

УДК 616-005.4-06

В. А. Стежка

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ИШЕМИЧЕСКОГО ТОКСИНА, ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ОРГАНОВ СОБАК

Комплексное изучение острой ишемии, проводимое в последнее время, позволило подойти к рассмотрению этого состояния как патологического процесса и выявить некоторые его характерные черты. Так, одним из проявлений ишемии органа является образование в нем особого вещества, так называемого ишемического токсина [3].

Впервые ишемический токсин (ИТ) был выделен из длительно ишемизированной конечности собак [7, 9]. Химическая природа этого вещества достаточно точно не установлена. По мнению авторов способа выделения, ИТ — вазоактивное вещество, являющееся результатом массивного белкового распада в органах и тканях, вызванного длительной их ишемией и сопровождающих этот процесс гипоксией, нарушениями метаболизма и накоплением недоокисленных веществ. Ишемия является объединяющим этиологическим фактором для накопления ИТ независимо от вида ее моделирования. Особенности экспериментальной модели только в некоторой степени могут оказывать влияние на показатели удельной токсической активности получаемого препарата [5, 11].

Наиболее детально изучен ИТ, выделенный из длительно ишемизированной ампутированной конечности собак. Дана его гель-хроматографическая характеристика и изучено биологическое действие [1, 2, 6, 10]. Значительно менее изучен ИТ из ишемизированного сердца [4, 8, 14]. В литературе нет сообщений о возможности образования и выделения ИТ из ишемизированной печени.

Мы проводили сравнительное изучение препаратов ИТ, выделенных из ампутированной конечности, сердца и печени собак по их гель-хроматографической характеристике и биологическому действию.

Методика исследований

Для выделения ИТ использовались 12 беспородных взрослых собак обоего пола весом 15—20 кг. Ишемизацию органов, после их выделения под гексеналовым наркозом, осуществляли во влажной камере в течение 6—24 ч при комнатной температуре. Выделение ИТ проводили по [7]. Для накопления материала, из которого в дальнейшем проводилось выделение токсина, использовали лиофильное высушивание перфузатов ишемизированных органов, а в отдельных случаях и диализатов на установке КС-30 (ЧССР) в режиме сушки плазмы крови. Для гель-хроматографии использовались стеклянные колонки 2×100—120 см, заполненные сефадексом G-15. Все операции, связанные с выделением препаратов ИТ из перфузатов ишемизированных органов, проводились в холодильной комнате при 2—4 °С.

Биологическое действие получаемых препаратов изучали в биопробе на 1000 белых беспородных мышей и 20 кроликах. Токсичность препаратов выражали в мг белка после титрования на белых мышах внутривенным введением [7]. Концентрацию белка определяли микробиуретовым методом с реактивом Бенедикта [15]. Токсин вводили кроликам в краевую вену уха в дозе 3—10 ДЛМ с параллельной записью ЭКГ на одноканальном электрокардиографе. Скорость записи 50 мм/с, амплитуда калибровочного сигнала 1 мВ=20 мм, использовались игольчатые электроды.

Гель-хроматографические профили элюции перфузатов ишемизированных собак: 10 перфузатов печени. По характеру элюции во всех трех типах перфузатов соответствующая токсичность после титрования во всех перфузатах связана с элюцией пика, в котором объем элюции составляет 250—350 мл. В перфузатах 2×100 и 2×120 мл элюции ответственно. 100—200 мл (10 перфузатов) выходят более токсичными ко

Рис. 1. Гель-хроматографические профили элюции перфузатов ишемизированной конечности (А), конечности сердца (В) собак.

По вертикали — Доза, по горизонтали — объем элюции.

варьирующей титровкой. Второго пика и фракция концентратов не выделялась в объеме элюции. Несколько (объем элюции) токсичность, по-видимому, связана с удлинением времени элюции фракций.

