Секция «Актуальные вопросы фармакологии в фармакотерапии», научный руководитель – Ермоленко Т.И.

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ СИНТЕТИЧЕСКОГО ИНГИБИТОРА МАТРИЧНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ ДОКСИЦИКЛИНА НА ОКИСЛИТЕЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ТЕРМИЧЕСКИХ ОЖОГОВ У КРЫС В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Александрова А.В.

Харьковский национальный медицинский университет, Харьков, Украина, aleksandrova-18a@mail.ru

В статье изучено влияние синтетического ингибитора матричных металлопротеиназ доксициклина на состояние процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в крови и очаге термического повреждения у крыс в эксперименте по показателям первичных (диеновых коньюгатов, ДК) и вторичных (тиобарбитуровой кислоты активных продуктов, ТБК-АП) продуктов пероксидации. Показано, что термический ожог без лечения, у экспериментальных крыс, сопровождается повышением уровня ДК и ТБК-АП на протяжении всего периода исследований. Применение референтных препаратов тиотриазолина и метилурацила приводит к снижению этих показателей к концу эксперимента (на 28-ые сутки). Доксициклин (особенно в дозе 30 мг/кг) превосходит действие препаратов сравнения по способности нормализовать процессы ПОЛ как в крови, так и в очаге термического повреждения.

Ключевые слова: синтетический ингибитор матричных металлопротеиназ, доксициклин, перекисное окисление липидов

Процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) участвуют в патогенезе различных патологических состояний [6]. В настоящее время известна значительная роль свободнорадикальных реакций (СРР) перекисного окисления липидов в фундаментальной молекулярной основе различных патологических процессов, в том числе и раневого процесса [7]. Гидроксильные радикалы ОН- в условиях снижения активности системы антиоксидантной защиты запускают вторичные СРР пероксидации липидов мембран клеток не только в зоне раневого дефекта, но и в клетках перифокальной зоны. В результате наблюдается задержка развития последующих за воспалением фаз раневого процесса. Установлено, что ожоговая травма также сопровождается активацией ПОЛ [3]. Увеличение концентрации продуктов ПОЛ над стационарным уровнем рассматривается как универсальный механизм повреждения клетки при ожогах, лучевой болезни и т.д. [4]. Как следствие избыточной окислительной активности при ожоговой ране происходит активация, в том числе, и процессов распада белков. Известно также, что доксициклин является ингибитором матричных металлопротеиназ. Мы предположили возможный эффект доксициклина на процессы заживления ожоговой раны, что подтвердилось визуальными и морфологическими наблюдениями [1]. Поэтому целью нашего исследования механизмов действия доксициклина явилось изучение его влияния на процессы ПОЛ при ожоговой ране.

Материалы и методы: Исследование по моделированию ожогов выполнены на 144 крысах популяции WAG массой 200–250 г. На выстриженном участке задней части бедра под тиопенталовым наркозом вызывали термический ожог (Кривошапка А.В., Звягинцева Т.В., 2010). Все процедуры с животными проводили согласно закону Украины (№ 3447-IV от 21. 02. 2006), методических рекомендаций об использовании животных в биохимических исследованиях (Стефанов О.В., 2002), требований "Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей" (Страсбург, 18.03.1986 г.), Уставом Украинской ассоциации по биоэтике ХНМУ и нормами GLP (1992 г.), типовых положений по вопросам этики МОЗ Украины № 66 от 13.02.03 г. (протокол заседания комиссии по биоэтике № 6 от 05. 06. 2013 г.).

Животные были разделены на 6 групп по 24 особи в каждой группе. Первая группа – интактные животные, вторая (контрольная) – крысы с термическим ожогом без лечения, крысам третьей группы вводили метилурацил в дозе 0,126 мг/кг (препарат сравнения), четвертой группы – тиотриазолин в дозе 30 мг/кг (препарат сравнения), пятой и шестой группы – синтетический ингибитор матричных металлопротеиназ – доксициклин в дозах 2,5 мг/кг и 30 мг/кг соответственно. Препараты вводили внутрижелудочно в крахмальной взвеси сразу после термического воздействия и ежедневно в течение всего периода эксперимента (28 суток). Наблюдения за процессами заживления ожоговых ран проводили на 7, 14, 21 и 28-е сутки (по шесть крыс в каждой серии). Состояние ПОЛ в крови и очаге термического повреждения оценивали по содержанию диеновых конъюгатов (ДК) согласно методу И.Д. Стальной в модификации В.И.Скорнякова с соавт. [5] и содержанию ТБК – активных продуктов (ТБК-АП) по методу Uchiyma M., Michara M. в модификации Волчегорского И.А. и соавт. по тесту с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) [2].

