного синдрому у супернатантах гомогенатів скелетних м'язів всіх без виключення груп супроводжувалося статистично достовірним зниженням ЕПА у порівнянні з групою тварин без лікування. Причому використання інгібітору протеїназ сприяло максимальному зниженню ЕПА супернатантів гомогенатів скелетних м'язів, при цьому рівень еластазоподібної активності був на 39,5% нижче аналогічного показника групи тварин без лікування і наблизився до показника групи здорових тварин (Мал. 5.4).



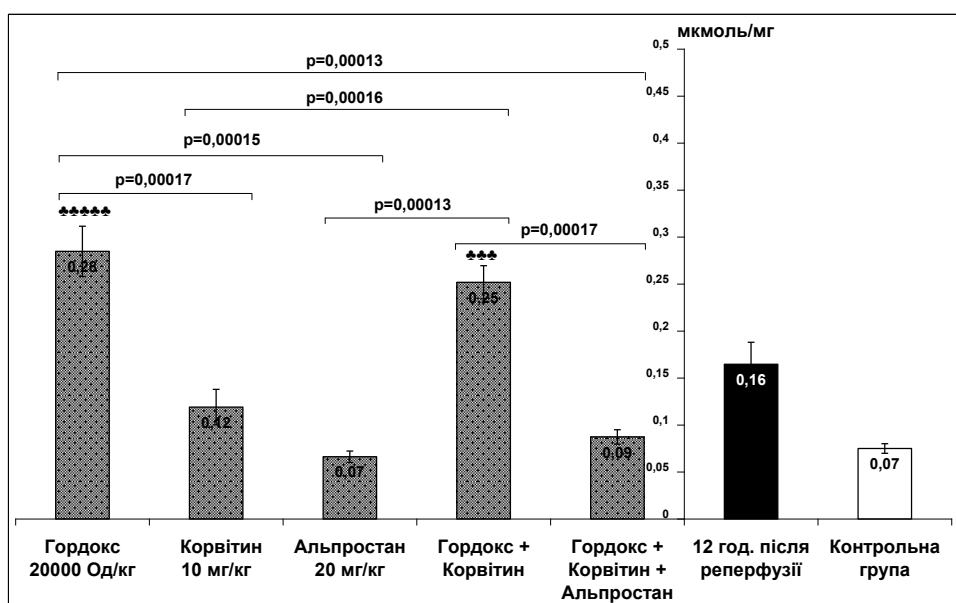
Мал. 5.4. Еластазоподібна активність у гомогенатах скелетних м'язів

Трипсиноподібна активність у скелетних м'язах теж значною мірою прігнічувалася у всіх піддослідних групах. У ході проведених досліджень було встановлено, що застосування інгібітору протеїназ для патогенетичної корекції також зробило найбільш виражений ефект і викликало зниження ТПА у 2,9 рази у порівнянні з аналогічним показником групи тварин без лікування. При цьому даний показник виявився на 45,4% нижче показника здорових тварин (Мал. 5.5).



Мал.5.5. Трипсиноподібна активність у гомогенатах скелетних м'язів

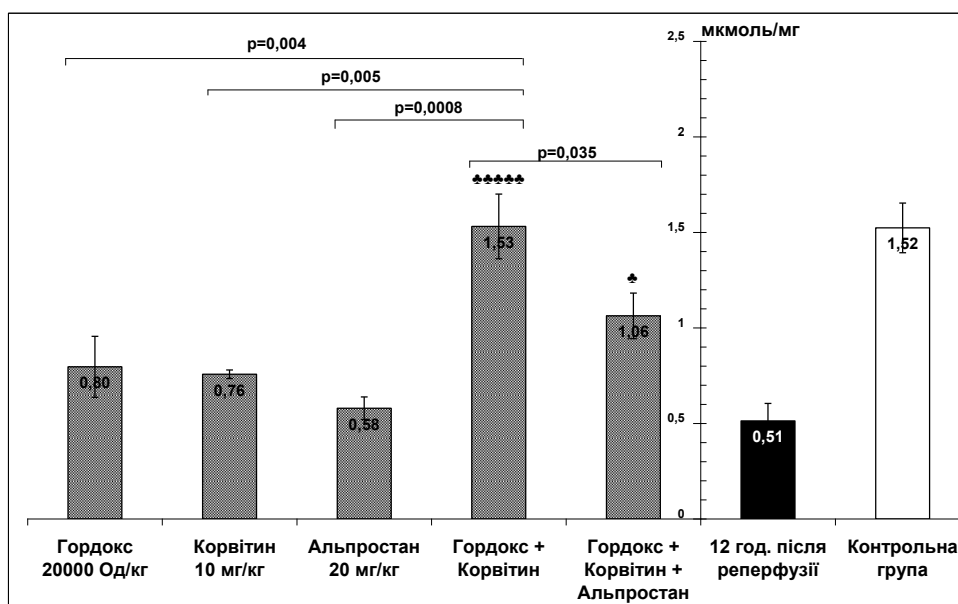
Застосування інгібітора протеїназ для корекції 12-годинного реперфузійного синдрому також зробило найбільш виражений ефект і викликало зростання АТА у супернатантах гомогенатів скелетних м'язів на 64,7% порівняно з аналогічним показником групи тварин без лікування (Мал.5.6).



Мал. 5.6. Антитриптична активність у гомогенатах скелетних м'язів

Активність кислотостабільних інгібіторів протеїназ змінювалася незначно за умов профілактичного введення апротиніна ($0,80 \pm 0,16$),

кверцетина ($0,76 \pm 0,02$) чи аналогу простагландину E1 ($0,58 \pm 0,06$) порівняно з аналогічним показником групи тварин без лікування. В той же час комбінація інгібітору протеїназ апротиніну і водорозчинної форми антиоксиданту кверцетину призводила до підвищення активності кислотостабільних інгібіторів у 3 рази ($1,53 \pm 0,19$) у порівнянні з групою без протективного введення препаратів. «Потрійна» терапія застосування антиоксиданту, інгібітора протеїназ і аналогу простагландину E1 характеризувалася дещо меншим зростанням рівня кислотостабільних інгібіторів протеїназ ($1,06 \pm 0,19$), яка у 2,1 рази була вища порівняно з аналогічним показником групи тварин без лікування (Мал. 5.7).



Мал. 5.7. Активність кислотостабільних інгібіторів протеїназ у гомогенатах скелетних м'язів

Таким чином, застосування інгібітору протеїназ апротиніну, антиоксиданту кверцетину, аналога простагландину E1 та їх поєднань знижує прояви дисбалансу протеїназ-інгібіторної активності на місцевому рівні - у скелетних м'язах при моделюванні ішемічно-реперфузійного ураження. Як показали результати, отримані при експериментальній медикаментозній корекції синдрому ішемії-реперфузії через 12 г після реперфузії, зниження протеолітичної активності та підвищення антипротеїназного інгібіторного

потенціалу, спостерігалось у випадку застосування всіх використаних препаратів, проте ефективність запропонованих варіантів патогенетичної корекції різна. Одночасне застосування кверцетину і аprotиніну при розвитку реперфузійного синдрому більш ефективно знижує активність неспецифічних протеїназ і відновлює локальний антипротеїназний інгібіторний потенціал. Найбільш суттєві зрушення виявились при одночасному застосуванні інгібіторів протеолізу, антиоксидантів і аналогів природного простагландину E1. Причому слід зазначити, що нормалізація показників супроводжувалася поліпшенням стану експериментальних тварин і підвищенням їх виживання.

Застосування інгібітора протеїназ аprotиніну, антиоксиданту кверцетину і аналога природного простагландину E1 знижувало інтенсивність утворення продуктів вільнорадикального окислення ліпідів у сироватці крові експериментальних тварин, а також підвищувало антиоксидантний потенціал у гемолізаті і сироватці крові. Так, у ході проведених досліджень було виявлено, що найбільш ефективно придушувала зрослу (в результаті ішемічно-реперфузійного пошкодження) активність вільних радикалів «потрійна» комбінація. ТБК-активні продукти при цьому знижувалися на 34,4%.

