

О.О. Мойбенко, А.В. Кубишкін, В.З. Харченко, Н.Ю. Горохова, П.Ф. Семенець

Експериментальні підходи до профілактики та лікування синдрому гострого ушкодження легень з використанням інгібіторів протеїназ і корвітину

Результаты комплексного исследования процессов протеолиза в эксперименте на белых крысах на модели постгемической токсемии показали увеличение протеолитической активности и снижение антипротеиназного потенциала. Активация протеолиза и угнетение антипротеиназной активности наблюдается не только в крови, но и в бронхоальвеолярном секрете. Эти изменения сопровождаются морфологическими изменениями в легких. Полученные результаты показали высокую эффективность использования ингибитора протеиназ (контрикал) и антиоксиданта из группы флавоноидов (корвитин). Действие указанных препаратов снижало степень морфологических изменений в легких и предупреждало развитие дисбаланса в протеиназно-ингибиторной системе. Профилактический эффект был более значительным при комбинированном использовании обоих препаратов.

ВСТУП

Як відомо, розвиток синдрому гострого ушкодження легень (СГПЛ) і пневмонії є розповсюдженим ускладненням при тяжких патологічних станах [1,3,6]. Серед біохімічних систем, що потенційно відіграють значну роль у розвитку уражень бронхолегеневої системи різного генезу, варто виділити системи протеолізу та вільнорадикального окиснення ліпідів [8]. Порушення балансу в протеїназно-інгібіторній системі та стані вільнорадикальних процесів, особливо на регіонарному рівні, є важливим чинником розвитку патології легень [5,11].

Складні і не до кінця вивчені патогенетичні механізми розвитку СГПЛ спонукають учених до пошуку більш ефективних препаратів і лікувальних комплексів для його патогенетичної корекції. Крім полівалентних інгібіторів протеїназ, що знайшли широке застосування, ведеться пошук нових препаратів, котрі впли-

вають на різні ланки патогенезу ураження легень. Привертає увагу можливість використання препаратів на основі кверцетину, що є інгібітором ліпоксигеназного шляху метаболізму арахідонової кислоти й одночасно виявляє антиоксидантний ефект [4, 10]. Відомо про ефективність застосування кверцетину для лікування та профілактики деяких екстремальних патологічних станів [12, 13], але можливість його використання для профілактики та лікування СГПЛ ще не вивчалася.

МЕТОДИКА

Експериментальні дослідження проведено на білих щурах-самцях лінії Вістар. Постгемічну токсемію моделювали реваскуляризацією кінцівок після накладення гумових джгутів на обидві задні кінцівки тварин на рівні пахвинної складки на 6 год.

Біохімічні зміни в органах і тканинах визначали через 12 год після реваскуляризації кінцівок.

© О.О. Мойбенко, А.В. Кубишкін, В.З. Харченко, Н.Ю. Горохова, П.Ф. Семенець

Вивчення впливу лікарських препаратів проводили превентивним їх введенням за 30 хв до зняття джгутів у експериментальних тварин.

Контрольній групі тварин внутрішньоочеревинно вводили ізотонічний розчин NaCl з розрахунку 10 мл/кг. Контрикал розводили в 10 мл фізіологічного розчину з розрахунку 10000 АТРЕ/кг. Доза корвітину була 6 мг/кг. У разі комплексного застосування препаратів їх вводили послідовно внутрішньоочеревинно.

Кров брали з порожнин серця дослідних щурів, після чого виділяли сироватку для подальших досліджень. Бронхоальвеолярний змив одержували за допомогою п'ятикратного промивання легень фізіологічним розчином при 37° С та центрифугували при 8000 хв⁻¹. Надосадову рідину використовували для проведення біохімічних досліджень.