Результаты и обсуждение: Уровень диеновых конъюгатов (ДК) в сыворотке крови у интактных животных составил 19,31±1,02 ммоль/л (рис. 1).

Исследование уровня ДК в сыворотке крови животных с термическим ожогом без лечения, показало его повышение в течение всего времени исследования по сравнению с интактными животными. Так, на 7-е сутки уровень ДК увеличивался на 69,0 %, на 14-е – 28-е сутки в среднем на 36,0 %.

Доксициклин в обеих дозах однонаправленно влиял на уровень ДК в крови: достоверно не изменял его в первые три недели наблюдения в сравнении с контролем, однако к 28-м суткам происходило резкое снижение первичных продуктов ПОЛ. Только под влиянием доксициклина на 28-е сутки после термического повреждения уровень ДК в крови оказывался достоверно ниже, чем в группе без лечения (на 25,0 %).

Применение тиотриазолина приводило к снижению уровня ДК в первую неделю по сравнению с контролем (на 16,0 %). На 14-е – 21-е сутки концентрация первичных продуктов ПОЛ находилась на уровне контроля, на 28-е сутки – достоверно не отличалась от интактных животных. Под воздействием метилурацила достоверного снижения концентрации ДК в крови по сравнению с группой без лечения не происходило. Лишь на 28-е сутки уровень ДК снижался, достигая уровня интактных крыс.

Содержание ДК в очаге термического повреждения, так же, как и в сыворотке крови, было повышено на протяжении всего периода эксперимента (в среднем на 62,0 %).

Доксициклин в дозе 2,5 мг/кг и 30 мг/кг в первые три недели уступал препаратам сравнения в способно-

сти уменьшать содержание первичных продуктов ПОЛ в очаге. Однако, к 28-м суткам концентрация продуктов ПОЛ резко снижалась по сравнению с 21-ми сутками и не отличалась от физиологических значений (рис. 2).

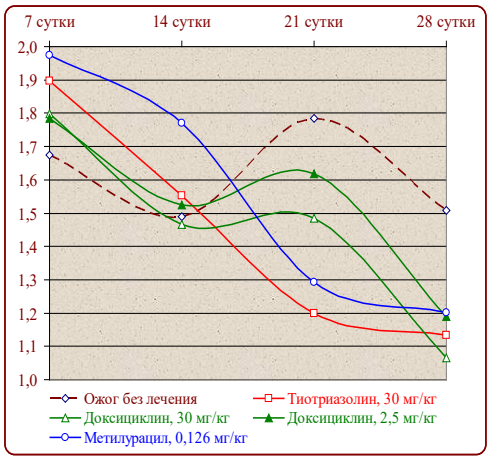

Рис. 1. Влияние доксициклина на уровень ДК в крови у крыс (за единицу приняты ДК интактных крыс)

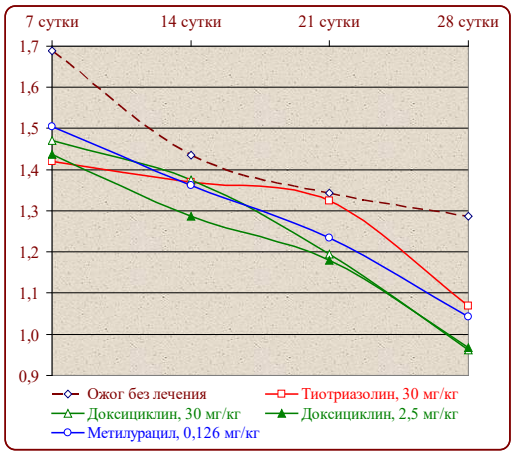

Рис. 2. Влияние доксициклина на содержание ДК в очаге у крыс (за единицу приняты ДК интактных крыс)