Комбіноване використання антиоксиданту, інгібітора протеїназ і аналога простагландину E1 виявлялося ефективним також щодо впливу на ендогенний антиоксидантний потенціал. Так, застосування вищевказаної «потрійної» комбінації сприяло нормалізації рівня СОД у крові, значення якої не відрізнялися від параметрів контрольної групи.

Таким чином, застосування аprotиніну, кверцетину та альпростану для патогенетичної корекції ішемічно-реперфузійного ураження сприяє зниженню активності процесів ліпопероксидації і попереджає виснаження системних механізмів антиоксидантного захисту. При цьому поєднане застосування вищевказаних препаратів патогенетичної корекції для більшості досліджуваних показників процесів вільнорадикального окислення

та антиоксидантного захисту виявилось більш ефективним, ніж їх ізольоване введення.

Слід зазначити, що ефективність патогенетичної терапії відзначена не тільки на системному, але й на локальному рівні - у гомогенатах скелетних м'язів. Експериментальними дослідженнями встановлено, що комбіноване застосування антиоксиданту, інгібітора протеїназ і аналога простагландину E1 виявилось найбільш ефективним щодо зниження вільнорадикального окислення ліпідів у супернатантах гомогенатів скелетних м'язів щурів, яким проводилася патогенетична терапія.

Патогенетична терапія 12-годинного реперфузійного синдрому викликала значне зростання КПА у супернатантах гомогенатів скелетних м'язів щурів у 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 у 3 рази у порівнянні з щурами без лікування і перевищив показник групи інтактних тварин.

Використання інгібітора протеїназ та аналогу простагландину E1 для патогенетичної корекції реперфузійного синдрому не зробило істотного впливу на рівень СОД у супернатантах гомогенатів скелетних м'язів щурів. Найбільш виражений ефект був виявлений у групі з «потрійним» застосуванням антиоксиданту, інгібітору протеїназ і аналогу простагландину. Так, рівень СОД у даній групі у 2,1 рази перевищив показник щурів без лікування і на 44,0% показник групи інтактних тварин.

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

Вивчення патоморфологічної картини при розвитку ішемічно-реперфузійного ураження на тлі попереднього введення апротиніну, кверцетину та альпростану також виявило значні позитивні зміни. Так, у тканинах скелетних м'язів на тлі застосування препаратів у меншій мірі були виражені ознаки мікроциркуляторних порушень, які обмежувалися повнокрів'єм судин мікроциркуляторного русла, периваскулярним та інтерстиціальним набряком. При цьому не спостерігалось ознак розпаду цитоплазми і порушення цілісності клітинної мембрани і, відповідно, не було фрагментації м'язових волокон. Запальна інфільтрація на тлі застосування «потрійної» комбінації була вкрай слабка і виявлялася наявністю у периваскулярних зонах незначної кількості лімфоцитів. Електронно-мікроскопічне дослідження м'язової тканини щурів з ішемічно-реперфузійним пошкодженням на тлі застосування вищевказаної комбінації препаратів також продемонструвало позитивну динаміку у морфологічній картині.

Таким чином, протекторний ефект кверцетину, апротиніну і альпростану значно зменшив вираженість ознак морфологічної альтерації у скелетних м'язах. При цьому ознаки порушень мікроциркуляції були виражені у значно меншому ступені, ніж у тварин з аналогічною поразкою без корекції. При застосуванні препаратів знижувалася інтенсивність деструктивних змін, що свідчить про патогенетичну доцільність їх застосування з метою корекції реперфузійного синдрому.

Отримані у результаті проведених досліджень результати свідчать про те, що більш патогенетично обґрунтованим і ефективним є поєднане застосування інгібіторів протеїназ, антиоксидантів і аналогів природного простагландину E1. В основі механізму органопротекторної дії поєданого застосування вищевказаних препаратів лежить оптимізація обмінних процесів, поліпшення мікроциркуляції та оксигенації тканин, а також стабілізація біологічних мембран у результаті антипротеїназних, антиоксидантних і ендотелій-стабілізуючих властивостей.

Цей висновок відповідає даним літератури про те, що апротинін, крім протекторної дії на білкові компоненти клітинних мембран, покращує реологічні властивості крові, а відповідно і мікроциркуляцію [195]. Крім того, його поліпотентний інгібіторний ефект сприяє обмеженню безконтрольного підвищення кількості БАВ, що утворюються при активації білкових регуляторних плазмових систем. Антигіпоксична дія кверцетину, а також антиоксидантна протекція клітинних мембран сприяють нормалізації кисневого і енергетичного балансів, а здатність пригнічувати 6-ліпооксигеназу блокує утворення таких потужних медіаторів запалення, як лейкотрієни [196]. Аналог простагландину E1 має виражені ендотелій-стабілізуючі властивості, ефективно пригнічує активацію нейтрофілів і лізосомальних ферментів [197].

Як показали проведені дослідження, експериментальна медикаментозна корекція реперфузійного синдрому з використанням антиоксидантів, інгібіторів протеїназ і аналогів природного простагландину E1 сприяла зростанню антипротеїназного і антиоксидантного потенціалу. У результаті комплексного патогенетичного медикаментозного впливу був отриманий найбільш виражений позитивний ефект, що забезпечує одночасний вплив на декілька патогенетичних ланок розвитку синдрому ішемії-реперфузії, що виявляється збільшенням протекторного потенціалу м'язової тканини, що зазнала реперфузії. Очевидно, на тлі гальмування вільнорадикальних процесів і гіперпротеолізу, поліпшення мікроциркуляції та оксигенації, стабілізації клітинних мембран зростають компенсаторні можливості. Це дозволяє рекомендувати подальше вивчення та клінічне обґрунтування для впровадження у практику охорони здоров'я поєднане застосування вищевказаних препаратів при розвитку реперфузійного синдрому.

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 не вирішеним 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

тривалістю 12 г 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 активності супероксиддисмутази, каталазоподібної активності – на 31,8 % ($p<0,001$) і на 52,0 % ($p<0,001$) 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 призведе 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 гомогенетах 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 аналога 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 ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Мойбенко А. А. Системные молекулярно-генетические механизмы кардиопротекции / А. А. Мойбенко // *Фізіологічний журнал*. — 2011. — Т. 57, № 5. — С. 51–54.
2. Гриценко С.Н. Гемодинамика и кислородный режим при реперфузии печеночного трансплантата /С.Н. Гриценко, В.А. Собакаръ, В.В. Саленюк // *Досягнення біології та медицини*. — 2012. — №1(19). — С.38–42.
3. 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.
4. 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.
5. Inter-society consensus for the management of peripheral arterial disease (TASC II) / L. Norgren, W.R. Hiatt, J.A. Dormandy [et al.] // *Eur J Vasc Endovasc Surg*. — 2007. — Vol. 33(Suppl. 1). — P.1–75.
6. Population-based study of event-rate, incidence, case fatality, and mortality for all acute vascular events in all arterial territories (Oxford Vascular Study) / P.M. Rothwell, A.J. Coull, L.E. Silver [et al.] // *Lancet*. — 2005. — Vol.366. — P.1773–1783.
7. Бойко В.В. Ультраструктура гладких миоцитов мышечного слоя кишечника экспериментальных животных с моделированной гипоксией / В.В. Бойко, В.Г. Грома, В.П. Невзоров // *Експериментальна і клінічна медицина*. — 2011. — №3. — С.22–25.
8. Новикова Н.А. Возможности реперфузионной терапии при остром коронарном синдроме с подъемом сегмента ST /Н.А. Новикова, М.Ю.