Токсичность концентратов

Источник выделения препарата

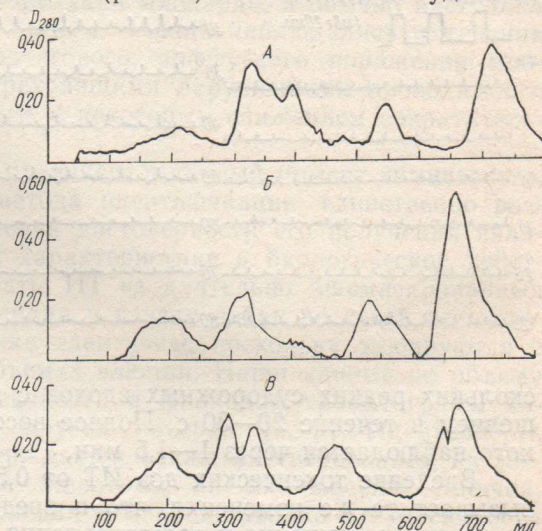
Конечность, препарат № 37
Сердце, препарат № 32
Печень, препарат № 36

Результаты исследований и их обсуждение

Гель-хроматографическая характеристика и токсичность полученных препаратов ишемического токсина. Нами изучены 43 характерные профили элюции концентрированных диализатов ишемизированных органов собак: 10 из ампутированной конечности, 20 из сердца и 13 из печени. По характеру расположения основных пиков они идентичны — во всех трех типах хроматограмм содержится 5 пиков, выходящих в соответствующих объемах элюции (рис. 1). Наибольшая удельная токсичность после концентрирования во всех хроматограммах связана со вторым пиком, выходящим в объеме элюции 200—300 мл или 250—350 мл на колонках 2×100 и 2×120 см, соответственно. В объеме 100—200 мл (150—250 мл) выходят более крупномолекулярные компоненты с

Рис. 1. Гель-хроматограммы концентрированных диализатов перфузатов ишемизированного сердца (А), конечности (Б) и печени (В) собак.

По вертикали — D_{280} , по горизонтали — объем элюции в мл.



варьирующей токсичностью, которая ниже, чем удельная токсичность второго пика и, возможно, объясняется его примесями. Нетоксическая фракция концентрированного диализата в наших опытах элюировалась в объеме 320—370 мл (350—450 мл). Далее с колонок выходит несколько (обычно две) токсичных для мышей фракций. Их токсичность, по-видимому, определяется примесями серотонина [7, 9], поскольку и в наших опытах токсичность этих фракций уменьшалась с удлинением времени ишемии органа. Данные по определению токсичности фракций некоторых хроматограмм представлены в таблице.

Токсичность концентрированных фракций (I, II, III) диализата после гель-хроматографии на сефадексе G-15

Источник выделения препарата	I			II			III		
	150—250 мл			250—350 мл			350—450 мл		
	Концентрация белка, мг/мл	Объем введения, мл	Удельная токсичность, мг	Концентрация белка, мг/мл	Объем введения, мл	Удельная токсичность, мг	Концентрация белка, мг/мл	Объем введения, мл	Удельная токсичность, мг
Конечность, препарат № 37	10,75	0,05	0,537	3,25	0,05	0,162	4,2	0,1	0,420
Сердце, препарат № 32	10,9	0,2	2,18	2,0	0,1	0,200	5,1	0,1	0,510
Печень, препарат № 36	9,68	0,25	2,42	1,60	0,1	0,160	1,15	0,4	0,460

Внутривенное введение наиболее токсичной фракции концентрированного диализата — фракции ИТ белым мышам выявляет общие закономерности поведения животных при введении им субтоксических и токсических доз. Субтоксические дозы сразу после введения вызывают судороги, судорожные редкие вдохи, обычно в положении животного на боку, и кратковременное (3—5 с) прекращение дыхания. В этот момент животное не реагирует на болевое раздражение — укол иглой. В дальнейшем наступает восстановление дыхания в виде не-

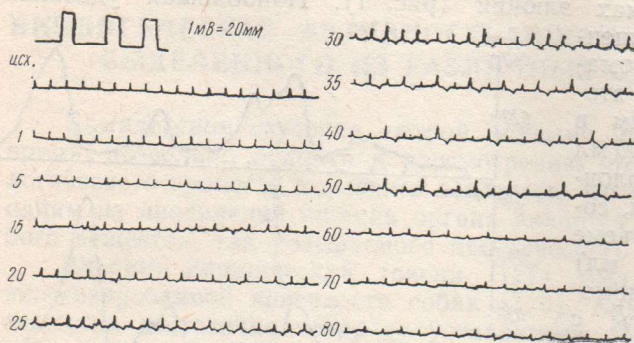


Рис. 2. ЭКГ кролика после внутривенного введения 1 мл (0,140 мг) препарата ишемического токсина, выделенного из ишемизированной печени собаки. I стандартное отведение.

