

6. Туркутюков В.Б., Скурихина Ю.Е., Скурихина Л.А., Баян В.П. Молекулярно-генетический мониторинг за формированием резистентности к антибиотикам штаммов микроорганизмов, выделенных у пациентов специализированных стационаров // Дальневосточный журнал инфекционной патологии. 2009. № 14. С. 46–50.
7. Туркутюков В.Б., Яковлев А.А., Дзюба Г.Т. и др. Изучение механизмов формирования актуальной инфекционной и неинфекционной заболеваемости в Дальневосточном регионе // Тихоокеанский мед. журн. 2008. № 3. С. 46–49.
8. Govor O. The trend in basic epidemiological indicators for tuberculosis in Primorye over the period 1992–2002 // JRL Research & Analytical Supplement, 2004. No. 21. P. 1810–1811.
9. Baranovich T., Zaraket H., Higuchi W. et al. C2-194 Molecular Characterization of Pantone-Valentine Leukocidin-Positive Methicillin-Resistant and Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* in Russia // 47th ICAAC, Chicado, September 17–20. 2007. P. 113.
10. Baranovich T., Zaraket H., Shabana I.I. et al. Molecular characterization and susceptibility of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* isolates from hospitals and the community in Vladivostok, Russia // Clin. Microbiol. Infect. 2009. Aug 4.10.1111/j. Pp.1469–0691.2009.02891–02898.

Поступила в редакцию 11.02.2010

MOLECULAR-GENETIC MONITORING OF MICROORGANISMS RESISTANCE TO ANTIBIOTICS

V.B. Turkutyukov

Vladivostok State Medical University (2 Ostryakova Av. Vladivostok 690950 Russia)

Summary – The author presents a lecture devoted to antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus pneumoniae* and *Mycobacterium tuberculosis* strains. The examinations conducted by the VGMU Epidemiology Department staff in various regional medical and preventive treatment facilities via genetic methods of identification allowed authors to point out the growing number of infections caused by microorganisms being resistant to antibiotics. The leading factor proved to be responsible for the increase of antibiotic-resistant strains is increasing frequency of prescription of antimicrobial agents, first of all, broad-spectrum antibiotics. The authors highlight the need to territorially monitor the resistance and disclose the results among the doctors of various specialties.

Key words: genetics, microorganisms, antibiotic resistance.

Pacific Medical Journal, 2011, No. 2, p. 28–31.

УДК 616.2-008.9:616.153.915.39:616.61-008.64]-092.9

ВЫРАЖЕННОСТЬ ПРОЦЕССОВ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ В РЕСПИРАТОРНОЙ СИСТЕМЕ У КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛЬЮ ХРОНИЧЕСКОЙ ПОЧЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

Ю.С. Ландышев¹, Н.А. Щербань²

¹ Амурская государственная медицинская академия (675013 г. Благовещенск, ул. Горького, 95),

² Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова (197022 г. Санкт-Петербург, ул. Л. Толстого, 6/8)

Ключевые слова: перекисное окисление липидов, респираторная система, хроническая почечная недостаточность, дигидрокверцетин.

На модели экспериментальной хронической почечной недостаточности изучено состояние процессов перекисного окисления липидов в респираторной системе крыс. Выявлена активация свободно-радикальных реакций в легочной ткани, превышающая сывороточные значения в несколько раз. Установлен значительный антиоксидантный эффект биофлавоноида дигидрокверцетина, выражающийся в ингибировании выработки продуктов первого этапа перекисного окисления липидов и повышении активности сывороточного церулоплазмينا.

Развитие диализных технологий позволило значительно увеличить продолжительность жизни больных с хронической почечной недостаточностью (ХПН), однако это способствовало возникновению особых условий функционирования организма при длительной уремии [6]. Результатом этого явились многочисленные осложнения со стороны тех органов и систем, которые берут на себя часть выделительной функции почек. Одной из них является респираторная система, что и определяет необходимость ее исследования в условиях уремической интоксикации [5].

Щербань Наталья Анатольевна – канд. мед. наук, ассистент кафедры пульмонологии СПбМУ; e-mail: scherbann@mail.ru

В ряде исследований было показано, что длительное течение ХПН приводит к фиброзу интерстициальной ткани легких, значительному снижению их диффузионной способности и гипоксемии, которая только у 20 % пациентов поддается коррекции достижением целевого уровня гемоглобина [10, 11]. Формирование легочного фиброза при хронической почечной недостаточности было подтверждено в экспериментальных исследованиях [7]. Аналогичные изменения были обнаружены при электронно-микроскопическом исследовании ткани легких больных с длительной уремией: визуализировались участки повреждения альвеоларно-капиллярной базальной мембраны, перикапиллярный отек и очаговый фиброз интерстиция [8].