- Гиляров, А.Л. Сыркин // Болезни сердца и сосудов. — 2011. — № 3. — С.8–10.
9. Protective effect of focal adhesion kinase against skeletal muscle reperfusion injury after acute limb ischemia /M. Flück, R.S. von Allmen, C. Ferrié [et al.] //Eur J Vasc Endovasc Surg. —2015. — Vol.49, N3. —P. 306–313.
 10. Effects of hyperbaric oxygen on glucose, lactate, glycerol and anti-oxidant enzymes in the skeletal muscle of rats during ischaemia and reperfusion / G. Bosco, Z.J. Yang, J. Nandi [et al.] //Clin Exp Pharmacol Physiol. —2007. — Vol.34, N1–2. —P.70–76.
 - 11.Патогенетическое значение протеолитических и цитокиновых механизмов при реперфузионном синдроме / М.И. Федосов, И.И. Фомочкина, А.В. Кубышкин [и др.] // Таврический медико-биологический вестник. — 2012. —Т. 15, № 3, Ч.1. — С. 354–357.
 - 12.Симонян Л.Г. Система перекисного окисления липидов и ее участие в патологических процессах /Л.Г. Симонян //Кровь. —2013. — №1. — С.29–31.
 - 13.Анисимова Л.В. Роль активации неспецифических протеиназ сыворотки крови в формировании синдрома полиорганной недостаточности /Л.В. Анисимова // Вестник неотложной и восстановительной медицины. —2013. —Т.14, №2. —С.193–195.
 - 14.Соколова О.В. Нарушения функции печени при синдроме полиорганной недостаточности у кардиохирургических больных /О.В. Соколова // Вестник Национального медико-хирургического Центра им. Н.И. Пирогова. —2012. —№2. —С.127–132.
 - 15.Determinants of microvascular damage recovery after acute myocardial infarction: results from the acute myocardial infarction contrast imaging (AMICI) multicentre study/ S. Funaro, L. Galiuto, F. Boccacini [et al.]// Eur. J. Echocardiogr. — 2011. — Vol. 12, N 4. — P. 306–312.
 - 16.Combined treatment of ulinastatin and tranexamic acid provides beneficial effects by inhibiting inflammatory and fibrinolytic response in patients

- undergoing heart valve replacement surgery / T.T. Chen, Jiandong-Liu, G. Wang [et al.] // Heart. Surg. Forum. — 2013. — Vol. 16, N 1. — P. 38–47.
- 17.Мойбенко А. А. Патогенетическое обоснование эффективности нового отечественного кардиопротектора корвитина (водорастворимого кверцетина) при остром инфаркте миокарда / А. А. Мойбенко // Вісник фармакології та фармації. — 2007. — № 5. — С. 38–47.
- 18.Protective effect of quercetin on renal ischemia/reperfusion injury in rats / A. Kahraman, N. Erkasap, M. Serteser, T. Köken // J. Nephrol. — 2003. — Vol. 16, N2. — P. 219–224.
- 19.The effects of desferrioxamine and quercetin on liver injury induced by hepatic ischaemia-reperfusion in rats / C. Tokyol, S. Yilmaz, A. Kahraman [et al.] // Acta Chir Belg. — 2006. — Vol.106, N1. — P. 68–72.
- 20.Zohrab'ian R.O. [Effect of antioxidants lipin and quercetin on indices of lipid peroxidation and antioxidant system in recipients of renal allotransplants] [Article in Ukrainian] / R.O. Zohrab'ian // Klin. Khir. — 2010. — Vol. 7. —P. 41–44.
- 21.The effect of PGE administration on the activity of oxidative system in erythrocytes and platelets during ischemia reperfusion injury and on postoperative renal function in patients undergoing open abdominal aortic aneurysm reconstruction / W. Blogowski, B. Dolegowska, E. Pikula [et al.] // J Biol Regul Homeost Agents. — 2012. — Vol. 26, N 3. — P. 429–438.
- 22.Eliason J.L. Metabolic consequences of acute limb ischemia and their clinical implications /J.L. Eliason, T.W. Wakefield // Semin Vasc Surg. — 2009. — Vol.22, N1. —P.29–33.
- 23.Effects of ischemic preconditioning and cilostazol on muscle ischemia-reperfusion injury in rats / C.A. Frias Neto, M.K. Koike, K.R. Saad [et al.] // Acta Cir Bras. —2014. — Vol. 29, Suppl 3. —P.17–21.
- 24.Blaisdell F.W. The pathophysiology of skeletal muscle ischemia and the reperfusion syndrome: a review / F. W. Blaisdell // Cardiovasc Surg. — 2002. — Vol.10, N 6. —P.620–630.

25. Progression in attenuating myocardial reperfusion injury: an overview / F.J. Bernink, L. Timmers, A.M. Beek [et al.] // *Int J Cardiol.* —2014. — Vol.170, N3. —P. 261–269.
26. Widgerow A.D. Ischemia-reperfusion injury: influencing the microcirculatory and cellular environment / A.D. Widgerow // *Ann Plast Surg.* —2014. — Vol.72, N 2. —P. 253–260.
27. Taurine inhibits ischemia/reperfusion-induced compartment syndrome in rabbits / J.X. Wang, Y. Li, L. K. Zhang [et al.] // *Acta Pharmacol Sin.* — 2005. — Vol.26, №7. —P.821–827.
28. Propofol inhibits superoxide production, elastase release, and chemotaxis in formyl peptide-activated human neutrophils by blocking formyl peptide receptor 1 / S.C. Yang, P.J. Chung, C.M. Ho [et al.] // *J Immunol.* —2013. — Vol.190, N 12. —P.6511–6519.
29. U50,488H inhibits neutrophil accumulation and TNF- α induction induced by ischemia-reperfusion in rat heart / X. Wu, B. Zhang, R. Fan [et al.] // *Cytokine.* —2011. — Vol.56, N 2. —P. 503–507.
30. Concentration decrease of nitric oxide in the postischemic muscle is not only caused by the generation of O₂⁻ / F. Stoffels, F. Lohöfener, M. Beisenhertz [et al.] // *Microsurgery.* —2007. — Vol.27, N 6. —P.565–568.
31. Effect of superoxide dismutase on adhesion molecules expression in skeletal muscle ischemia/reperfusion injury in rats / S. Lu, X. Wang, L. Wen [et al.] // *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* —2002. — Vol.82, №12. —P.840–843.
32. Comparison of changes in markers of muscle damage induced by eccentric exercise and ischemia/reperfusion / Q.S. Su, J. G. Zhang, R. Dong [et al.] // *Scand J Med Sci Sports.* —2010. — Vol.20, N 5. —P. 748-756.
33. Changes of serum MDA and SOD levels in ischemia-reperfusion injuries of the limbs in rats preconditioned with heat stress / Y. J. Sun, Wang Q, G.X. Pei [et al.] // *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao.* —2002. — Vol.22, N 6. — P.506–508.

34. Protective antioxidant effects of carvedilol in a rat model of ischaemia-reperfusion injury / H. Akbas, M. Ozden, M. Kanko, H. Maral [et al.] // *J Int Med Res.* —2005. — Vol.33, N 5. —P. 528–536.
35. Ischemia-reperfusion injury in rat skeletal muscle is attenuated by zinc aspartate / E. Atahan, Y. Ergun, E. Belge Kurutas [et al.] // *J Surg Res.* — 2007. — Vol.137, N 1. — P. 109–116.
36. Accentuated oxidative stress following reperfusion injury in diabetic rats / W.K. Edrees, I.S. Young, L. L. Lau [et al.] // *Int Angiol.* —2002. Vol.21, N1. —P.58–62.
37. The effect of a nitroxide antioxidant on ischemia-reperfusion injury in the rat in vivo hind limb model / D. Arieli, G. Nahmany, N. Casap [et al.] // *Free Radic Res.* —2008. —Vol.42, N 2. —P.114–123.
38. Contralateral leg as a control during skeletal muscle ischemia-reperfusion / F. Thaveau, J. Zoll, J. Bouitbir [et al.] // *J Surg Res.* —2009. —Vol.155, № 1. —P. 65–69.
39. Tourniquet-induced acute ischemia-reperfusion injury in mouse skeletal muscles: Involvement of superoxide / T.P. Tran, H. Tu, II Pipinos [et al.] // *Eur J Pharmacol.* —2011. —Vol.650, N 1. —P. 328–334.
40. The role of different chemical modifications of superoxide dismutase in preventing a prolonged muscular ischemia/ reperfusion injury /R. Giardino, G. Giavaresi, M. Fini [et al.] // *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol.* —2002. — Vol.30, № 3. — P. 189–198.
41. Menger M.D. Pathomechanisms of ischemia-reperfusion injury as the basis for novel preventive strategies: is it time for the introduction of pleiotropic compounds? / M.D. Menger, B. Vollmar // *Transplant Proc.* —2007. — Vol.39, N 2. —P. 485–488.
42. Reperfusion syndrome: cellular mechanisms of microvascular dysfunction and potential therapeutic strategies / H.R. Girn, S. Ahilathirunayagam, A.I. Mavor, S. Homer-Vanniasinkam // *Vasc Endovascular Surg.* —2007. — Vol.41, № 4. —P. 277–293.