скольких редких судорожных вдохов с постепенным значительным учащением в течение 20—30 с. Полное восстановление активности животного наблюдается через 1—1,5 мин.

Введение токсических доз ИТ от 0,5 до 1 ДЛМ в начальной фазе вызывает те же изменения, что и введение субтоксических, но после прекращения дыхания и восстановления его в виде судорожных вдохов отмечается повторное прекращение дыхания, фибриллярные подергивания мышц и, как правило, наступает смерть животного.

Инъекция сильнотоксических доз (>2 ДЛМ) сопровождается сразу после введения, а иногда и до окончания введения смертью животного без судорог и расстройств дыхания — мгновенно.

Введение мышам нетоксической фракции в наших опытах сопровождалось наблюдаемым визуальным учащением дыхания, в отдельных случаях отмечались единичные судороги. Летальный эффект вызывали только дозы, в три-четыре раза превышающие по содержанию белка токсическую дозу ИТ.

Удельная токсичность полученных препаратов токсина не была одинаковой. Так, препараты из ампутированной конечности были токсичными в пределах 0,060—0,260 мг, из сердца 0,190—0,370 мг, а из печени 0,020—0,370 мг при внутривенном введении белым мышам.

После введения мышам субтоксических доз ИТ в некоторых опытах проводилось наблюдение за ними в течение 60 дней. Все животные в этот период, как правило, выживают.

Действие полученных препаратов ИТ на интактный миокард кроликов. В проведенных нами опытах с внутривенным введением ИТ из различных органов кроликам наблюдались характерные изменения ЭКГ, которые варьировали от незначительных диффузных, по своему характеру напоминающих токсико-дистрофические, до явлений глубоких нарушений функции миокарда: снижение ниже изоэлектрической линии интервала S—T, появление отрицательного зубца T.

На рис. 2 представлена ЭКГ кролика после внутривенного введения 1 мл (0,140 мг) препарата ИТ, выделенного из ишемизированной печени собаки. Через 5 мин после введения появились отдельные ЭКГ

признаки субэпикардиальной функции миокарда, комплексов или Частота сердечных зубца T, признавая с 20 мин после вожелудочковых ным исчезновением рующее со временем смерть животного ЭКГ, характерна карда с кратковременным в сочетании, по ной функции миокарда.

Для ИТ, как биохимического возможными критериями являются гель-хроматография. Полученные ампутированной матографической колонок в соответствии с элюции и распределением согласуются с полученными результатами, показавшими, что независимо от введенной дозы выживаемость животных при субтоксических дозах ИТ на однократном введении не вызывает изменений, приводящих к увеличению токсичности, при равном уровне их индивидуальной токсичности.

Одним из вариантов ИТ является его влияние как рефлексного вмешательства в кровоток в сердце, на действие печени, на интраторактальных авторов, мышам [1] и внутривенных из конечностей при подключении собаки к ишемии [13] выделенного из печени довольно стойко данным отмечалось.

Установлено, что в патологии, связанной с системой взаимосвязи с сис

признаки субэндокардиальной гипоксии и снижения сократительной функции миокарда; на 15 мин — выпадение отдельных желудочковых комплексов или их деформация, левожелудочковые экстрасистолы. Частота сердечных сокращений уменьшилась, увеличивался вольтаж зубца Т, признаки субэндокардиальной гипоксии усиливались. Начиная с 20 мин после введения наблюдалось значительное учащение левожелудочковых экстрасистол, групповое их появление с постепенным исчезновением к 50 мин. В последующем наблюдалось прогрессирующее со временем снижение функции миокарда, и обычно наступала смерть животного. При более легком течении наблюдались изменения ЭКГ, характерные для мелкоочагового, диффузного поражения миокарда с кратковременными, преходящими нарушениями проводимости в сочетании, по всей вероятности, с некоторым снижением сократительной функции миокарда.

