

УДК 616-092.9+616-001.36:614.876:616-08:615:59.082

© Л.Л. Алиев, В.З. Харченко, А.В. Кубышкин, 2012.

## НАРУШЕНИЯ ОКИСЛИТЕЛЬНО-АНТИОКСИДАНТНОГО ГОМЕОСТАЗА В ПАТОГЕНЕЗЕ РЕПЕРФУЗИОННОГО СИНДРОМА, ОТЯГОЩЕННОГО ВОЗДЕЙСТВИЕМ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ

**Л.Л. Алиев, В.З. Харченко, А.В. Кубышкин***Государственное учреждение «Крымский государственный медицинский университет им. С. И. Георгиевского», г. Симферополь.*

### DISTURBANCE OF PROOXIDANT-ANTIOXIDANT BALANCE IN PATHOGENESIS OF REPERFUSION SYNDROM, COMBINED WITH THE INFLUENCE OF IONIZING RADIATION

L.L. Aliev, V.Z. Kharchenko, A.V. Kubyshkin

#### SUMMARY

Experimental researches of reperfusion syndrom, combined with the influence of ionizing radiation, were carried out on white rats of a «Wistar»line, weight 180-200, revealed increase of intensity of lipid peroxidation on a background of decrease of activity of antioxidants. It is considered to be an important part of pathogenesis of the combined radiation injuries.

### ПОРУШЕННЯ ОКИСЛЮВАЛЬНО-АНТИОКСИДАНТНОГО ГОМЕОСТАЗУ В ПАТОГЕНЕЗІ РЕПЕРФУЗІЙНОГО СИНДРОМУ, ОБТЯЖЕНОГО ВПЛИВОМ ІОНІЗУЮЧОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ

Л.Л. Алієв, В.З. Харченко, А.В. Кубишкін

#### РЕЗЮМЕ

В ході експериментальних досліджень, присвячених вивченню синдрому взаємного обтяження при комбінації реперфузійного синдрому та впливу іонізуючого випромінювання, проведених на білих щурах-самцях лінії «Vistar», масою 180 – 200 грамів, було виявлено підвищення активності процесів перекисного окиснення ліпідів, а також зниження активності антиоксидантів. Вказані порушення мали більш виразний характер при комбінованому впливі реперфузійного та променевого компонентів, що слід розглядати як важливу ланку патогенезу комбінованих радіаційних уражень.

**Ключевые слова:** перекисное окисление липидов, антиоксиданты, реперфузионный синдром, ионизирующее излучение.

Широкое распространение источников радиационной опасности и повышение частоты техногенных катастроф на атомных объектах обуславливают повышенный интерес исследователей к проблемам экстремальных состояний, среди которых наименее изученным направлением остается патогенез комбинированных радиационных поражений (КРП). Возникновение чрезвычайных ситуаций на атомных объектах, сопровождающихся разрушением зданий, может приводить к развитию реперфузионного синдрома после извлечения пострадавших из-под завалов, одновременно они могут быть подвергнуты воздействию ионизирующей радиации. В результате исследований, основанных на экспериментально-биологическом моделировании комбинированных радиационных поражений, сформировалось научное понятие о «синдроме взаимного обтяжения» – комплексе признаков, свидетельствующих о более тяжелом течении радиационного и нелучевого компонентов КРП [1, 2]. При этом, одним из ведущих патогенетических механизмов как реперфузионного синдрома, так и радиационных поражений является интенсификация процессов свободнорадикального окисления.

Активация процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в патогенезе радиационных поражений обусловлена ионизацией и радиолизом воды [3, 4]. Кроме того, усиление свободнорадикальных процессов является одним из важнейших звеньев патогенеза реперфузионного синдрома. Это связано с действием остаточного кислорода и прооксидантными эффектами медиаторов воспаления, количество которых при реперфузии ранее ишемизированных тканей многократно возрастает [5, 6, 7, 8]. Следовательно, представляет научный интерес состояние взаимосвязи свободнорадикальных процессов и естественных антиоксидантных систем в патогенезе развития состояний, вызванных комбинированным воздействием ионизирующего излучения и реперфузионного поражения.

В связи с этим, целью исследования явилось изучение показателей окислительно-антиоксидантного гомеостаза крови при изолированном реперфузионном синдроме и комбинированном радиационно-реперфузионном поражении.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальные исследования проведены на

белых крысах-самцах линии «Wistar», массой 180-200 граммов. Воздействие ионизирующего излучения осуществляли путем однократного тотального воздействия на животных гамма-облучения в дозе 6 Гр. Реперфузионный синдром моделировали непосредственно после облучения путем наложения резиновых жгутов на обе задние конечности животных на уровне паховой складки. Кровь для исследований у крыс получали путем декапитации под легким эфирным наркозом через 6 и 12 часов после реваскуляризации конечностей. Экспериментальные исследования проводились в соответствии с требованиями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, которые используются в исследовательских и других научных целях» (Strasburg, 18.03.1986) [9].