43. Mohamed Mokhtarudin M. J. Mathematical model of the effect of ischemia-reperfusion on brain capillary collapse and tissue swelling / M.J. Mohamed Mokhtarudin, S.J. Payne // *Math Biosci.* — 2015. — Vol.263. — P.111–120.
44. Combined L-arginine and antioxidative vitamin treatment mollifies ischemia-reperfusion injury of skeletal muscle/ J. Nanobashvili, C. Neumayer, A. Fuegl [et al.] // *J Vasc Surg.* —2004. —Vol.39, №4.—P. 868–877.
45. Abdulhannan P. Peripheral arterial disease: a literature review/ P. Abdulhannan, D.A. Russell, S. Homer-Vanniasinkam // *Br Med Bull.* — 2012. —Vol.104.—P. 21–39.
46. Engledow A.H. Acute lower limb ischaemia / A.H. Engledow, J.N. Crinnion // *Hosp Med.* — 2002. —Vol.63, №7. —P. 412–415.
47. Protective effect of zinc aspartate on long-term ischemia-reperfusion injury in rat skeletal muscle / E. Atahan, Y. Ergün, E.B. Kurutaş, T. Alici // *Biol Trace Elem Res.* —2010. —Vol.137, N 2. —P. 206–215.
48. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) protects rat skeletal muscle against ischemia-reperfusion-induced oxidative stress/ H. Ozyurt, B. Ozyurt, K. Koca, S. Ozgocmen // *Vascul Pharmacol.* —2007. —Vol.47, №2-3. —P. 108–112.
49. Protective effects of melatonin on ischemia-reperfusion injury of skeletal muscle/ M. Erdem, B. Bostan, T. Güneş [et al.] // *Eklem Hastalik Cerrahisi.* —2010. — Vol.21, N3. — P. 166–171.
50. Liao J.K. Linking endothelial dysfunction with endothelial cell activation/ J.K. Liao // *J Clin Invest.* —2013. —Vol.123, N2. —P.540–541.
51. Sarelius I.H. Control of vascular permeability by adhesion molecules/ I.H. Sarelius, A.J. Glading // *Tissue Barriers.* —2015. —Vol.3, №1-2. —P. e985954.
52. Influence of short-term L-arginine supplementation on carbohydrate balance in rats with ischemia-reperfusion syndrome /H. Krauss, P. Bogdański, P.

- Sosnowski [et al.] // Pharmacol Rep. —2012. —Vol.64, N 3. —P. 635–642.
- 53.Hiraiwa K. Novel findings from an animal tourniquet shock mode / K. Hiraiwa // Nihon Hoigaku Zasshi. — 2003. —Vol.57, №2. —P. 125–134.
- 54.Statins inhibit neutrophil infiltration in skeletal muscle reperfusion injury/ P.A. Cowled, A. Khanna, P.E. Laws [et al.] // J Surg Res. —2007. — Vol.141, N 2. —P. 267–276.
- 55.Simvastatin plus nitric oxide synthase inhibition modulates remote organ damage following skeletal muscle ischemia-reperfusion injury/ P.A. Cowled, A. Khanna, P.E. Laws [et al.] // J Invest Surg. —2008. — Vol.21, N3. — P.119–126.
- 56.Influence of L-arginine on the nitric oxide concentration and level of oxidative stress during ischemia-reperfusion injury in a rat model / H. Krauss, A. Jablecka, P. Sosnowski, P. Bogdanski // Int J Clin Pharmacol Ther. —2009. — Vol.47, N8. —P. 533–538.
- 57.Effect of nitric oxide on the contractile function of rat reperfused skeletal muscle / K. Ikebe, T. Kato, M. Yamaga [et al.] // J Surg Res. —2002. — Vol.106, N1. —P.82–85.
- 58.Minguer G. Preconditioning and protection against ischaemia-reperfusion in non-cardiac organs: a place for volatile anaesthetics? /G. Minguer, J. Joris, M. Lamy // Eur. J. Anaesth. —2007. —Vol. 24,N9. —P. 733–745.
59. Анестетическое прекондиционирование: Почему данные, полученные в эксперименте, не всегда подтверждаются в клинике? /В.В. Лихванцев, О.А.Гребенчиков, Е.А. Шмелева, Ю.В. Скрипкин //Вестник анестезиологии и реаниматологии. —2013. — Т.10,№4. —С. 9–14.
- 60.Ischemic preconditioning prevents skeletal muscle tissue injury, but not nerve lesion upon tourniquet-induced ischemia / M. Schoen, R. Rotter, P. Gierer [et al.] // J Trauma. —2007. — Vol.63, N4. —P.788–797.

61. Noninvasive limb ischemic preconditioning protects against myocardial I/R injury in rats/ S.J. Li, Y.N. Wu, Y. Kang [et al.] // J Surg Res. — 2010. — 164, N1. — P.162–168.
62. Role of nitric oxide in the mechanism of preclamping and remote ischemic preconditioning of adipocutaneous flaps in a rat model / M.V. Küntscher, S. Juran, J. Altmann [et al.] // Reconstr Microsurg. —2003. — Vol.19, N1. —P.55–60.
63. Remote Ischemic Preconditioning Protects the Brain Against Injury After Hypothermic Circulatory Arrest/ H. A. Jensen, S. Loukogeorgakis, F. Yannopoulos [et al.] // Circulation. —2011. —Vol.123. —P.714–721.
64. Synthesis and characterization of novel indole derivatives reveal improved therapeutic agents for treatment of ischemia/reperfusion (I/R) injury/ W. Bi, Y. Bi, P. Xue [et al.] // J Med Chem. —2010. —Vol.53, N18. —P.6763–6767.
65. Comparison of histopathologic effects of carnitine and ascorbic acid on reperfusion injury/ H. Akar, A. Saraç, C. Konuralp [et al.] // Eur J Cardiothorac Surg. —2001. —Vol.19, №4. —P. 500–506.
66. Pentoxifylline prevents endothelial damage due to ischemia and reperfusion injury/ D.A. Coe, J.A. Freischlag, D. Johnson [et al.] // J Surg Res. — 1997. —Vol.67, N1. —P. 21–25.
67. Protective effects of antioxidant medications on limb ischemia reperfusion injury/ C. Bolcal, V. Yildirim, S. Doganci [et al.] // J Surg Res. —2007. — Vol.139,N2. — P.274–279.
68. Attenuation of ischemia/reperfusion injury by N-acetylcysteine in a rat hind limb model/ C. Koksal, A.K. Bozkurt, U. Cangel [et al.] // J Surg Res. — 2003. — Vol. 111,N 2. —P.236–239.
69. Attenuation of acute lung injury following lower limb ischemia/reperfusion: the pharmacological approach / C. Koksal , A.K. Bozkurt , N. Ustundag [et al.] // J Cardiovasc Surg (Torino). —2006. — Vol.47, N4. —P.445–449.

