

ПІДСУМОК

При дії етанолу на 9-у добу ембріогенезу у мишей виникає затримка формування аорто-пульмональної перегородки, яка спричинена аномальним розвитком мезенхімної тканини конус-

но-стовбурового відділу серця, порушенням міграції клітин нервового гребеня в стовбурові гребеня, а також відсутністю своєчасної редукції м'язової оболонки стовбура і конуса серця.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Alcohol and congenital heart defects: an experimental study in mice / Webster W.S., Germain M.A., Lipson A., Walsh D. // *Cardiovasc. Res.*- 1984.- Vol.18, N 6.- P.335-338.
2. Development of the coronary arteries in a murine model of transposition of great arteries / Gonzalez-Iriarte M., Carmona R., Perez-Pomares J.M. et al. // *J. Mol. Cell. Cardiol.*- 2003.- Vol. 35, N 7.- P.795-802.
3. Developmental spectrum of cardiac outflow tract anomalies encompassing transposition of the great arteries and dextroposition of the aorta: pathogenic effect of extrinsic retinoic acid in the mouse embryo / Yasui H., Morishima M., Nakazawa M. et al. // *Anat. Rec.*- 1999.- Vol. 254, N 2.- P.253-260.
4. Hyperplastic conotruncal endocardial cushions and transposition of great arteries in perlecan-null mice / Costell M., Carmona R., Gustafsson E. et al. // *Circ. Res.*- 2002.- Vol.91.- P.158-165.
5. Kirby M. L. Embryogenesis of transposition of the great arteries. A lesson from the heart // *Circ. Res.*- 2002.- Vol. 91.- P.87-88.
6. Morphological observations on the pathogenetic process of transposition of the great arteries induced by retinoic acid in mice / Yasui H., Nakasawa M., Morishima M. et al. // *Circulation.*- 1995.- Vol. 91, N 9.- P. 2478-2486.



УДК 616.345-001:612.398.19-092.9

В.П. Польовий

ДИНАМІЧНІ ЗМІНИ ТКАНИННОГО ПРОТЕОЛІЗУ У СТАТЕВОЗРІЛИХ І СТАРИХ ЩУРІВ ІЗ ПОРАНЕННЯМ ТОВСТОЇ КИШКИ

Буковинський державний медичний університет
кафедра госпітальної хірургії
(зав.- проф. А.Г.Іфтодій)

Ключові слова: товста кишка, поранення, кровотеча, протеоліз, вік

Key words: large intestine, injury, bleeding, proteolysis, age

Резюме. Експериментально встановлено, що у половозрелих крыс с ранением толстой кишки в ее ткани перманентно возрастает интенсивность лизиса высокомолекулярных белков, тогда как у старых животных увеличение лизиса азоальбумина имеет синусоидальный характер с максимумом на 60-ю мин. эксперимента и снижением альбуминолитической активности до исходного уровня на 180-ю мин. опыта. В отличие от половозрелых животных, у которых интенсивность локального протеолитического распада высокомолекулярных белков после ранения толстой кишки прогрессивно возрастает, у старых крыс казеинолитическая активность ткани толстой кишки резко уменьшается на 60-ю мин. эксперимента и в дальнейшем постепенно уменьшается, оставаясь на 180-ю мин. больше исходного уровня. В ответ на ранение толстой кишки у половозрелых крыс коллагенолитическая активность ее ткани уменьшается со 120-й мин. и достигает минимальных величин на 180-ю мин. наблюдения. У старых животных снижения интенсивности тканевого коллагенолиза не происходит. Наоборот, через 120 мин. после ранения толстой кишки локальный протеолитический распад коллагена значительно возрастает и в конце опыта остается существенно выше контрольных показателей.

Summary. It was experimentally established that in sexually mature rats with an injured large intestine the intensity of lysis of highly molecular proteins permanently increases in intestine tissue, whereas in old rats an increase of azoalbumin lysis has a sinusoidal character with the peak falling on the 60th minute of the experiment with a further decrease of albuminolytic activity to

the initial level on the 180th minute of the experiment. In contrast to sexually mature animals in whom intensity of the local proteolytic breakdown of highly molecular proteins progressively increases after injury of a large intestine, in old rats the caseinolytic activity of a large intestinal tissue sharply increases during the 60th minute of the experiment with a further gradual decrease, remaining higher initial level during the 180th minute. In response to the injury of a large intestine in sexually mature rats the collagenolytic activity of its tissue diminishes beginning with the 120th minute and reaches minimal values during the 180th minute of the observation. In old animals a decrease of tissue collagenolysis intensity doesn't occur. On the contrary, in 120 minutes after an injury of the large intestine the local proteolytic breakdown of collagen considerably increases and at the end of the trial remains significantly higher than the control parameters.