Трипсиноподібну активність (ТПА) сироватки крові та бронхоальвеолярного змиву щурів вимірювали спектрофотометричним методом, що ґрунтується на значенні швидкості відщеплення р-нітроаніліну (р-НА) від синтетичного субстрату бензоїл-д-аргінін-паранітроанілід-моноклориду (БАПНА) [2]. Вивчення еластазоподібної активності (ЕПА) сироватки крові та бронхоальвеолярного змиву про-

водили за гідролізом синтетичного субстрату N-t-ВОС-аланіл-р-нітрофенілового ефіру (БАНФЕ) ("Reanal", Угорщина) [7]. α -інгібітор протеїназ (α -ІП) у сироватці крові та антитриптичну активність (АТА) бронхоальвеолярного змиву щурів визначали на підставі модифікованого мікрометоду [9]. Для визначення кислото-стабільних інгібіторів у бронхоальвеолярному змиві проби попередньо обробляли для осадження кислотолабільних білків [7]. Білок у всіх зразках визначали за методом Лоурі.

Статистичний аналіз результатів проводили методами варіаційної статистики з використанням критерію t Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Як показали проведені дослідження, через 12 год після початку постішемичної токсемії в крові щурів відзначається розвиток дисбалансу в стані протеїназно-інгібіторної системи, що виявляється вірогідним збільшенням активності трипсино- та еластазоподібних протеїназ і зниженням активності α_1 -ІП (табл.1).

При застосуванні контрикалу і корвітину стабілізується активність трипсино- та еластазоподібних протеїназ у сироватці крові. Слід зазначити, що засто-

Таблиця 1. Зміни протеїназно-інгібіторної системи крові у разі розвитку турнікетного шоку через 12 год токсемії при лікуванні контрикалом і корвітином

Показники	Трипсиноподібна активність, нмоль/мл ¹ · хв ⁻¹	Еластазоподібна активність, нмоль/мл ¹ · хв ⁻¹	α_1 -інгібітор протеїназ, мкмоль/л
Здорові тварини (n=9)	5,2±0,26	2,23±0,05	51,7±2,11
Шок (n=7)	16,7±0,33*	3,04±0,06*	36,4±2,18*
Шок та контрикал (n=6)	7,2±0,24***	2,53±0,06***	47,3±2,04**
Шок та корвітин (n=7)	10,4±0,27***	3,00±0,04***	45,2±1,98***
Шок та контрикал і корвітин (n=7)	5,2±0,28**	2,11±0,03***	49,9±2,24**

Примітка. Тут і в табл. 2 *P<0,05 відносно групи здорових тварин, ** P <0,05 відносно групи тварин без корекції; n – кількість тварин.

сування лише контрикалу призводить до більш вираженого ефекту. Нормалізація активності трипсино- та еластазоподібних протеїназ відбувається ефективніше на 44 і 20 % відповідно, ніж при введенні лише корвітину.

Однак найкраще нормалізуються показники через 12 год постішемичної токсемії при поєднаному застосуванні контрикалу та корвітину. У цій групі тварин через 12 год після зняття джгутів усі показники протеолітичної та антипротеїназної активності знаходилися на рівні контрольних значень. Таким чином, у крові при розвитку турнікетного шоку досягалася практично повна нормалізація показників протеїназно-інгібіторної системи та вона практично цілком виключалася з патогенезу розвитку шоку.

Дослідження змін у бронхоальвеолярному змиві підтвердило загальні закономірності впливу випробуваних препаратів на стан показників протеїназно-інгібіторного балансу на рівні легень (табл.2). Через 12 год розвитку постішемичної токсемії в легенях відбувалися зміни, характерні для синдрому гострого пошкодження, що морфологічно виявляються міжальвеолярним набряком, вогнищами ателектазів і дистелектазів. При цьому в бронхоальвеолярному змиві більш ніж у 3 рази збільшувався вміст білка, вірогідно підвищувалася еластазоподібна активність та зни-

жувалася антитриптична активність та кислотостабільних інгібіторів протеїназ.

