

С.В. Лемза, А.Г. Мондодоев, С.М. Николаев

МОДУЛЯЦИЯ ИНДУЦИРОВАННОГО АПОПТОЗА У БЕЛЫХ КРЫС РАСТИТЕЛЬНЫМ СРЕДСТВОМ «НЕФРОФИТ»

Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН (Улан-Удэ)

Цель настоящей работы — изучить влияние комплексного растительного средства «Нефрофит» на процессы индуцированного апоптоза на основе анализа активности каспазы-3, одного из ключевых ферментов, наилучшим образом коррелирующего с апоптотическим фенотипом при ишемических повреждениях почек белых крыс линии Wistar.

Опыты проводились на белых крысах обоего пола линии Wistar массой 180–200 г. Апоптоз индуцировали ишемией/реперфузией почек. Продолжительность реперфузии составляла 1, 4, 8 и 16 часов. Активность каспазы-3 определяли в гомогенате коркового слоя почек колориметрическим методом, согласно рекомендациям к набору реактивов (Caspase-3 Assay Kit, Sigma), в трех группах животных: в ложнооперированной, в группе с индуцированным апоптозом (контроль) и в группе животных на фоне введения «Нефрофита» (опыт). Водный раствор фитосредства вводили животным внутривенно в экспериментально-терапевтической дозе 150 мг/кг в объеме 10 мл/кг за 16 часов и за 1 час до ишемии. Комплексное растительное средство «Нефрофит» представляет собой смесь из экстрактов листьев толокнянки обыкновенной (*Arctostaphylos uva ursi L.*), листьев ортосифона тычиночного (*Orthosiphon stamineus Benth.*) и травы горца птичьего (*Polygonum aviculare L.*) в соотношении 4:4:2.

Результаты эксперимента представлены в таблице 1.

Таблица 1

Активность каспазы-3 при ишемических повреждениях почек в различных группах животных

Условия эксперимента	Активность каспазы-3 ммоль/мин./мг белка			
	1 час	4 часа	8 часов	1-6 часов
Ложнооперированная группа (n = 7)	2,40 ± 0,13			
Контрольная группа (n = 7)	7,19 ± 1,04	14,77 ± 1,18	36,60 ± 3,05	36,20 ± 2,46
Контрольная группа + Ac-DEVD-CHO (n = 7)	4,36 ± 0,34	5,030 ± 1,31	14,00 ± 1,56	19,60 ± 2,83
Опытная группа + «Нефрофит» (n = 7)	3,36 ± 0,23*	8,56 ± 1,75*	21,50 ± 1,0*	29,10 ± 2,21

Примечание: * – различия в группах контроль–опыт достоверны при $p < 0,05$.

Из таблицы видно, что активность каспазы-3 в контрольной группе животных с индуцированным апоптозом в почках увеличивалась по сравнению с группой интактных крыс в 3 раза после часовой реперфузии, в 7,3 раза — после 4-часовой и более чем в 15 раз — через 8 и 16 часов реперфузии. В опытной группе животных под влиянием «Нефрофита» происходило снижение активности каспазы-3, сравнимое с действием специфического ингибитора Ac-DEVD-CHO. Через 1 час реперфузии почек у крыс опытной группы активность фермента снижалась на 53 %, через 4 часа — на 42 %, через 8 часов — на 41 % и через 16 часов — на 20 %, по сравнению с данными в контроле.

Таким образом, установлено ингибирующее влияние комплексного растительного средства «Нефрофит» на активность каспазы-3. Снижение активности данного протеолитического фермента коррелировало с улучшением показателей функционального состояния почек.

Г.А. Ливанов, Б.В. Батоцыренов, С.И. Глушков, В.Н. Мирошниченко, А.Н. Лодягин

ПУТИ КОРРЕКЦИИ ГИПОКСИИ И ЕЕ ПОСЛЕДСТВИЙ У БОЛЬНЫХ ПРИ ТЯЖЕЛЫХ ФОРМАХ ОСТРЫХ ОТРАВЛЕНИЙ

Научно-исследовательский институт скорой помощи им. И.И. Джанелидзе (Санкт-Петербург)
 Федеральное государственное учреждение науки Институт токсикологии
 Федерального медико-биологического агентства России (Санкт-Петербург)
 Военно-медицинская академия (Санкт-Петербург)
 Городская клиническая больницы скорой помощи им. В.В. Ангапова (Улан-Удэ)

При острых отравлениях веществами нейротропного действия тяжелая токсическая энцефалопатия с нарушением центральной регуляции дыхания и поражением респираторного компонента

транспорта кислорода приводит к нарушениям доставки кислорода к тканям организма, что является пусковым звеном в развитии гипоксического состояния, и наиболее часто носит смешанный характер.

С целью выявления роли гипоксии и ее последствий проведено исследование с фармакологическим зондированием метаболическим антигипоксантом на основе сукцината цитофлавина в рамках ограниченного клинического испытания препарата с контролем плацебо у 30 больных крайне тяжелой степени с острыми отравлениями смесью нейротропных средств. При обработке полученных результатов больные были разделены на 2 группы: I группа, получавшая цитофлавин — 17 пациентов; II группа, не получавшая в программе интенсивной терапии цитофлавин — 13 человек.