70. Da Silveira M. Trimetazidine and N-acetylcysteine in attenuating hind-limb ischemia and reperfusion injuries: experimental study in rats/ M. Da Silveira, W. B. Yoshida // *Int Angiol.* —2009. —Vol.28, N5. — P.412–417.
71. Lehmann Ch. Biochemistry and pathophysiology of ischemia and reperfusion /Ch. Lehmann // *Dtsch Med Wochenschr.* —2009. — Bd.134, Suppl 11. — S. 409–410.
72. Hong Y. Hydrogen as a selective antioxidant: a review of clinical and experimental studies/ Y. Hong, S. Chen, J.M. Zhang // *J Int Med Res.* — 2010. —Vol.38, N 6. —P. 1893–1903.
73. Sildenafil citrate protects skeletal muscle of ischemia-reperfusion injury: immunohistochemical study in rat model / D.M. Armstrong, C. Armstrong Ada, R.C. Figueiredo [et al.] // *Acta Cir Bras.* —2013. — Vol.28, N4. — P.282–287.
74. Effect of clopidogrel on nitric oxide levels in an ischemia reperfusion model / M. Kanko, M. Ozden, H. Maral, C. Acil // *J Cardiovasc Pharmacol.* — 2006. — Vol.48, N1. —P. 797–801.
75. Reingardienė D. Muscle crush injury and crush syndrome / D. Reingardienė, L. Jodžiūnienė, R. Lažauskas // *Medicina (Kaunas).* —2010. — Vol.46, N6. — P. 435–441.
76. Effect of postconditioning in major vascular operations on rats/ A. Szijártó, E. Gyurkovics, P. Arányi [et al.] // *Magy Seb.* —2009. — Vol.62, N4. — P. 180–187.
77. Активные формы кислорода и азота: друзья или враги?/ Д.Б. Зоров, С.Ю. Банникова, В.В. Белоусов [и др.] // *Биохимия.* — 2005. —Т.70, N2. —С.215–221.
78. Перспективы митохондриальной медицины / Д.Б. Зоров, Н.К. Исаев, Е.Ю. Плотников [и др.] // *Биохимия.* —2013. —Т.78, N9. —С.1251–1264.
79. Механизмы повреждения и защиты клетки при ишемии-реперфузии и экспериментальное обоснование применения препаратов на основе

- лития в анестезиологии /В.В. Мороз, Д.Н. Силачев, Е.Ю.Плотников [и др.]// Общая реаниматология. —2013. — Т.9 ,N1. —С. 63–72.
- 80.Targeting an antioxidant to mitochondria decreases cardiac ischemia-reperfusion injury/ V.J. Adlam, J.C. Harrison, C.M. Porteous [et al.] //FASEB J. — 2005. —Vol. 19,N9. — P.1088–1095.
 - 81.Targeting mitochondria /A.T. Hoye, J.E. Davoren, P. Wipf [et al.] // Acc. Chem. Res. —2008. —Vol. 41. —P. 87–97.
 - 82.Mechanisms of nephroprotective effect of mitochondria-targeted antioxidants under rhabdomyolysis and ischemia/reperfusion/ E. Y. Plotnikov, A.A. Chupyrkina, S. S. Jankauskas [et al.] // Biochim. Biophys. Acta. —2011. —Vol. 1812. — P. 77–86.
 - 83.Flavonoids as prospective compounds for anti-cancer therapy/ D. Ravishankar, A.K. Rajora, F. Greco, H.M. Osborn // Int J Biochem Cell Biol. —2013. —Vol.45, N 12. —P. 2821–2831.
 - 84.Novel flavonoids as anti-cancer agents: mechanisms of action and promise for their potential application in breast cancer / C. Martinez-Perez, C. Ward, G. Cook [et al.] // Biochem Soc Trans. —2014. — Vol.42, N4. — P.1017–1023.
 - 85.Hoensch H. Anti-inflammatory effects of tea-flavonoids /H. Hoensch, R. Oertel // Dtsch Med Wochenschr. —2012. —Vol.137, N51-52. —P. 2738–2740.
 - 86.Tanaka T. Flavonoids for allergic diseases: present evidence and future perspective/T. Tanaka // Curr Pharm Des. — 2014. —Vol.20, N6. —P. 879–885.
 - 87.Oh Y.S. Role of bioactive food components in diabetes prevention: effects on Beta-cell function and preservation/ Y.S. Oh, H.S. Jun // Nutr Metab Insights. —2014. —Vol.6, N7. —P. L51–59.
 - 88.Tanaka T. Flavonoids and asthma/T. Tanaka, R. Takahashi // Nutrients. — 2013. — Vol.5, N6. —P. 2128–2143.

89. Neuroprotective actions of flavones and flavonols: mechanisms and relationship to flavonoid structural features / F. Dajas, A.C. Andrés, A. Florencia [et al.] // *Cent Nerv Syst Agents Med Chem.* —2013. —Vol.13, N1. —P.30–35.
90. Mojziso G. Flavonoids and their importance in cardiovascular disease prevention/G. Mojziso, J. Koprovicova, D. Petrasova // *Slov Lek.* — 2000. — Vol. 10. —P. 352–351.
91. Evaluation of selected flavonoids as antiangiogenic, anticancer, and radical scavenging agents: an experimental and in silico analysis / R.N. Gacche, H.D. Shegokar, D.S. Gond [et al.] // *Cell Biochem Biophys.* —2011. — Vol.61,N 3. —P. 651–663.
92. Welch AA. The effects of flavonoids on bone /A.A. Welch, A.C Hardcastle // *Curr Osteoporos Rep.* —2014. — Vol.12,N2. —P.205–210.
93. Metabolism of flavonoids in human: a comprehensive review/Z. Chen, S. Zheng, L. Li, H. Jiang // *Curr Drug Metab.* —2014. —Vol.15,N1. — P. 48–61.
94. Cotel N. Role of flavonoids in oxidative stress/ N. Cotel // *Curr Top Med Chem.* —2001. — Vol.1,N6. —P. 569–590.
95. Woodman O.L. Vascular and anti-oxidant actions of flavonols and flavones/ O.L. Woodman, E. Ch. Chan // *Clin Exp Pharmacol Physiol.* — 2004. — Vol. 31,N11. —P. 786–790.
96. Effects of red grape juice polyphenols in NADPH oxidase subunit expression in human neutrophils and mononuclear blood cells/ A. Dávalos, G. de la Peña, C.C. Sánchez-Martín [et al.] // *Br J Nutr.* —2009. — Vol.102,N 8. —P.1125–1135.
97. Protective effects of resveratrol in ischemia-reperfusion injury of skeletal muscle: A clinically relevant animal model for lower extremity ischemia/ M.Ikizler, C.Ovali, S. Dernek [et al.] // *Chin J Physiol.* —2006. — Vol. 49,N4. —P.204–209.

98. Mamta G. Recent patents on flavonoids/G. Mamta, Y. K. Bansal, S. S. Sandhu // *Recent Pat Biotechnol.* —2013. — Vol.7,N3. —P. 179–196.
99. Role of herbal bioactives as a potential bioavailability enhancer for Active Pharmaceutical Ingredients/A. Ajazuddin Alexander, A. Qureshi, L. [et al.] // *Fitoterapia.* — 2014. — Vol.97. — P.1–14.
100. Nanoparticle-delivered quercetin for cancer therapy/ K. Men, X. Duan, X. W. Wei [et al.] // *Anticancer Agents Med Chem.* —2014. — Vol.14,N 6. — P. 826–832.
101. Effects of Daflon on oxidative stress induced by hindlimb ischemia/reperfusion/A. Unlü, N. Sucu, L. Tamer [et al.] // *Pharmacol Res.* —2003. — Vol.48,N 1. —P. 11–15.
102. The role of urtica dioica (urticaceae) in the prevention of oxidative stress caused by tourniquet application in rats/E. Cetinus, M. Kilinc, F. Inanc [et al.] // *Tohoku J Exp Med.* —2005. — Vol.205, N3. —P. 215–221.
103. The protective efficacy of magnolol in hind limb ischemia-reperfusion injury/ H. Y.Chen, Y.C. Hung, E.J. Lee [et al.] // *Phytomedicine.* —2009. —Vol.16, N 10. —P. 976–981.
104. Hesperidin pretreatment protects hypoxia-ischemic brain injury in neonatal rat/Z. Rong, R. Pan, Y. Xu [et al.] // *Neuroscience.* —2013. — Vol.255. —P. 292–299.
105. Effect of *Salvia leriifolia* Benth. root extracts on ischemia-reperfusion in rat skeletal muscle/ H. Hosseinzadeh, A. Hosseini, M. Nassiri-Asl, H.R. Sadeghnia // *BMC Complement Altern Med.* — 2007. —Vol. 7, N7. — P. 23.
106. Bioavailability of quercetin: problems and promises/X. Cai, Z. Fang, J. Dou. [et al.] // *Curr Med Chem.* —2013. —Vol.20(20. —P. 2572–2582.
107. Isoquercitrin: pharmacology, toxicology, and metabolism/ K. Valentová, J. Vrba, M. Banciřová [et al.] // *Food Chem Toxicol.* —2014. —Vol.68. —P.267–282.