Шлунково-кишкові кровотечі залишаються актуальною проблемою сучасної хірургії, оскільки створюють серйозну загрозу для життя хворого, особливо пацієнтів літнього і старечого віку [4,6]. При кровотечах травматичного генезу клінічна ситуація ускладнюється ще й тим, що одночасно відбувається інфікування черевної порожнини, внаслідок чого зона ушкодження кишкової стінки втягується у процес запалення. Одним із пускових механізмів ушкодження клітинних мембран у зоні запалення є активація процесів пероксидного окиснення ліпідів, що призводить до вивільнення протеолітичних ферментів. Судинні реакції і гемокоагуляційні зсуви створюють зону ішемії, що викликає вторинну альтерацію за участі металопротеїназ, лізосомальних ферментів і продуктів ліпопероксидації, що накопичуються внаслідок збільшення генерації активних форм кисню за ішемічними і реперфузійними механізмами [7,9].

Роль продуктів ліпопероксидації в ускладненні патологічного процесу добре відома. Водночас питання вікової залежності змін локальної протеолітичної активності при травматичних шлунково-кишкових кровотечах вивчено недостатньо.

Метою цієї роботи є дослідити особливості динаміки змін у старих щурів локальної протеолітичної активності тканини товстої кишки після її поранення.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

У роботі використано 75 статевозрілих і 75 старих самців білих щурів із масою тіла 0,14-0,16 кг (статевозрілі тварини віком 4-6 міс.) та 0,49-0,55 кг (старі тварини віком 20-22 міс.).

Усі операційні втручання проводилися відповідно до основних вимог Ванкуверських конференцій (1979, 1994) про біомедичні експерименти щодо гуманного ставлення до лабораторних тварин, в асептичних умовах, під уретановим наркозом (1000 мг/1 кг маси тіла). Після середньої лапаротомії моделювали стандартизоване пора-

нення товстої кишки у статевозрілих і старих щурів за допомогою спеціального пристрою з нанесенням прицільної дозованої травми силою до 40 кг/см² після попереднього накладання з двох сторін турнікетів для підвищення внутрішньопорожнинного тиску. Як ударники використовували монолітні конструкції різної форми та площі, а також з центральною і зміщеною віссю коректора ударної хвилі [8]. У всіх випадках після поранення товстої кишки на розріз черевної порожнини накладали 5 швів, що запобігало тепловим втратам. Дослідження змін параметрів тканинного протеолізу виконувалося серійно (по 15 тварин у серії) – через 30, 60, 120 і 180 хв. після поранення товстої кишки.

Після евтаназії тварин шляхом забору крові з черевної аорти наважки товстої кишки одразу заморожували в рідкому азоті. Перед дослідженням тканинного протеолізу наважки розморожували, гомогенізували у 2,0 мл охолодженого боратного буферу (рН 9.0) і надалі використовували в біохімічному аналізі.

Дослідження протеолітичної активності тканини товстої кишки проводили за лізисом азоальбуміну, азоказеїну та азоколу (Україна). Принцип методу полягає в тому, що при інкубації білкових азосполук у присутності активаторів та інгібіторів протеолізу, які містяться у тканині товстої кишки, відбувається лізис азоальбуміну (деградація низькомолекулярних протеїнів), азоказеїну (розпад високомолекулярних білків) та азоколу (колагеноліз), інтенсивність якого оцінюється за ступенем забарвлення інкубаційного розчину в лужному середовищі.