Определяли уровень ТБК-активных продуктов (ТБК-АП) [10] и содержание сывороточного антиокси-

сиданта церулоплазмينا (ЦП) [11] в сыворотке крови крыс, каталазоподобную активность (КПА) [12], пероксидазоподобную активность (ППА) [13] и активность супероксиддисмутазы (СОД) [14] в гемололизате крови крыс.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные нами результаты экспериментальных исследований показали, что при изолированном реперфузионном синдроме и его комбинации с воздействием ионизирующего излучения наблюдается значительная активация процессов свободнорадикального окисления липидов. Об этом свидетельствует значительное повышение содержания в сыворотке крови ТБК-активных продуктов. Так, через 6 часов после реваскуляризации конечностей наблюдается увеличение уровня ТБК-АП на 21,3 % ( $p < 0,01$ ) по сравнению с показателями контрольной группы (табл. 1).

Таблица 1

**Содержание ТБК-активных продуктов (нМ МДА/мл) в сыворотке крови крыс при моделировании реперфузионного синдрома и комбинированного радиационно-реперфузионного поражения**

Группы животных	Показатель	Время после снятия жгутов, часы	
		6	12
Контрольная группа	n	12	
	M±m	122,69±4,60	
Реперфузионный синдром	n	10	9
	M±m	148,83±9,08	158,63±11,70
	P <sub>1</sub>	<0,01	<0,001
Реперфузионный синдром + ионизирующее излучение	n	9	10
	M±m	182,99±5,25	182,93±5,91
	P <sub>1</sub>	<0,001	<0,001
	P <sub>2</sub>	<0,001	<0,05

Примечание: p<sub>1</sub> – показатель достоверности изменений в опытных группах по отношению к контролю, p<sub>2</sub> – показатель достоверности изменений в группах с комбинированным радиационно-реперфузионным поражением по отношению к данным в группах с изолированным реперфузионным синдромом.

При комбинации реперфузионного синдрома с воздействием ионизирующего излучения содержание ТБК-АП в сыворотке крови крыс возросло на 49,2 % ( $p < 0,001$ ) по сравнению с интактными животными, что на 23,0 % ( $p < 0,001$ ) превышало данные в группе с изолированным реперфузионным поражением. Через 12 часов после снятия жгутов наблюдался рост уровня ТБК-АП на 29,3 % ( $p < 0,01$ ) по сравнению с показателями контрольной группы. При моделировании комбинированного воздействия реперфузионного синдрома и ионизирующего излучения концентрация ТБК-АП в сыворотке крови крыс увеличилась на 49,1 % ( $p < 0,001$ ) по сравнению с животными контрольной группы. Таким образом, степень интенсификации перекисного окисления липидов в большей степени зависела от характера поражения, чем от продолжительности постишемического периода.

Интенсификация процессов ПОЛ сопровождается

истощением механизмов антиоксидантной защиты. Так, было установлено, что при моделировании реперфузионного синдрома к 6-ти часам исследования наблюдалось уменьшение концентрации церулоплазмينا в сыворотке крови на 35,6 % ( $p < 0,001$ ) по сравнению с показателями контрольной группы (табл. 2).

При моделировании реперфузионного синдрома аналогичной продолжительности, отягощенного воздействием ионизирующего излучения, содержание ЦП снизилось в большей степени и стало на 40,4 % ( $p < 0,001$ ) ниже значений контрольной группы. При увеличении длительности постишемического периода до 12-ти часов наблюдалось падение уровня ЦП на 45,9 % ( $p < 0,001$ ) по сравнению с показателями контрольной группы. При комбинированном воздействии реперфузионного синдрома и ионизирующего излучения концентрация ЦП в сыворотке крови крыс снизилась на 53,6 % ( $p < 0,001$ ) по сравнению с интактными животными. Прогрессив-

ное снижение содержания ЦП в сыворотке крови по мере развития реперфузионного синдрома свидетельствует о системной декомпенсации механизмов антиоксидантной защиты. Усилению процессов липопероксидации способствует и снижение активности внутриклеточных

антиоксидантных ферментов. Так, реперфузионный синдром через 6 часов после ревазуляризации конечностей сопровождался снижением активности СОД в гемоллизате крыс на 39,4 % ( $p < 0,001$ ), по сравнению с данными контрольной группы животных (табл. 2).