108. Биофлавоноиды как органопротекторы (кверцитин, корвитин, квертин)/ Н.П. Максютин, А.А. Мойбенко, Н.А. Мохарт [и др.]. — К.: Наук. думка, 2012. — 274 с.
109. Flavonols and flavan-3-ols as modulators of xanthine oxidase and manganese superoxide dismutase activity/Di Majo D, M. La Guardia , G. Leto [et al.] // Int J Food Sci Nutr. —2014. —Vol. 65,N7. — P. 886–892.
110. The flavonoid quercetin induces apoptosis and inhibits JNK activation in intimal vascular smooth muscle cells/ Francisco Perez-Vizcainoa, David Bishop-Bailleya, Federica Lodib [et al.] // Biochemical and Biophysical Research Communications. —2006. — Vol.346, № 3, 4. —P.919–925.
111. Protective effect of quercetin on ischemia/reperfusion-induced gastric mucosal injury in rats/ J. Mojzis, K. Hviscová, D. Germanova [et al.] // Physiol Res. —2001. — Vol.50, N5. —P. 501–506.
112. Involvement of nitric oxide in angiogenic activities of vascular endothelial growth factor isoforms/ A. Józkowicz, J. Dulak, A. Nigisch [et al.] // Growth Factors. —2004. — Vol.22, N1.—P.19–28.
113. Ginkgo biloba extract-induced relaxation of rat aorta is associated with increase in endothelial intracellular calcium level / Y. Kubota, N. Tanaka, K. Umegaki [et al.] // Life Sci. —2001. —Vol.69,N20. —P. 2327–2336.
114. Пузанов С.Ю. Влияние антиоксидантов на липиды ткани печени белых крыс при экспериментальном перитоните / С.Ю. Пузанов, В.А. Трофимов, Е.Н. Сальникова // Современные наукоемкие технологии. — 2006. —№ 1. —С. 46– 48.
115. Експериментальні підходи до профілактики та лікування синдрому гострого ушкодження легень з використанням інгібіторів протеїназ і корвітину / О.О. Мойбенко, А.В. Кубишкін, В.З. Харченко [и др.] //Фізіологічний журнал. —2003. —№4. — С.63–67.

116. Sotiropoulou G. Targeting the kallikrein-related peptidases for drug development / G. Sotiropoulou, G. Pampalakis // *Trends Pharmacol Sci.* — 2012. — Vol.33, N12. — P.623–634.
117. Hillmeister P. The Kallikrein-Kinin system / P. Hillmeister, P.B. Persson // *Acta Physiol (Oxf).* — 2012. — Vol.206, N4. — P. 215–219.
118. The kinin-kallikrein system: physiological roles, pathophysiology and its relationship to cancer biomarkers / E. Kashuba, J. Bailey, D. Allsup, L. Cawkwell // *Biomarkers.* — 2013. — Vol.18, N 4. — P. 279–296.
119. Веремеенко К.Н. Протеолиз в норме и при патологии / К.Н. Веремеенко, О.П. Голобородько, А.И. Кизим . — К. : Здоров'я, 1988 . — 199 с.
120. Жирнов О. П.. Мишени противовирусного и противовоспалительного действия апротинина: перспективы нового использования / О. П. Жирнов, С. В. Поярков, Н. А. Малышев // *Пульмонология.* — 2009. — Т. 33, № 3. — С. 27–33.
121. Кирпиченок Л.Н. Значение компонентов системы протеолиза в регуляции воспалительных реакций /Л.Н. Кирпиченок // *Медико-биологические проблемы жизнедеятельности.* — 2010. — №2(4). — С.15–23.
122. Bull D. A. Aprotinin and preservation of myocardial function after ischemia-reperfusion injury/ D.A. Bull, J. Maurer // *Ann Thorac Surg.* — 2003. — Vol.75, N 2. — S.735–739.
123. Anti-inflammatory actions of serine protease inhibitors containing the Kunitz domain/ H. Shigetomi, A. Onogi, H. Kajiwara [et al.] // *Inflamm Res.* — 2010. — Vol.59, N 9. — P. 679–687.
124. Safavi F. Role of serine proteases in inflammation: Bowman-Birk protease inhibitor (BBI) as a potential therapy for autoimmune diseases/ F. Safavi, A. Rostami // *Exp Mol Pathol.* — 2012. — Vol.93, N3. — P.428–433.

125. Serpins for diagnosis and therapy in cancer/ D. Zheng, H. Chen, J. Davids [et al.] // Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets. —2013. — Vol.13,N2. — P.123–132.
126. Khokha R. Metalloproteinases and their natural inhibitors in inflammation and immunity /R. Khokha R, A. Murthy, A. Weiss // Nat Rev Immunol. —2013. —Vol. 13,N9. — P. 649–665.
127. Михальчук В.Н. Трипсиноподобные протеиназы в физиологии и биологии человека / В.Н. Михальчук // Актуальні проблеми транспортної медицини. — 2008. — № 4 (14). — С. 134–139.
128. Wewers M.D. Alpha-1 antitrypsin augmentation therapy/ M.D. Wewers, R.G. Crystal // COPD. —2013. —Vol.10 Suppl 1. —P. 64–67.
129. Акбашева О.Е. Ингибиторы протеиназ в регуляции плазменного и внутриклеточного протеолиза: автореф. дис. ... д-ра мед. наук / О.Е. Акбашева. —Томск, 2011. — 44 с.
130. Gyparaki M.T. Lysosome: the cell's 'suicidal bag' as a promising cancer target/ M.T. Gyparaki, A.G. Papavassiliou // Trends Mol Med. — 2014. —Vol.20, N5. —P. 239–241.
131. Кубышкин А.В. Патогенетическая взаимосвязь синдрома системной воспалительной реакции и шока / А.В. Кубышкин, И.И. Фомочкина //Вестник Санкт-Петербургского университета. Серия 11: Медицина. —2011. —№ 3. —С. 69–75.
132. Фомочкина И.И. Патогенетическое значение протеиназ-ингибиторной системы в развитии локальной и системной патологии / И.И. Фомочкина, А.В. Кубышкин //Патологія. —2012. —№ 2 (25). —С. 050–054.
133. Фомочкина И.И. Характер изменений неспецифических протеиназ и их ингибиторов при развитии критических состояний в эксперименте и клинике / И.И. Фомочкина //Международный научно-исследовательский журнал. —2014. —№ 11-4 (30). —С. 87–90.