По 0,1 мл гомогенату тканини товстої кишки вносили у пробірки, які містили 5 мг азосполуки і 1,9 мл боратного буферу (рН 9.0). У дублікати пробірок "РП" (розчин порівняння) замість гомогенату товстої кишки додавали 0,1 мл боратного буферу. Усі пробірки одночасно інкубували у водяному термостаті "ТПС-1" при температурі 37°C протягом 15 хв. За цей проміжок часу відбувається розпад азосполук і вивільнення барв-

ника в інкубаційний розчин відповідно до протеолітичної активності тканини товстої кишки. Після інкубації усі пробірки одночасно охолоджували до 5°C для зупинки лізису азосполуки. У кожному пробірці для залужування середовища додавали по 20 мкл 5 М розчину NaOH. До усіх пробірок додавали 2,0 мл дистильованої води, вміст фільтрували через шар вати, що знаходилась у шприцах. На спектрофотометрі "СФ-46" (Росія) у кюветках товщиною 1 см при довжині хвилі 440 нм проти розчину порівняння проводили замірювання оптичної густини проб. Отримані екстинції перераховували на мкг азосполуки на 1 г селезінкової тканини за 1 год. інкубації за формулою: лізис азосполуки = $(E_{440} \times 1000 \times 4 \times k) : n = \text{мкг азосполуки/1 г тканини товстої кишки за 1 год.}$, де k – коефіцієнт перерахунку, n – наважка тканини товстої кишки (мг).

Статистичну обробку отриманих даних проводили методом варіаційного аналізу на РС IBM 586 з визначенням критерію Стьюдента за допомогою програми "BioStat" [3].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Результати дослідження динаміки змін протеолітичної активності у тканині товстої кишки наведені у таблиці. У статевозрілих щурів інтен-

сивність розпаду низькомолекулярних білків у тканині товстої кишки після її поранення протягом перших 30 хв. досліду не змінювалась. На 60-у хв. експерименту локальна альбумінолітична активність збільшувалася на 84,6%, на 120-у хв. – перевищувала вихідний рівень у 2,7 раза, а на 180-у хв. експерименту виявилась у 4,0 раза більшою за контроль. Зовсім інші зміни спостерігались у старих щурів: лізис азоальбуміну підвищувався у 3,2 раза на 60-у хв. досліду, був на 56,9% більшим за контрольні показники на 120-у хв., проте на 180-у хв. спостереження різко знижувався і вірогідно від вихідного рівня не відрізнявся. У статевозрілих і старих щурів визначальна альбумінолітична активність тканини товстої кишки була практично рівною. Порівняльний аналіз не виявив міжгрупових відмінностей зазначеного показника і через 30 хв. після поранення товстої кишки. На 60-у хв. досліду лізис альбуміну виявився на 46,5% більшим у старих тварин. Однак надалі інтенсивність розпаду низькомолекулярних білків у тканині пораненої товстої кишки старих щурів була значно меншою за таку у статевозрілих тварин: на 120-у хв. – удвічі, на 180-у хв. – у 3,7 раза.

Динаміка змін тканинного протеолізу у щурів із пораненням товстої кишки ($\bar{x} \pm Sx$)

Періоди спостереження	Статевозрілі щури n=15			Старі щури n=15		
	лізис азоальбуміну, мкг/1 г тканини за 1 год.	лізис азоказеїну, мкг/1 г тканини за 1 год.	лізис азоколу, мкг/1 г тканини за 1 год.	лізис азоальбуміну, мкг/1 г тканини за 1 год.	лізис азоказеїну, мкг/1 г тканини за 1 год.	лізис азоколу, мкг/1 г тканини за 1 год.
Контроль (вихідні показники)	19,67±1,44	16,56±1,61	13,55±1,45	16,55±1,71 p ₁ >0,05	14,01±1,18 p ₁ >0,05	10,91±1,06 p ₁ >0,05
Через 30 хв. після поранення	22,71±2,11 p>0,05	19,77±1,65 p>0,05	16,28±1,80 p>0,05	18,94±1,57 p>0,05 p ₁ >0,05	15,34±1,35 p>0,4 p ₁ =0,05	13,88±1,46 p>0,05 p ₁ >0,05
Через 60 хв. після поранення	36,31±3,06 p<0,001	44,74±4,05 p<0,001	14,27±1,67 p>0,5	53,21±4,33 p<0,001 p ₁ <0,05	59,35±4,81 p<0,001 p ₁ <0,05	9,51±0,85 p>0,05 p ₁ <0,05
Через 120 хв. після поранення	53,13±4,48 p<0,001	59,34±4,03 p<0,001	9,42±0,89 p<0,05	25,97±2,82 p<0,05 p ₁ <0,001	22,42±2,32 p<0,05 p ₁ <0,001	19,47±2,40 p<0,05 p ₁ <0,05
Через 180 хв. після поранення	78,97±6,22 p<0,001	86,20±4,43 p<0,001	5,75±0,83 p<0,001	21,31±2,61 p>0,05 p ₁ <0,001	20,13±2,34 p<0,05 p ₁ <0,001	16,53±1,81 p<0,05 p ₁ <0,001

Примітки: p – ступінь достовірності різниць показників відносно вихідного рівня; p₁ – ступінь достовірності різниць показників у статевозрілих і старих щурів у відповідні періоди спостереження; n – число спостережень.