При исследовании показателей транспорта кислорода были выявлены нарушения всех его звеньев, что, в конечном счете, проявлялось в развитии тканевой гипоксии, регистрируемой снижением артериовенозной разницы до 67,8 %, потреблении кислорода до 59,5 %, коэффициенте использования кислорода до 36,8 % и его утилизации до 76,1 % от показателей здоровых лиц, повышении уровня лактата в 5,5 раз и пирувата в 2,1 раз выше нормы. Использование цитофлавина к 3-м суткам позволяло снизить проявления тканевой гипоксии, что характеризовалось улучшением показателей, отражающих утилизацию кислорода тканями. Наблюдался рост артериовенозной разницы по кислороду до 84,7 % ($p < 0,05$), потребления кислорода до 80,7 % ($p < 0,05$), коэффициента использования до 58,8 % и утилизации кислорода до нормальных величин ($p < 0,05$), тогда как в группе без применения метаболических антигипоксантов отличий исследуемых показателей выявлено не было.

Параллельно с тканевой гипоксией развиваются процессы, связанные с энергодефицитом и нарушениями внутриклеточного гомеостаза. Одним из самых важных показателей активации процессов свободнорадикального окисления является определение малонового диальдегида (МДА).

Определение концентрации МДА в эритроцитах отравленных позволило выявить существенные различия в динамике изменений данного показателя у лиц, леченных с использованием цитофлавина и без его применения. В эритроцитах лиц I группы имелась выраженная тенденция к снижению концентрации продуктов ПОЛ к 3 суткам нахождения в стационаре — в среднем на 17,0 % ($p < 0,05$) по сравнению с показателями 1 суток (соответственно на 14,7 % у женщин и на 19,5 % у мужчин). В то время как у пациентов группы сравнения на 3 сутки отмечалось повышение концентрации продуктов пероксидации липидов в эритроцитах на 34,6 % (на 30,3 % у женщин и 31,5 % у мужчин) по сравнению с показателями 1 суток лечения. В результате применения цитофлавина уровень МДА в эритроцитах пациентов I группы к 3 суткам нахождения в стационаре становился ниже соответствующего показателя лиц II группы на 21,8 % ($p < 0,05$), не смотря на то, что в 1 сутки исследования он превышал показатели больных, лечившихся без применения цитофлавина на 33,0 % ($p < 0,05$). Данные изменения могут служить прямым доказательством того, что использование метаболических антигипоксантов в терапии отравлений нейротропными ядами приводит к снижению интенсивности протекания процессов ПОЛ.

Наиболее важным показателем оценки антиоксидантной защиты является концентрация восстановленного глутатиона (ВГ) в клетке. Несмотря на то, что полуобмен ВГ в эритроцитах характеризуется достаточно длительными временными параметрами, направление изменений содержания ВГ в эритроцитах и их динамика в условиях острых отравлений являются достаточно информативными.

Применение цитофлавина при лечении острых тяжелых интоксикаций нейротропными веществами позволяло предотвратить снижение содержания ВГ в эритроцитах пациентов, которое достигало максимума у отравленных, не получавших препарата, на 2 сутки нахождения в стационаре — на 23,6 % ($p < 0,05$) по сравнению с 1 сутками (на 33,7 % у женщин и 19,7 % у мужчин). Кроме того, на 3 сутки в эритроцитах больных I группы отмечалась тенденция к росту содержания ВГ по сравнению с 1 сутками исследования, что также не отмечалось в эритроцитах лиц II группы. Действительно, в эти сроки у пациентов I группы содержание ВГ превышало показатели 1 суток нахождения в стационаре на 10,0 %, тогда как в эритроцитах лиц II группы было ниже на 6,8 %. Соответственно при сравнении показателей пациентов I и II групп на 3 сутки концентрация ВГ в эритроцитах у первых была выше на 20,8 % (у женщин) и 23,6 % (у мужчин).

По-видимому, основной вклад в повышение содержания ВГ вносит включенный в состав препарата сукцинат. Учитывая, что сукцинат не может утилизироваться непосредственно эритроцитами, не обладающими собственной системой митохондрий, повышение уровня ВГ в этих клетках объясняется восстановлением кислородзависимого дыхания и накоплением НАДФЧН и макроэргических соединений, необходимых для синтеза ВГ в тканях печени, почек, головного мозга и его дальнейшим переносом в эритроциты.

Применение цитофлавина в комплексной терапии отравлений нейротоксическими агентами приводило к повышению активности глутатион-пероксидазы и каталазы в эритроцитах на 2 — 3 сутки или частично препятствовало снижению активности глутатион-S-трансферазы в эти сроки.

Действительно, активность глутатион-пероксидазы в эритроцитах пациентов I группы на 3 сутки повышалась ($p < 0,05$) по сравнению с показателем у этих больных на 1 сутки нахождения в стационаре.