134. Молекулярные механизмы развития экстремальных состояний и их коррекция/ В.З. Харченко, А.В. Кубышкин, И.И. Фомочкина [и др.]. — Симферополь: Доля, 2011. — 155 с.
135. Кирпиченок Л.Н. значение компонентов системы протеолиза в регуляции воспалительных реакций / Л.Н. Кирпиченок //Медико-биологические проблемы жизнедеятельности. —2010. —№ 2 (4). — С. 15–23.
136. Анисимова Л.В. Роль активации неспецифических протеиназ сыворотки крови в формировании синдрома полиорганной недостаточности / Л.В. Анисимова //Вестник неотложной и восстановительной медицины. —2013. —Т. 14, № 2. — С. 193–195.
137. Дивоча В.А. противовирусный препарат – ингибитор трипсиноподобных протеиназ из крови человека / В.А. Дивоча //Международный журнал экспериментального образования. —2013. — № 3. —С. 128–129.
138. Взаимодействие трипсиновых протеиназ и кининовой системы в перифокальной ткани полипов и злокачественных опухолей толстой кишки / О.И. Кит, Е.М. Франциянц, Л.С. Козлова, А.Л. Терпугов //Российский онкологический журнал. — 2013. —№ 3. —С. 14–17.
139. Дементьева И. И. Апротинин: безопасность применения в хирургической практике/ И. И. Дементьева, М. А. Парная, Ю. А. Морозов // Анестезиология и реаниматология. — 2007. — № 2. — С. 71–75.
140. Deanda A Jr. Aprotinin revisited / A Jr. Deanda, B.D. Spiess // J Thorac Cardiovasc Surg. —2012. —Vol.144, N 5. — P. 998–1002.
141. Сагач В.Ф. Відкриття мітохондріальної пори за умов оксидативного стресу при ішемії - реперфузії тканин стегна / В.Ф. Сагач, Е.Ф. Кахановський, В.С. Горбовець // Фізіологічний журн. — 2008. —Т. 54, N 3. — С. 47–51.

142. Alonso A. Pump prime only aprotinin inhibits cardiopulmonary bypass-induced neutrophil CD11b up-regulation/ A. Alonso, C.W. Whitten, G.T. Hill // *Ann Thorac Surg.* — 1999. — Vol.67, N2. — P. 392–395.
143. Attenuation of acute lung injury following lower limb ischemia/reperfusion: the pharmacological approach/ C. Koksai, A.K. Bozkurt, N. Ustundag [et al.] // *J Cardiovasc Surg (Torino).* —2006. — Vol.47, N4. —P. 445–449.
144. Early capillary no-reflow during low-flow reperfusion after hind limb ischemia in the rat/ F. Fitzal, F. A. DeLano, C. Young, G.W. Schmid-Schönbein GW. // *Ann Plast Surg.* —2002. — Vol.49, N2. — P. 170–180.
145. Веремеенко К.Н. Белковые ингибиторы плазмы крови – регуляторы активности протеолитических ферментов / К.Н. Веремеенко // *Системная энзимотерапия. Теоретические основы, опыт клинического применения.* — К.: МОРИОН, 2000. — С. 21–53.
146. Косинец А.Н. Протеиназы и их ингибиторы в гнойной хирургии и онкологии /А.Н. Косинец, Л.Н. Кирпиченок. — Витебск, 2003. — С. 410.
147. Активность эластазо-, коллагеназоподобных протеиназ и их ингибиторов в плазме крови при метаболизме коллагена в условиях хронического течения заболеваний печени вирусной и токсической этиологии / Е.В. Белобородова, Э.И. Белобородова, О.Е. Акбашева [и др.] // *Сибирский научный медицинский журнал.* —2010. — Т. 30, № 2. — С. 94–100.
148. Дивоча В.А. Роль ингибиторов протеиназ в патогенезе заболеваний человека (обзор литературы и собственных исследований, часть 1) / В.А. Дивоча, Е.Л. Дерибон // *Актуальные проблемы транспортной медицины.* —2013. —Т. 1, № 2 (32). —С. 127–137.
149. Анисимова Л.В. Неспецифические протеиназы и их ингибиторы при синдроме острого повреждения легких в эксперименте / Л.В.

- Анисимова, А.В. Кубышкин //Вестник неотложной и восстановительной медицины. — 2014. — Т. 15, № 2. —С. 296–299.
150. Ефременко Ю.Р. Протеолитические ферменты - высокочувствительный критерий эффективности и безопасности лечения / Ю.Р. Ефременко // Биомедицинская химия. —2008. — Т. 54, N2. — С. 179–183.
 151. Ермола Ю.А. Эффективность применения ингибиторов протеиназ и антиоксидантов в лечении экспериментального перитонита / Ю.А. Ермола, И.И. Фомочкина, А.В. Кубышкин //Загальна патологія та патологічна фізіологія. —2012. —Т. 7, № 2. — С. 37–43.
 152. Kallikrein-kinin system: a surgical perspective in post-aprotinin era/P. Saxena, Y. Thompson, d'Udekem, I.E. Konstantinov // J Surg Res. — 2011. —Vol.167,N1. —P.70–77.
 153. Sniecinski R.M. Bleeding and management of coagulopathy/ R.M. Sniecinski, J.H. Levy // J Thorac Cardiovasc Surg. —2011. —Vol.142, N 3. —P. 662–667.
 154. Aprotinin revisited: formulation, characterization, biodistribution and therapeutic potential of newaprotinin microemulsion in acute pancreatitis/ H. Y. Karasulu, N. Oruç, N. Üstündağ-Okur [et al.] // J Drug Target. —2015. —Vol. 4. —P. 1–13.
 155. Дементьева И.И. Лабораторная диагностика и клиническая оценка нарушений гомеостаза у больных в критическом состоянии/ И.И. Дементьева. — М.: Полиграф-центр, 2007. — 161 с.
 156. Aprotinin preserves myocardial biochemical function during cold storage through suppression of tumor necrosis factor / D.A. Bull, R.C. Connors, A. Albanil [et al.] // The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery. — 2000. — Vol. 119, N 2. — P.242–250.
 157. Asakawa T. Coloring conditions of thiobarbituric acid test for detecting lipid hydroperoxides /T. Asakawa, S. Matsushita //Lipids. —1980. — Vol.15, N3. —P.137–140.

158. Метод определения активности каталазы / М.А. Королук, Л.И. Иванова, И.Г. Майорова, В.Е. Токарев // Лабораторное дело. —1988. — № 1. —С.16–19.
159. Колб В.Г. Справочник по клинической химии/ В.Г. Колб, В.С. Камышников. —Минск : Беларусь,1982. —С.201–204.
160. Дубинина Е.Е. Активность и изоферментный спектр супероксидсмутаза эритроцитов и плазмы крови человека/ Е.Е. Дубинина, Л.А. Сальникова, Л.Ф. Ефимова // Лабораторное дело. — 1983. —N 10. —С.30–33.
161. Чевари С. Роль супероксиддисмутаза в окислительных процессах клетки, метод определения ее в биологических материалах/ С. Чевари, И. Чаба, П. Секей // Лабораторное дело. —1985. —N 11. — С.678–681.
162. Методи визначення активності неспецифічних протеїназ і їх інгібіторів у сироватці крові і біологічних рідинах (Методичні рекомендації) / Кубишкін А.В., Харченко В.З., Семенець П.Ф., Алиев Л.Л., Фомочкіна І.І.,Анисимова Л.В. - Київ2010-28с.
163. Боровиков В.П. STATISTICA – Статистический анализ и обработка данных в среде Windows / В.П. Боровиков, И.П. Боровиков. —2-е изд., стереотип. —М., 1998. — 608 с.
164. Гланц С. Медико-биологическая статистика /Пер. с англ. под ред. Н. Е. Бузикашвили и Д. В. Самойлова. — М.: Практика, 1999. —460 с.
165. Состояние протеиназ-ингибиторной системы печени и почек при моделировании реперфузионного синдрома, отягощенного воздействием ионизирующего излучения, на фоне сочетанного применения корвитина и контрикала / Л.Л. Алиев, В.З. Харченко, А.В. Кубышкин, Г.В. Сенкевич // Таврический медико-биологический вестник. — 2012. — Т. 15, № 3, ч. 1 (59). — С. 18-21.
166. Jiang Y.F. Effects of alprostadil and ulinastatin on inflammatory response and lung injury after cardiopulmonary bypass in pediatric patients