Подібні зміни спостерігались і з боку протеолітичної деградації високомолекулярних білків. У статевозрілих щурів після поранення тов-

стої кишки відбувалося прогресивне підвищення казеїнолітичної активності її тканини, тоді як у старих тварин різке підвищення лізису азоказеї-

ну на 60-у хв. експерименту змінювалось поступовим зниженням інтенсивності розпаду високомолекулярних білків. Проте наприкінці спостереження лізис азоказеїну залишався на 43,7% більшим за контрольні показники. Порівняльний аналіз не виявив вірогідної різниці між визначальною казеїнолітичною активністю у старих і статевозрілих щурів, так само як і через перші 30 хв. після поранення товстої кишки. На 60-у хв. досліді інтенсивність розпаду високомолекулярних білків була на 32,7% більшою у старих щурів. Надалі, навпаки, лізис азоказеїну у старих тварин виявився значно меншим, ніж у статевозрілих щурів: на 120-у хв. – у 2,6 раз, на 180-у хв. – у 4,3 раз.

У статевозрілих тварин колагенолітична активність тканини товстої кишки протягом першої години після її поранення вірогідних змін не зазнавала. На 120-у хв. експерименту лізис азоколу виявився на 30,5% меншим за вихідний рівень, а на 180-у хв. досліді був у 2,4 раз меншим за контроль. У старих щурів змін локального колагенолізу також не відбувалося до 120-ї хв. досліді, коли колагенолітична активність тканини ушкодженої товстої кишки різко зростала і перевищувала контроль на 78,5%. Наприкінці спостереження інтенсивність лізису азоколу в тканині товстої кишки старих тварин залишалася високою – на 51,5% більшою за вихідні показники. Визначальний рівень колагенолітичної активності у статевозрілих і старих щурів був практично однаковим. Міжгрупових змін зазначеного показника не виявлялось і через 30 хв. після поранення товстої кишки. На 60-у хв. досліді інтенсивність протеолітичного розпаду колагену була на 33,4% меншою у старих щурів, однак на 120-у і 180-у хв. експерименту колагеноліз у тканині ушкодженої товстої кишки старих тварин перевищував такий у статевозрілих щурів відповідно у 2,1 і 2,9 раз.

Відомо, що при розвитку запального процесу в інтерстиційній тканині накопичуються лізосомальні ферменти, білкові і бактеріальні протеази [10]. Результат запальної реакції багато в чому залежить від співвідношення нейтральних металопротеїназ лаброцитів і кислих протеаз нейтрофілів. За звичайних умов запалення тучні клітини мають значний стимулювальний вплив на репарацію. Механізм модулювального впливу лаброцитів на репаративний процес пов'язаний із гальмуванням нейтрофілів, обмеженням процесів альтерації, активацією моноцитів-макрофагів, що сприяє очищенню вогнища запалення, а також зі стимуляцією фібробластів і фіброзогенезу [5]. Регуляція запальних реакцій здійснюється за допомогою цитокінів. У вогнищі запалення тучні клітини активують генерацію інтерлейкіну-1 [1].

Водночас гідролази, що продукуються нейтрофілами, мають здатність до розщеплення або інактивації цитокінів, а також можуть блокувати їх продукцію [12]. Поряд із цим, гідролази пригнічують експресію цитокінових рецепторів, здійснюють їх шедінг [11]. Цитокіни, що виробляються мононуклеарними клітинами, діють на початкові етапи запальних та регенераторних процесів. Їх комплексна дія проявляється пригніченням надмірної проліферації фібробластів та стримуванням запальної реакції шляхом гальмування міграції макрофагів і нейтрофілів до зони ушкодження [2].