Под воздействием тиотриазолина содержание ДК в очаге начинало снижаться с 21-х суток (на 33,0 % ниже, чем в группе контроля). На 28-е сутки ДК очага достоверно не отличался от аналогичного показателя интактных животных. Эксперименты показали, что метилурацил снижал уровень ДК только с третьей недели эксперимента. В это время содержание ДК снижалось в сравнении с контролем на 28,0 %, на 28-е сутки – на 20,0 %, не отличаясь от нормы.

Уровень ТБК-активных продуктов (ТБК-АП) в сыворотке крови животных, не получавших лечение, был повышен на протяжении всего периода эксперимента (7-е сутки – на 63,0 %, 14-е сутки – на 42,0 %, 21-е сутки – на 20,0 %, 28-е сутки – на 12,0 %).

Доксициклин в дозе 2,5 мг/кг способствовал достоверному снижению уровня ТБК-АП к 28-м суткам (на 19,0 %), то есть проявлял эффект на уровне метилурацила (рис. 3). Наиболее интенсивно уровень ТБК-АП снижался под воздействием доксициклина в дозе 30 мг/кг. Это подтверждалось тем, что начиная со 2-й недели и до конца эксперимента, он не отличался от аналогичного показателя интактных животных, при этом оставался ниже уровня ТБК-АП контрольной группы на протяжении всего периода наблюдений.

Под воздействием тиотриазолина уровень ТБК-АП снижался, начиная с 21-х суток. В этот срок, а также на 28-е сутки концентрация ТБК-АП не отличалась от значений интактных крыс. Метилурацил приводил к нормализации вторичных продуктов ПОЛ только к 28-м суткам, при этом их уровень был достоверно ниже контрольной группы в 1,2 раза.

Таким образом, доксициклин в дозе 30 мг/кг наиболее эффективно снижал уровень ТБК-АП периферической крови.

Исследование содержание ТБК-АП в очаге термического повреждения так же, как и в сыворотке крови, показало его увеличение на протяжении всего периода эксперимента (в сравнении с интактными животными), с максимальными значениями в первые две недели (7-е сутки – в 2,3 раза, 14-е сутки – в 2 раза).

Под воздействием доксициклина в дозе 2,5 мг/кг процесс снижения содержания ТБК-АП в очаге происходил интенсивнее, чем в группах с применением референтных препаратов, о чем свидетельствует концентрация вторичных продуктов ПОЛ: на третьей неделе эксперимента ТБК-АП на 17,0 % в сравнении с тиотриазолином и на 9,0 % – в сравнении метилурацилом. Вместе с тем, в сравнении с животными контрольной группы было выявлено различие на 21-е и 28-е сутки исследований (на 24,0 % и 26,0 % соответственно) (рис. 4).

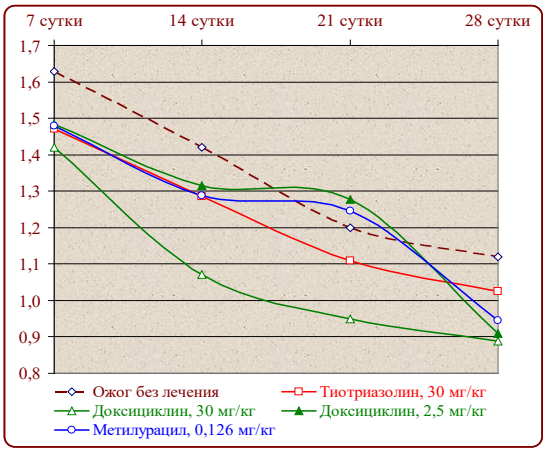

Рис. 3. Влияние доксициклина на уровень ТБК-АП в крови у крыс (за единицу приняты ТБК-АП интактных крыс)