Для ИТ, как вещества, не имеющего в данный момент химического, биохимического или другого метода идентификации, единственно возможными критериями определения достоверности его получения являются гель-хроматографическая характеристика и биологическое действие. Полученные нами препараты ИТ из длительно ишемизированных ампутированной конечности, сердца и печени собак по своей гель-хроматографической характеристике идентичны, поскольку элюируются с колонок в соответствующих объемах элюции. Наши данные по объему элюции и распределению токсичности в фракциях хроматограмм хорошо согласуются с данными других авторов [7, 9]. Идентичность полученных препаратов подтверждается также их титрованием на мышцах, показавшем, что реакция животных на их введение типична, независимо от источника выделения и зависит только от токсичности введенной дозы — субтоксическая, токсическая или сильнотоксическая. Выживаемость животных в течение длительного времени после введения им субтоксических доз ИТ свидетельствует о том, что эти дозы при однократном внутривенном введении не вызывают в организме мышей изменений, приводящих к смерти в отдаленном периоде. Различную удельную токсичность препаратов, полученных из перечисленных органов, при равном времени ишемии, можно, вероятно, объяснить различной их индивидуальной устойчивостью к ишемии и нарушениям метаболических процессов.

Одним из важных компонентов в механизме поражающего действия ИТ является его воздействие на миокард [2]. Очевидно оно осуществляется как рефлекторным путем, так и за счет непосредственного вмешательства в метаболизм мышечных клеток [6], а также нарушения кровотока в сердечной мышце [10]. ЭКГ данные, зарегистрированные нами при действии препаратов ИТ, в том числе и из ишемизированной печени, на интактный миокард кроликов, согласуются с результатами других авторов, полученными при внутривенном введении белым мышам [1] и внутрикоронарном введении собакам препаратов, выделенных из конечности и сердца [14], а также при экстракорпоральном подключении собакам изолированных конечностей с различными сроками ишемии [13]. Это также свидетельствует об однотипности ИТ, выделенного из различных органов. Наблюдаемые нами изменения ЭКГ довольно стойко сохранялись. Постепенное приближение к исходным данным отмечалось только на 3—4 сут после введения препарата.

Установленная нами возможность образования ИТ в ишемизированной печени, по нашему убеждению, может иметь важное значение в патологии, поскольку печень находится в тесной функциональной взаимосвязи с системой кровообращения и является мощной рефлексо-

генной зоной. Поэтому, став интенсивным источником образования и выделения ИТ, печень может, по-видимому, существенно влиять на течение патологического процесса как за счет циркуляции токсина в крови, так и его рефлекторного действия. Это положение подтверждается тем, что у животных при экспериментальной ишемии печени в течение 60—90 мин развивается системная эндотоксемия, обычно приводящая к смертельному исходу [16].

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют об однотипности ИТ, выделенного из различных органов собак. Это подтверждается геле-хроматографической характеристикой препаратов, высокой токсичностью для белых мышей и выраженным однонаправленным действием на миокард кроликов. Кроме того, выделение ИТ из ишемизированной печени, наряду с выделением его из других органов, является дополнительным доказательством того, что его образование может трактоваться как общепатологическое явление, связанное с ишемией и качественно не связанное с источником его образования.