Таблица 2  
Содержание церулоплазмينا (мг/л) в сыворотке крови и активность супероксиддисмутазы (Ед/мл) в гемоллизате крыс при моделировании реперфузионного синдрома и комбинированного радиационно-реперфузионного поражения

Группы животных	Показатель	Активность каталазы, (мМ/гHb•сек)		Активность пероксидазы, (мМ/гHb•сек)	
		Время после снятия жгутов, часы			
		6	12	6	12
Контрольная группа	n	12		12	
	M±m	0,28±0,02		3,71±0,22	
Реперфузионный синдром	n	10	9	10	9
	M	0,16	0,38	2,97	3,26
	±m	±0,01	±0,04	±0,29	±0,10
	P <sub>1</sub>	<0,001	<0,01	<0,05	<0,05
Реперфузионный синдром + ионизирующее излучение	n	9	10	9	10
	M	0,22	0,34	3,49	1,63
	±m	±0,02	±0,05	±0,05	±0,11
	P <sub>1</sub>	<0,05	>0,25	>0,5	<0,001
	P <sub>2</sub>	<0,01	>0,5	<0,05	<0,001

Примечание: p<sub>1</sub> – показатель достоверности изменений в опытных группах по отношению к контролю, p<sub>2</sub> – показатель достоверности изменений в группах с комбинированным радиационно-реперфузионным поражением по отношению к данным в группах с изолированным реперфузионным синдромом.

При комбинированном воздействии реперфузионного синдрома и ионизирующего излучения активность СОД снизилась на 34,5 % ( $p < 0,001$ ) по сравнению с интактными животными. Реперфузионный синдром продолжительностью 12 часов сопровождался снижением активности СОД на 54,5 % ( $p < 0,001$ )

по сравнению с показателями у животных контрольной группы. При комбинированном воздействии реперфузионного синдрома и ионизирующего излучения наблюдалось более выраженное падение активности СОД в гемоллизате крыс, на 68,6 % ( $p < 0,001$ ) по сравнению с интактными животными.

Таблица 3  
Каталазоподобная (мМ/гHb•сек) и пероксидазоподобная (мМ/гHb•сек) активности в гемоллизате крыс при моделировании реперфузионного синдрома и комбинированного радиационно-реперфузионного поражения

Группы животных	Показатель	Активность каталазы, (мМ/гHb•сек)		Активность пероксидазы, (мМ/гHb•сек)	
		Время после снятия жгутов, часы			
		6	12	6	12
Контрольная группа	n	12		12	
	M±m	0,28±0,02		3,71±0,22	
Реперфузионный синдром	n	10	9	10	9
	M	0,16	0,38	2,97	3,26
	±m	±0,01	±0,04	±0,29	±0,10
	P <sub>1</sub>	<0,001	<0,01	<0,05	<0,05
Реперфузионный синдром + ионизирующее излучение	n	9	10	9	10
	M	0,22	0,34	3,49	1,63
	±m	±0,02	±0,05	±0,05	±0,11
	P <sub>1</sub>	<0,05	>0,25	>0,5	<0,001
	P <sub>2</sub>	<0,01	>0,5	<0,05	<0,001

Примечание: p<sub>1</sub> – показатель достоверности изменений в опытных группах по отношению к контролю, p<sub>2</sub> – показатель достоверности изменений в группах с комбинированным радиационно-реперфузионным поражением по отношению к данным в группах с изолированным реперфузионным синдромом.

При моделировании реперфузионного синдрома через 6 часов после снятия жгутов отмечалось снижение КПА на 42,2 % в гемолизате крыс ( $p < 0,001$ ) по сравнению с данными контрольной группы (табл. 3). При комбинации реперфузионного и лучевого поражений отмечалось снижение КПА на 22 % ( $p < 0,05$ ), в сравнении с интактными животными. При увеличении продолжительности постишемического периода до 12 часов имел место рост КПА на 37,9 % ( $p < 0,01$ ) по сравнению с данными контрольной группы, которое несколько уменьшилось (на 10,6 % ( $P > 0,5$ )) при комбинированном поражении, но превышало показатели контрольной группы животных на 23,3 % ( $P > 0,25$ ).

Проведенные экспериментальные исследования показали, что реперфузионный синдром к 6-ти часам исследования сопровождается снижением активности пероксидазы на 20,0 % ( $p < 0,05$ ) по сравнению с данными у контрольной группы животных (табл. 3). При комбинированном воздействии реперфузионного синдрома и ионизирующего излучения ППА в гемолизате крыс снижалась незначительно и недостоверно.