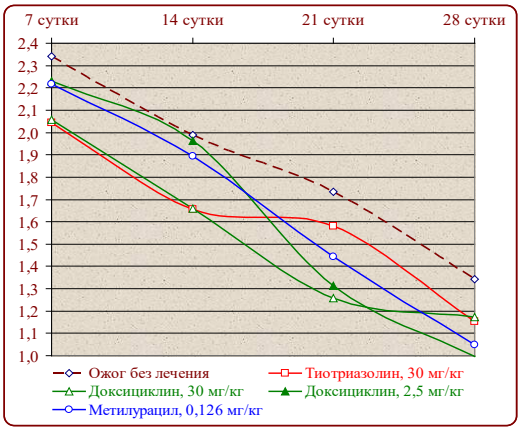

Рис. 4. Влияние доксициклина на содержание ТБК-АП в очаге у крыс (за единицу приняты ТБК-АП интактных крыс)

Наиболее интенсивно снижение вторичных продуктов ПОЛ происходило в группе с применением доксициклина в дозе 30 мг/кг. Следует отметить, что уже с 14-х суток содержание ТБК-АП достоверно ниже аналогичного показателя контрольной группы на 17,0 %, а группы с применением метилурацила – на 13,0 %. При этом, на третьей неделе наблюдений было зарегистрировано его снижение в сравнении с тиотриазолином на 20,0 %.

Под воздействием тиотриазолина содержание ТБК-АП в очаге снижалось до нормы к 28-м суткам наблюдений, при этом первые три недели оно было достоверно ниже, чем в контрольной группе. Метилурацил также нормализовывал этот показатель в очаге к концу эксперимента, при этом на 21-е и 28-е сутки содержание ТБК-АП снижалось в сравнении с контролем (на 17,0 % и 22,0 %, соответственно).

Выводы

1. Термический ожог без лечения, у экспериментальных крыс, сопровождается повышением первичных и вторичных продуктов перекисного окисления липидов в крови и в очаге повреждения.

2. Применение тиотриазолина и метилурацила приводит к нормализации ДК и ТБК-активных продуктов к концу эксперимента (на 28 сутки).

3. Синтетический ингибитор матричных металлопротеиназ доксициклин (особенно в дозе 30 мг/кг) превосходит действие референтных препаратов тиотриазолина и метилурацила по способности нормализовать процессы ПОЛ как в крови, так и в очаге термического повреждения.

Список литературы

1. Александрова А.В. Заживление ожоговой раны при лечении синтетическим ингибитором матричных металлопротеиназ доксициклином / А.В. Александрова // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований, 2012. №1. С. 61–62.

2. Карпищенко А.И. / Медицинская лабораторная диагностика (программы и алгоритмы) [Под ред. А. И. Карпищенко] // Санкт-Петербург "Интермедика". 1997. С. 48–52.

3. Лаврухин Ю.Н. Методы лечения остаточных ран у обожжённых / Ю.Н. Лаврухин, Е.В. Чеглаков, В.В. Арефьев // Вестник неотл. и восст. мед. 2005. Т. 6, № 2. С. 386–387.

4. Метелица Д.И. Внутримолекулярный синергизм ингибирующего действия полидисульфидных антиоксидантов в системе ферритин H2O2 – тетраметилбензидин / Д.И. Метелица, Г. С. Арапова, А. Н. Еремин, [и др.] // Наука. Биохимия. 1999. Т. 64, № 10. С. 1420-1431.

5. Скорняков В. Й. Продукты перекисного окисления липидов в спинномозговой жидкости у больных с черепномозговой травмой / В.И. Скорняков, Л.А. Кожемякин, В. В. Смирнов // Лаб. дело. 1988, № 8. С.14–16.

6. Increased markers of oxidative stress in plazma of patients with chronic pancreatitis / M. Podborska, A. Sevcikova, J. Trina [et al.] // Czech Republic. Neuro Endocrinol. Lett. 2009. Vol. 30. P. 116–120.

7. Oxidative stress and anti-oxidative mobilization in burn injury / A. Parihar, M.S. Parihar, S. Milner [et al.] // Burns. 2008. Vol. 34, № 1. P. 6–17.

БИОХИМИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ПЕЧЕНИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ ПОСЛЕ ДЛИТЕЛЬНОГО ПРИЁМА СИМВАСТАТИНА

Буханцов В.В., Кочетков Л.В., Смирнова В.А.

Ростовский государственный медицинский университет, Ростов-на-Дону, Россия, kronos.94@mail.ru

Исследования последних лет убедительно доказывают высокую эффективность статинов в снижении уровня холестерина [1]. Однако с приёмом статинов ассоциируется ряд побочных эффектов, один из которых связан с поражением печени, повышением активности трансаминаз и уровня общего билирубина в сыворотке крови. Согласно данным литературы после отмены препарата показатели, как правило, возвращаются к исходным значениям [2].

Печень является основным органом-мишенью действия статинов и осуществляет метаболизм этих препаратов, поэтому представляется целесообразным определить характер изменения обменных процессов в гепатоцитах после длительного приёма статинов.

В связи с этим, целью работы явился анализ метаболических изменений в клетках печени экспериментальных животных после длительного приёма симвастатина.

Исследование проводилось на 40 беспородных крысах-самцах в возрасте 12-14 месяцев. Животные содержались в стандартных клетках в условиях 12-часового режима освещения и свободного доступа к воде. В процессе эксперимента животные были разделены на две группы: 1-я группа (контрольная) – 20 интактных животных; 2-я группа (экспериментальная) – 20 животных, получавших в течение 3-х месяцев симвастатин (Zocor, 20 мг) по 1,5 мг один раз в сутки. По истечении срока эксперимента животных забивали декапитацией.

Гомогенат печени готовили в соотношении 1г ткани:9мл охлаждённого физиологического раствора, центрифугировали при 6000 об/мин. Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (гл-6-фДГ) определяли путём регистрации повышения уровня НАДФН+Н+, образующегося при окислении глюкозо-6-фосфата. Активность глутаонредуктазы (ГР) определяли по скорости окисления НАДФН+Н. Активность глутатионпероксидазы (ГПО) определяли по изменению содержания восстановленного глутатиона в пробах до и после инкубации с модельным субстратом. Концентрацию пировиноградной (ПВК) кислоты определяли по реакции с 2,4-динитрофенилгидрозином. Концентрацию лактата определяли по реакции с пара-оксидифенилом.

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили согласно общепринятым методам с определением средней арифметической, ошибки средней с использованием программы STATISTICA версия 6.0. О достоверности отличий учитываемых показателей сравниваемых групп судили по величине t-критерия Стьюдента после проверки распределения на нормальность. Статистически достоверными считали отличия, соответствующие оценке ошибки вероятности $p \leq 0,05$.

Установлено, что в гепатоцитах животных экспериментальной группы достоверно повышено содержание ПВК на 227,77% ($p<0,001$) и лактата на 238% ($p<0,001$) по сравнению с контрольной группой, что свидетельствует о формировании тканевой гипоксии (таб. 1). Накопление недоокисленных продуктов гликолиза способствует формированию ацидоза, что приводит к снижению активности ферментов и нарушению биоэнергетических процессов.

В гепатоцитах животных экспериментальной группы выявлено статистически значимое снижение активности гл-6-фДГ на 35,71% ($p<0,001$) по сравнению с контрольной группы. В клетках печени активность этого фермента имеет ключевое значение, так как обеспечивает восстановление кофермента НАДФ+, необходимого для детоксикации ксенобиотиков, биосинтеза жирных кислот и холестерина и регенерации окисленного глутатиона.

Параллельно в гепатоцитах животных экспериментальной группы выявлено снижение активности ГПО на 40,56% ($p<0,001$) и ГР на 91,14% ($p<0,001$) относительно животных контрольной группы. Одной из причин снижения активности ГПО может быть ацидоз. С другой стороны, для обеспечения ферментативной активности ГПО необходим GSH, регенерацию которого обеспечивает ГР. Снижение активности ГР может быть обусловлено дефицитом НАДФН+Н+, возникающем на фоне сниженной активности гл-6-фДГ.

Таким образом, выявленное нами накопление недоокисленных продуктов гликолиза в гепатоцитах свидетельствует о наличии тканевой гипоксии. В