Не виключено, що послаблення з віком цитокінової регуляції запального процесу у старих щурів інвертує нормальну протеолітичну реакцію в зоні поранення товстої кишки, внаслідок чого замість активації протеолітичного розпаду низько- і високомолекулярних білків та пригнічення колагенолізу відбувається зниження альбуміно- і казеїнолітичної активності на тлі інтенсифікації локального лізису колагену. Це суттєво порушує процеси репаративної регенерації, сприяє пролонгації крововтрати і створює загрозу неспроможності накладених на зону ушкодження товстої кишки швів, оскільки процеси проліферації фібробластів і колагенуотворення при старінні перебігають на тлі високої локальної колагенолітичної активності.

ВИСНОВКИ

1. У статевозрілих щурів із пораненням товстої кишки в її тканині перманентно зростає інтенсивність лізису високомолекулярних білків, тоді як у старих тварин збільшення лізису азоальбуміну має синусоїдальний характер із максимумом на 60-у хв. експерименту і зниженням альбумінолітичної активності до вихідного рівня на 180-у хв. досліді.

2. На відміну від статевозрілих тварин, у яких інтенсивність локального протеолітичного розпаду високомолекулярних білків після поранення товстої кишки прогресивно зростає, у старих щурів казеїнолітична активність тканини товстої кишки різко збільшується на 60-у хв. експерименту і надалі поступово зменшується, залишаючись на 180-у хв. більшою за вихідний рівень.

3. У відповідь на поранення товстої кишки у статевозрілих щурів колагенолітична активність її тканини зменшується з 120-ї хв. досліді і досягає мінімальних величин на 180-у хв. спостереження. У старих тварин зниження інтенсивності тканинного колагенолізу не відбувається. Навпаки, через 120 хв. після поранення товстої кишки локальний протеолітичний розпад колагену значно зростає і наприкінці досліді залишається суттєво вищим за контрольні показники.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Влияние тучных клеток на продукцию интерлейкина-1 макрофагами экссудата и костного мозга при воспалении / Клименко Н.А., Дыгай А.М., Богдашин И.В. и др. // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 1993. – Т. 115, № 6. – С.599-600.
2. Возианов А.Ф., Бутенко А.К., Зак К.П. Цитокины. Биологические и противоопухолевые свойства. – К.: Наук. думка, 1998. – 313 с.
3. Гланц С. Медико-биологическая статистика. – М.: Практика, 1999. – 459с.
4. Ефименко Н.А., Лысенко М.В., Асташов В.Л. Кровотечение из хронических гастродуоденальных язв: современные взгляды и перспективы лечения // Хирургия. – 2004. – № 3. – С.56-60.
5. Клименко Н.А., Татарко С.В. Роль тучных клеток в репаративных явлениях при воспалении // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 1995. – Т. 119, № 3. – С.262-265.
6. Лечебная тактика при толстокишечных кровотечениях опухолевого генеза / Бойко В.В., Криво ручко И.А., Красивский С.Л. и др. // Хірургія України. – 2003. – Т. 8, № 2. – С.63-64.
7. Насыров Х.М., Кондратенко Р.М. К прооксидантному действию медиаторов воспаления // Патол. физиология и эксперим. терапия. – 1992. – № 3. – С.12-14.
8. Принципы моделирования травматических повреждений внутренних органов в экспериментальной хирургии / Пикенин А.М., Горонов В.Г., Григорьян Г.О., Молчанов А.И. // Клинич. хирургия. – 1990. – №4. – С. 25-26.
9. Сапрыкин В.П., Галанкин В.Н. Ультраструктурная характеристика нефлогогенного и флогогенного реагирования моно- и полинуклеарных фагоцитов при их взаимодействии со Staphylococcus aureus // Патол. физиология и эксперим. терапия. – 1998. – № 1. – С.22-26.
10. Чилингиров Р.Х. Влияние ингибиторов протеолиза на некоторые бактериальные возбудители и течение гнойно-воспалительного процесса // Патол. физиология и эксперим. терапия. – 1997. – № 3. – С.37-39.
11. Cleavage of the epidermal growth factor receptor by a membrane-bound leupeptin-sensitive proteinase active in nonionic detergent lysates of senescent but not young human diploid fibroblasts / Carlin C., Phillips P.D., Brooks-Federich K. et al. // J. Cell. Physiol. – 1994. – Vol.160. – P.427-434.
12. Enzymatic degradation of tumor necrosis factor by activated human neutrophils: Role of elastase / Nortier J., Vandenabeele P., Noel E. et al. // Life Sci. – 1991. – Vol. 49, N 25. – P.1879-1886.