ре на 28,9 % (у женщин соответственно на 27,2 % и у мужчин на 32,1 %), тогда как у пациентов II группы роста активности этого фермента не отмечалось. Соответственно, если исследование активности ГП в эритроцитах в 1 сутки не выявляло отличий между показателями лиц I и II групп, то на 3 сутки активность этого фермента в эритроцитах пациентов, получавших цитофлавин, превышала соответствующие показатели лиц II группы на 16,7 % ($p < 0,05$). Аналогичные данные выявило исследование активности каталазы.

У больных в ранние сроки отравления отмечено повышение факторов вторичной аутоагрессии, что подтверждает известное мнение, что острые тяжелые отравления сопровождаются развитием СЭИ уже с 1-х часов острого отравления.

На 3-и сутки в I группе отмечено снижение молекул средней массы во всех исследуемых средах отличие от исходного состояния и группы сравнения. В группе II содержание маркеров токсемии на 3-и сутки продолжало оставаться высоким без отличий от исходного состояния, что подтверждает, что эндотоксемия при острых отравлениях является следствием гипоксических повреждений, а не прямого токсического действия яда, так как к этому времени концентрация ксенобиотика в средах организма либо резко снижалась, либо отсутствовала.

Полученные данные согласовались с улучшением течения острых отравлений. В группе с применением цитофлавина сокращалась длительность коматозного состояния, сроки нахождения больных в критическом состоянии и в стационаре.

Однако, анализ группы умерших больных, в интенсивную терапию которых был включен цитофлавин, позволяет сделать вывод о неэффективности данного метода в условиях резко сниженной доставки кислорода к тканям, которая у умерших больных была обусловлена выраженной неэффективностью кислородотранспортных систем даже на фоне проводимой ИВЛ с подачей 100 % кислорода и кардиотонической поддержкой. В связи с этим, в условиях неэффективности кислородотранспортных систем методами традиционной интенсивной терапии решено проведение сочетанного использования метаболического антигипоксанта содержащего сукцинат-цитофлавина и препарата с кислородотранспортной функцией перфторана.

Группу исследования сочетанного применения перфторана и препаратов на основе сукцината составили наиболее тяжелые больные, тяжесть состояния которых уже с момента поступления была обусловлена токсическими и гипоксическими повреждениями головного мозга, осложненными развитием отека-набухания головного мозга, наличием осложнений со стороны дыхательной и сердечно-сосудистой систем с момента поступления и длительностью пребывания в гипоксическом состоянии, составившей в группе исследования $26,5 \pm 4,2$ часа, в группе сравнения — $23,9 \pm 5,2$ часа. Все отравления во II группе завершились летальным исходом. В I группе из 24 пациентов умерло 2 больных.

Наиболее отчетливые достоверные изменения были отмечены уже через 1 час после инфузии перфторана и цитофлавина с дальнейшей стабилизацией и нормализацией к 3-м суткам. Повышение парциального напряжения кислорода в артериальной крови с $64,2 \pm 6,3$ до $78,7 \pm 5,7$ мм рт.ст. и улучшение перфузии тканей благодаря свойствам перфторана являлось ведущим фактором увеличения доставки кислорода к тканям, которое на фоне улучшения процессов утилизации кислорода (рост потребления кислорода с $81,3 \pm 5,8$ мл \times м⁻¹ до $115,5 \pm 6,4$ мл \times м⁻¹) на фоне действия цитофлавина позволяло максимално быстро и эффективно скорректировать явления гипоксии на уровне тканей. Стабилизация эффектов действия сочетанного использования перфторана и цитофлавина в дальнейшем достигалась путем включения последнего в интенсивную терапию, что позволяло снизить явления энергодефицита и дать организму время для переживания критического состояния.

После инфузии перфторана и цитофлавина отмечено повышение потребления кислорода, артериовенозной разницы по кислороду, коэффициентов использования и утилизации кислорода, снижение уровня лактата и пирувата, что свидетельствовало об уменьшении проявлений тканевой гипоксии и потенцировании эффектов исследуемых препаратов на явления энергодефицитного состояния. На 2-е сутки в I группе отмечали снижение уровня лактата с $4,3 \pm 0,77$ ммоль/л до $2,84 \pm 0,57$ ммоль/л, тогда как во II группе уровень лактата $3,95 \pm 0,47$ ммоль/л имел тенденцию к дальнейшему росту и составил $4,52 \pm 0,68$ ммоль/л, что свидетельствовало о прогрессировании метаболических нарушений у больных II группы. На 3-и сутки в I группе продолжала сохраняться тенденция к снижению уровня лактата, и значения составили $2,2 \pm 0,47$ ммоль/л (показатели здоровых доноров — $1,18 \pm 0,25$,) тогда как во II группе сохранялся повышенный уровень лактата и составил $4,12 \pm 0,45$ ммоль/л.

Таким образом, сочетанное использование корректоров доставки кислорода и средств, способствующих восстановлению функции дыхательной цепи, позволяет максимально сократить период гипоксического восстановления функции клетки и снизить явления гипоксии тканей, что в большей степени сказывается на дальнейшем течении и исходе критических состояний при острых отравлениях.