- with congenital heart diseases / Y.F. Jiang, W.W. Wang // *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. — 2008. — Vol. 88, N41. — P. 2893–2897.
167. Кижеева Е.С. Полиорганная недостаточность в интенсивной терапии / Е.С. Кижеева, И.О. Закс // *Вестник интенсивной терапии*. — 2004. — №1. — С. 12–24.
168. Оноприев В.И. Зависимость развития полиорганной дисфункции от функционального состояния организма при кровопотере и сепсисе / В.И. Оноприев, И.Б. Заболотских, В.В. Голубцов // *Вестник интенсивной терапии*. — 2005. — №5. — С. 214–221.
169. Krau S.D. Making sense of multiple organ dysfunction syndrome / S.D. Krau // *Crit. Care Nurs. Clin. North. Am.* — 2007. — Vol. 19, N 1. — P. 87–97.
170. Dewar D. Postinjury multiple organ failure / D. Dewar, F.A. Moore, E.E. Moore, Z. Balogh // *Injury*. — 2009. — Vol. 40, N9. — P. 912–918.
171. Свободнорадикальные процессы и воспаление (патогенетические, клинические и терапевтические аспекты) / Т.В. Сологуб, М.Г. Романцов, Н.П. Чеснокова [и др.].—М.: Академия естествознания, 2008. —143 с.
172. Incidence of individual organ dysfunction in fatal acute pancreatitis: analysis of 1024 death records / D.J. Mole, B. Olabi, V. Robinson [et al.] // *HPB (Oxford)*. — 2009. — Vol. 11, N2. — P.166–170.
173. Multi-center clinical study on the diagnostic criteria for multiple organ dysfunction syndrome with illness severity score system [Article in Chinese] / S.W. Zhang, C. Wang, C.H. Yin [et al.] // *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue*. — 2004. — Vol. 16, N 6. — P. 328–332.
174. Early progressive organ failure in patients with severe acute pancreatitis [Article in Russian] / I.V. Aleksandrova, M.E. Il'inskiĭ, S.I. Reĭ [et al.] // *Khirurgiia (Mosk)*. — 2013. — Vol. 9. — P. 29–33.
175. Coagulofibrinolytic changes in patients with disseminated intravascular coagulation associated with post-cardiac arrest syndrome--

- fibrinolytic shutdown and insufficient activation of fibrinolysis lead to organ dysfunction / T. Wada, S. Gando, A. Mizugaki [et al.] // *Thromb. Res.* — 2013. — Vol. 132, N1. — P. 64–69.
176. Müller A.L. Extracellular and intracellular proteases in cardiac dysfunction due to ischemia-reperfusion injury / A.L. Müller, L.V. Hryshko, N.S. Dhalla // *Int. J. Cardiol.* — 2013. — Vol. 164, N1. — P. 39–47.
177. Usefulness of a selective neutrophil elastase inhibitor, sivelestat, in acute lung injury patients with sepsis / S. Miyoshi, H. Hamada, R. Ito [et al.] // *Drug. Des. Devel. Ther.* — 2013. — Vol. 10, N7. — P. 305–316.
178. Proteasome inhibition prolongs survival during lethal hemorrhagic shock in rats / H.H. Bach 4th, H.M. Laporte, Y.M. Wong. [et al.] // *J. Trauma Acute Care Surg.* — 2013. — Vol. 74, N2. — P. 499–507.
179. Protease activity increases in plasma, peritoneal fluid, and vital organs after hemorrhagic shock in rats / A.E. Altshuler, A.H. Penn, J.A. Yang [et al.] // *PLoS One.* — 2012. — Vol. 7, N 3. — P. 1–11.
180. Activation of proteolytic enzymes and depression of the sarcolemmal Na⁺/K⁺-ATPase in ischemia-reperfused heart may be mediated through oxidative stress / R.B. Singh, L. Hryshko, D. Freed, N.S. Dhalla // *Can. J. Physiol. Pharmacol.* — 2012. — Vol. 90, N2. — P. 249–260.
181. Douvas S. Anti-Inflammatory and antimicrobial roles of secretory leukocyte protease inhibitor / S. Douvas, A. Kolokotronis, P. Stefanopoulos // *Infection and Immunity.* — 2005. — V. 73, №. 3. — P. 1271–1274.
182. Neutrophil elastase inhibitor improves survival rate after ischemia reperfusion injury caused by supravisceral aortic clamping in rats / N. Fujimura, H. Obara, K. Suda [et al.] // *J. Surg. Res.* — 2013. — Vol. 180, N1. — P. 31–36.
183. de Groot H. Injury to visceral organs by ischemia and reperfusion. Processes in pathogenetic networks / H. de Groot // *Zentralbl. Chir.* — 2005. — Vol. 130, N 3. — P. 202–212.

184. Keel M. Pathophysiology of polytrauma / M. Keel, O. Trentz // *Injury*. — 2005. — N 36. — P. 691–709.
185. Boya P. Lysosomal membrane permeabilization in cell death / P. Boya, G. Kroemer // *Oncogene*. — 2008. — Vol. 50, N27. — P. 6434–6451.
186. Ранние маркёры инфекционных осложнений у пострадавших с сочетанной травмой/ Н.В. Белобородова, А.К. Шабанов, Е.А. Черневская [и др.] // *Медицинский алфавит*. — 2013. — Т.4, № 26. — С. 33–37.
187. NOX2 protects against progressive lung injury and multiple organ dysfunction syndrome/L.C. Whitmore, K.L. Goss, E.A. Newell [et al.] // *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. — 2014. — Vol.307, N1. — P.71–82.
188. van Griensven M. Cytokines as biomarkers in polytraumatized patients /M. van Griensven // *Unfallchirurg*. — 2014. — №117. —P.699–702.
189. Зарубина И.В. Роль печеночно-почечной недостаточности при синдроме длительного раздавливания и основные принципы ее фармакологической коррекции / И.В. Зарубина, И.А. Юнусов // *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*. — 2009. —Т. 7, № 1. —С. 37–60.
190. Robertson C.M., Coopersmith C.M. The systemic inflammatory response syndrome // *Microbes Infect*. -2006.- Vol. 8, №5. -P. 1382-1389.
191. Comstedt P., Storgaard M., Lassen A. T. The Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) in acutely hospitalised medical patients: a cohort study // *Scandinavian Journal of Trauma, Resuscitation and Emergency Medicine*.- 2009.- Vol.17. -P. 67.
192. Balk R.A. Systemic inflammatory response syndrome (SIRS): Where did it come from and is it still relevant today? // *Virulence*.- 2014.- Vol. 5, №1.- P. 20-26.

193. Müller A.L., Hryshko L.V., Dhalla N.S. Extracellular and intracellular proteases in cardiac dysfunction due to ischemia-reperfusion injury // *Int. J. Cardiol.*- 2013.- Vol. 164, №1.- P. 39-47.
194. Lindemann S. Prostacyclin inhibits adhesion of polymorphonuclear leukocytes to human vascular endothelial cells due to adhesion molecule independent regulatory mechanisms / S. Lindemann, C. Gierer, H. Darius // *Basic Res Cardiol.* — 2003. — Vol.98, N1. — P. 8–15.
195. Aprotinin protects the cerebral microcirculation during cardiopulmonary bypass /N. Ishibashi, Y. Iwata, D. Zurakowski [et al.] // *Perfusion.* — 2009. — Vol. 24, N2. — P. 99–105.
196. Effects of the pure flavonoids epicatechin and quercetin on vascular function and cardiometabolic health: a randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover trial / J. I.Dower, J. M. Geleijnse, L. Gijsbers [et al.] // *Am. J. Clin. Nutr.* — 2015. — Vol. 101, N5. — P. 914–921.
197. Alprostadil attenuates inflammatory aspects and leucocytes adhesion on renal ischemia and reperfusion injury in rats /B. L. Soares, M.A. Freitas, E.F. Montero [et al.] // *Acta. Cir. Bras.* — 2014. — Vol. 29, N 2. — P. 55–60.