Застосування контрикалу та його комбінації з корвітином на тлі токсемії, призводило до практично повної нормалізації білкового складу бронхоальвеолярного змиву. Застосування лише корвітину практично не впливало на підвищення вмісту білка в бронхоальвеолярному змиві у разі шоку. Еластазоподібна активність в обидва терміни дослідження при застосуванні контрикалу та поєднаному використанні препаратів знижувалася в бронхоальвеолярному змиві до контрольних чи більш низьких значень. Менш істотне зниження відзначено при введенні корвітину, однак і його застосування практично нормалізувало досліджуваний показник. Через 12 год токсемії контрикал призводив до збільшення антитриптичної активності бронхоальвеолярного змиву на 31 %, корвітину – на 20 %, а поєднане застосування препаратів – на 23 %. Кислотостабільні інгібітори збільшувалися в середньому в 2 рази, сягаючи максимальних значень при поєднаному застосуванні препаратів.

Таким чином, використання інгібітора протеїназ контрикалу і корвітину призводило до нормалізації показників протеїназно-інгібіторної системи бронхоальвеолярного змиву. Ефект від застосування препаратів виявлявся у зменшенні протеолітичної активності бронхоальвеоляр-

Таблиця 2. Зміни протеїназно-інгібіторної системи бронхоальвеолярного змиву через 12 год токсемії

Показники	Білок, мг/мл	Еластазоподібна активність, нмоль/мл ⁻¹ · хв ⁻¹	Антитриптична активність, нмоль/мл ⁻¹ · хв ⁻¹	Кислото-стабільні інгібітори, мкмоль/л
Здорові тварини (n=9)	0,18±0,03	2,52±0,07	0,55±0,04	0,17±0,03
Шок (n=7)	0,69±0,06*	2,93±0,12*	0,35±0,03*	0,06±0,01*
Шок та контрикал (n=8)	0,19±0,04**	2,40±0,09*	0,46±0,04**	0,12±0,02**
Шок і корвітин (n=7)	0,64±0,05*	2,59±0,11**	0,42±0,02**	0,11±0,03
Шок і контрикал та корвітин (n=8)	0,19±0,03**	2,20±0,08*	0,43±0,03*	0,13±0,02**

ного змиву, збільшенні вільної антитриптичної активності та активності кислостостабільних інгібіторів протеїназ.

Отримані результати дозволяють зробити висновок, що препарати з антипротеїназним та антиоксидантним механізмом дії можуть бути ефективними протекторами пошкоджень, котрі розвиваються при шоккових та інших екстремальних станах. Ефект від дії препаратів виявляється як на системному, так і на рівні органів. Ізольоване застосування препаратів виявляється зниженням активації протеолітичних ферментів і підвищенням активності інгібіторів у крові і секретах. Було встановлено, що застосування контрикалу супроводжується більш вираженими змінами порівняно з корвітином, що зумовлюється прямими антипротеїназними ефектами контрикалу. Однак найбільш виражена позитивна динаміка показників протеїназно-інгібіторної системи як на системному, так і на рівні органів досягається при поєднаному використанні контрикалу і корвітину. Більш виражений ефект можна пояснити блокуванням різних ланок активації та вивільнення протеїназ при шоку. Корвітин має антиоксидантну активність та здатність блокувати утворення лейкотриєнів, що може призвести до зменшення вивільнення протеїназ, та сприяє зменшенню споживання інгібіторів і підвищенню ефективності замісної терапії інгібіторами протеїназ.

Отримані результати дозволяють припустити, що поєднане застосування інгібіторів протеїназ та антиоксидантів може бути більш ефективним засобом лікування екстремальних станів і профілактики бронхолегеневих ускладнень. Це дає змогу рекомендувати проведення подальших досліджень з вивчення клінічної ефективності комплексного застосування корвітину та інгібіторів протеїназ для запобігання формування СГПЛ при екстремальній патології.