Литература

1. Долина С. А., Копелев М. Ф. Изучение ЭКГ белых мышей при введении ишемического токсина. — В кн.: Острая ишемия органов и меры борьбы с постишемическими расстройствами. М., 1973, с. 206—208.
2. Долина С. А., Мурашева О. Б., Михайлов Ю. К. Исследованию рефлекторного компонента в действии ишемического токсина. — В кн.: Острая ишемия органов и меры борьбы с постишемическими расстройствами. М., 1973, с. 208—209.
3. Кованов В. В., Оксман Т. М. Острая ишемия — биологический процесс. — В кн.: Острая ишемия органов и меры борьбы с постишемическими расстройствами. М., 1973, с. 3—5.
4. Кованов В. В., Селиванова Л. П., Шумейко С. Г. Некоторые показатели острой ишемии изолированного сердца. — В кн.: Острая ишемия органов и меры борьбы с постишемическими расстройствами. М., 1973, с. 47—48.
5. Кутин А. А., Далин М. В., Фиш Н. Г. Ишемические расстройства в конечности при жгутировании, длительном раздавливании и ампутации. — Вестник АМН СССР, 1975, № 7, с. 31—35.
6. Левандовский И. В., Ляхович В. В., Оксман Т. М. и др. К характеристике внутриклеточного действия ишемического токсина. — ДАН СССР, 1974, 219, № 4, с. 996.
7. Оксман Т. М., Далин М. В., Кованов В. В. Ишемический токсин. — ДАН СССР, 1971, 199, № 4, с. 980—985.
8. Оксман Т. М., Шумейко С. Г., Кованов В. В. и др. Некоторые вопросы острой ишемии сердца. — В кн.: Трансплантация органов и тканей. Ростов-на-Дону, 1976, с. 130—131.
9. Оксман Т. М. Острая ишемия в проблеме реплантации конечности: (экспериментальные исследования): Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — М., 1971. 32 с.
10. Оксман Т. М., Мурашева О. Б., Левандовский И. В. и др. К механизму нарушений периферического кровообращения в органах при острой ишемии. — Вестник АМН СССР, 1975, № 7, с. 20—27.
11. Оксман Т. М., Далин М. В., Фиш Н. Г. и др. Выделение ишемического токсина из конечности собак при разных видах острой ишемии. — В кн.: Острая ишемия органов и меры борьбы с постишемическими расстройствами. М., 1973, с. 225—226.
12. Циндадзе К. И., Ахаладзе М. П. Ишемия некоторых внутренних органов при острой окклюзии коронарных сосудов у собак. — В кн.: Острая ишемия органов и меры борьбы с постишемическими расстройствами. М., 1973, с. 186—188.
13. Шибанов Б. А. Гипоксия миокарда по данным ЭКГ при экстракорпоральном включении в кровяной ток изолированных конечностей с разными сроками ишемии. — В кн.: Острая ишемия органов и меры борьбы с постишемическими расстройствами. М., 1973, с. 192—194.
14. Шумейко С. Г., Кованов В. В., Козловская Н. Л. Ишемический токсин и некоторые нарушения деятельности сердца. — Вестник АМН СССР, 1975, № 7, с. 27—29.
15. Goa G. A micro biuret method for protein determination. Determination of total protein in cerebrospinal fluid. — Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1953, 5, N 3, p. 218—222.
16. Oclay I., Holper K. Reticuloendothelial function: Determinant for survival following hepatic ischemia in the baboon. — Surgery, 1974, 76, N 4, p. 643—650.

Центральная научно-исследовательская лаборатория Киевского института усовершенствования врачей

Поступила в редакцию
27. II 1979 г.

УДК 612.111+612.112

В. Т. А

ВЛИЯНИЕ НА

При определении горных овец и при горня, обнаруженных форм Г, из [13, 14] и сделан туре Г в сторону (ФГ) является о исследованиях би века и животных троциты и ФГ с эффектом пример

Учитывая уч сии, а также о с особенностях ФГ троциты при тяж щегося вторичной

С этой целью дили подопытным Содержание ФГ 79±1,5 % [3].

Опыты проведен рю моделировали по уровне 35—40 и 55—6 составляла 10 мин. В (рН, Р_{СО₂}, ВЕ) в про ренной мышце (Р_{О₂}) ОН-105), внутриаорта конце сонной артерии и пневмограмму. Дав способом на собранной литель УТ4-1, черниль датчики. По величине артериальное давление подсчетом пульсовых н нию АДП и САД расс тояние тонуса сосудов ее окончания, перед ин зию проводили внутр: вопотери. Трижды отм ли из пуповинной кров ляла собой взвесь фет серии опытов: в I — с эритроцитов из донорс