Реперфузионный синдром к 12 часам исследования сопровождался снижением ППА на 12,0 % ( $p < 0,05$ ) по сравнению с показателями у животных контрольной группы. При комбинированном воздействии реперфузионного и радиационного поражений наблюдалось выраженное падение активности пероксидазы в гемолизате крыс на 56,1 % ( $p < 0,001$ ) по сравнению с интактными животными. Обращает на себя внимание наблюдаемый дисбаланс активности внутриклеточных антиоксидантных ферментов, при котором падение активности СОД и ППА сочетается с ростом КПА. Подобные изменения в системе антиоксидантной защиты согласуются с данными литературных источников. Так, ишемия почки собаки и последующая ее перфузия криопретипированной плазмой сопровождается снижением активности СОД и пероксидазы на фоне повышения активности каталазы, которое вызвано высвобождением последней в результате повреждения мембран пероксисом [6].

Таким образом, результаты проведенных исследований свидетельствуют о потенцировании нарушений окислительно-антиоксидантного гомеостаза при комбинации реперфузионного синдрома с лучевым поражением, что позволяет расценивать эти изменения в качестве одного из молекулярно-патогенетических механизмов синдрома взаимного отягощения при КРП.

#### ВЫВОДЫ

1. Моделирование изолированного реперфузионного синдрома и комбинированного радиационно-реперфузионного поражения сопровождается интенсификацией процессов перекисного окисления липидов, которая имеет более выраженный характер при комбинированном поражении.

2. Активация перекисного окисления липидов при изучаемой патологии сопровождается истощением механизмов антиоксидантной защиты с дисбалансом активности внутриклеточных антиоксидант-

ных ферментов. При этом развитие комбинированного радиационно-реперфузионного поражения сопровождается более выраженным снижением показателей антиоксидантной системы.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Владимиров В. Г. Синдром взаимного отягощения как важнейшая особенность комбинированных радиационных поражений / В. Г. Владимиров, П. Б. Прокофьев // Военно-медицинский журнал. – 1993. – № 4. – С. 41–44.
2. Цыба А. Ф. Комбинированные радиационные поражения: патогенез, клиника, лечение / А. Ф. Цыба, М. Н. Фаршатова. – М.: Медицина. – 1993. – 285 с.
3. Кожемякин Л. А. Молекулярные механизмы воздействия ионизирующей радиации / Л. А. Кожемякин, С. А. Краевой // Военно-медицинский журнал. – 1993. – № 4. – С. 33–37.
4. Radiation induced oxidative stress: I. Studies in Ehrlich solid tumor in mice / [A. Agrawal, D. Choudhary, M. Upreti et al.] // Molecular and Cellular Biochemistry. – 2001. – V. 223, № 1–2. – P. 71–80.
5. Role of oxygen radicals in tourniquet-related ischemia-reperfusion injury of human patients / [H. P. Friedl, G. O. Till, O. Trentz et al.] // Klin. Wochenschr. – 1991. – Vol. 69 (21–23). – P. 1109–1112.
6. Биленко М. В. Ишемические и реперфузионные повреждения органов (молекулярные механизмы, пути предупреждения и лечения) / М. В. Биленко. – М.: Медицина, 1989. – 368 с.
7. Молекулярные механизмы развития экстремальных состояний и их коррекция / В.З. Харченко, А.В. Кубышкин, И.И. Фомочкина, Л.Л. Алиев, С.В. Харченко. Симферополь, издательство «Доля», 2011г. – 131 с.
8. Korge P. Reactive oxygen species production in energized cardiac mitochondria during hypoxia/reoxygenation: modulation by nitric oxide / P. Korge, P. Ping, J. N. Weiss // Circulation research – 2008. – V. 8, № 103. – P. 873–880.
9. Вишневський С.М. (пер. та ред.). Європейська конвенція про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей / Страсбург, 18 березня 1986 року: Збірка договорів Ради Європи: Українська версія // — К.: Парламентське видавництво, 2000. — 654 с.
10. Владимиров Ю. А. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах / Ю. А. Владимиров, А. И. Арчаков – М.: Наука, 1972. – 252 с.
11. Колб В. Г. Справочник по клинической химии / В. Г. Колб, В. С. Камышников. – Минск, 1982. – С.290–291.
12. Метод определения активности каталазы / [М. А. Королук, Л. И. Иванова, И.Б. Майорова и др.] // Лабораторное дело. – 1988. – № 1. – С. 16–19.
13. Попов Т. Метод определения пероксидазной активности крови / Т. Попов, Л. Нейковская // Гигиена и санитария. – 1971. – № 10. – С. 89–91.
14. Дубинина Е. Е. Активность и изоферментный спектр супероксиддисмутазы эритроцитов и плазмы крови человека / Е. Е. Дубинина, Л. А. Сальникова, Л. Ф. Ефимова // Лабораторное дело. – 1983. – № 10. – С. 30–33.