A.A. Moybenko, A.V. Kubyshkin, V.Z. Kharchenko, N.Yu. Gorochova, P.F.Semenets

EXPERIMENTAL APPROACHES TO PROPHYLACTIC AND TREATMENT OF ACUTE LUNG INJURY BY PROTEINASE INHIBITORS AND CORVITIN

The results of a combined study of the proteolysis on a model of post-ischemic toxemia in rats showed a decrease in antiproteinase potential and an activation of proteolysis. The activation of proteolysis and inhibition of antiproteinases was observed not only in the blood, but also in the bronchoalveolar secretion. Those changes were accompanied with the changes in the morphological structure of the lungs. The data obtained have shown a high effectiveness of proteinase inhibitor (contrical) and an antioxidant of flavonoid group (corvettine). Those drugs decreased the morphological changes in the lungs and prevented the development of imbalance in proteinase-inhibitor system. The prophylactic effect was more considerable when both drugs were used in a combined way.

A.A. Bogomolets Institute of Physiology National Academy of Science of Ukraine, Kiev

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Багдатов В.Е., Гологорский В.А., Гельфанд Б.Р. Респираторный дистресс-синдром взрослых // *Вестн. интенсив. терапии.* – 1997. – № 3. – С.7 – 12.
2. Веремеенко К.Н. Ферменты протеолиза и их ингибиторы в медицинской практике. – К.: *Здоров'я*, 1971. – С.186 – 187.
3. Гембицкий Е.В., Коломиец Н.М. Респираторный дистресс-синдром взрослых при травматической болезни и некоторых других заболеваниях // *Клин. медицина.* – 1997. – № 6. – С.8 – 12.
4. Жукова А.В., Сагач В.Ф. Роль ейкозаноидов у розвитку постішемичної шоквої реакції // *Фізіол. журн.* – 1996. – № 1 – 2. – С.3 – 9.
5. Кубышкин А.В. Изменение баланса протеиназы-ингибиторы бронхоальвеолярного смыва при экспериментальном воспалении легких // *Пробл. туберкулеза.* – 1988. – № 1. – С.61 – 65.
6. Мустафин Д.Г., Мустафин В.Д., Закляков К.К. Респираторный дистресс-синдром у больных сепсисом // *Клин. медицина.* – 2000. – № 10. – С.50 – 53.
7. Оглоблина О.Г., Платонова Л.В., Мясникова Л.В. и др. Активность протеиназ гранулоцитов и уровень кислостостабільных ингибиторов протеиназ в бронхоальвеолярном секрете детей с бронхопатиями различной этиологии // *Вопр. мед. химии.* – 1980. – № 3. – С.387 – 392.
8. Осипов А.Н., Азимова О.А., Владимиров Ю.А. Активные формы кислорода и их роль в организме // *Успехи биол. химии.* – 1990. – 30. – С.180 – 208.

9. Русаков С.В., Кубышкин А.В. Микрометод определения в крови альфа-1-ингибитора протеиназ и альфа-2-макроглобулина // Клин. лабор. диагностика. – 1995. – № 1. – С.8 – 10.
10. Чердниченко Г.А., Мойбенко А.А., Бутович И.А., Огий С.А. Влияние 13 (5)-HDODE, липооксигеназного продукта линолевой кислоты на транспорт Na⁺, K⁺-АТФазы в сарколемме миокарда // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 1995. – № 9. – С.225 – 258.
11. Knight K.R., Burdon J.G., Cook L. et al. The proteinase-antiproteinase theory of emphysema: a speculative analysis of recent advances into the pathogenesis of emphysema // Respirology. – 1997. – № 2. – P.91 – 95.
12. Kudo M., Naito Z., Yokoyama M., Asano G. Effects of quercetin and sunphenon on responses of cancer cells to heat shock damage // Exp. Mol. Pathol. – 1999. – 66. – №1. – P.66 – 75.
13. Shoskes D.A. Effects of bioflavonoids quercetin and curcumin on ischemic renal injury: a new class of renoprotective agents // Transplantation. – 1998. – 66, № 2. – P.147 – 152.

*Ин-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ;
Крим. мед.ун-т ім.С.І.Георгієвського, Симферополь*

*Матеріал надійшов до
редакції 17.11.2002*