Поражение респираторной системы при ХПН является следствием разнообразных причин, среди которых выделяют уремическую интоксикацию, нарушение водно-электролитного баланса и минерального обмена, развитие сопутствующей сердечной недостаточности, иммунологических нарушений [12]. Существует и ряд других механизмов, которые в настоящее время остаются недостаточно изученными.

В последние годы значительная роль в прогрессировании ХПН отводится оксидативному стрессу, однако остается неосвещенным вопрос о его влиянии на бронхолегочную систему нефрологических больных [9].

Большинство процессов, протекающих в бронхолегочной системе, сопровождаются дисбалансом в системе «оксиданты/антиоксиданты», в результате которого свободные радикалы при взаимодействии с различными клеточными структурами – белками, нуклеиновыми кислотами, липидами – вызывают повреждение клеток [2]. В большей степени это касается эндотелия, наиболее тесно соприкасающегося с кислородом – активным инициатором свободно-радикальных реакций [3]. Эндотелий сосудов легких является одной из основных точек приложения перекисного окисления липидов (ПОЛ) из-за непосредственного контакта с кислородом и другими оксидантами, присутствующими в атмосферном воздухе [14]. Многие свободные радикалы обладают не только цитотоксическими свойствами, но и уникальной способностью выступать в роли вторичных внутриклеточных мессенджеров, участвуя в процессах пролиферации, дифференцировки и апоптоза клеток, за счет чего происходит реализация их фиброгенных эффектов [13].

Таким образом, купирование оксидативного стресса является одним из важнейших направлений в замедлении прогрессирования ХПН и развития полиорганного осложнения.

Препараты, обладающие способностью подавлять свободно-радикальные реакции, немногочисленны и большинство из них не лишены побочных эффектов, что недопустимо при снижении выделительной функции почек. Оптимальным при ХПН должно быть вещество, обладающее максимальным терапевтическим эффектом при минимальной токсичности [4]. В качестве такого средства нами был выбран дигидрокверцетин – флавоноид, содержащийся в экстрактах древесины сибирской и даурской лиственниц [1]. Кроме высокой антиоксидантной активности, дигидрокверцетин обладает ангиопротективным, регенерирующим и мембраностабилизирующим эффектами.

Целью исследования явился анализ морфофункционального состояния микроциркуляторного русла бронхолегочной системы и свободнорадикально-антиоксидантного гомеостаза у крыс с экспериментальной моделью почечной недостаточности, а также определение антиоксидантной эффективности дигидрокверцетина в условиях сниженной выделительной функции почек.

Материал и методы. Создание экспериментальной модели ХПН выполнено методом субтотальной нефрэктомии на 24 белых нелинейных половозрелых крысах-самцах массой 180–220 г. Протокол экспериментальной части исследования соответствовал принципам биологической этики, изложенным в «Международных рекомендациях по проведению

медико-биологических исследований с использованием животных» (1985), «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» (Страсбург, 18.03.1986), приказе Минздрава СССР № 755 от 12.08.1977 г. «О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных» и приказе МЗ РФ № 267 от 19.06.2003 г. «Об утверждении правил лабораторной практики».

Крысы содержались в стандартных условиях, в виварии Амурской государственной медицинской академии, согласно «Санитарным правилам по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)», утвержденных Главным государственным санитарным врачом СССР (№ 1045–73 от 06.04.1973 г.), при естественном световом режиме без ограничения доступа к воде и пище.

При завершении исследований выведение животных из опыта проводили с соблюдением требований гуманности согласно приложению № 4 к Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных (приложение к приказу Минздрава СССР № 755 от 12.08.1977 г.) о «Порядке проведения эвтаназии (умерщвления животного)» путем декапитации. Исследование одобрено этическим комитетом Амурской государственной медицинской академии.

Животные были разделены на три группы:

1-я группа – 10 крыс с экспериментальной моделью ХПН, которым перорально вводили дигидрокверцетин (1,6 мг/кг в сутки);

2-я группа – 9 крыс, с экспериментальной моделью ХПН, не получавших дигидрокверцетина.

3-я группа – 5 ложнооперированных крыс.

Контрольную группу составили 5 здоровых крыс.

Операция субтотальной нефрэктомии проводилась в два этапа. На первом под общим обезболиванием (раствор ксилазина гидрохлорида – 2 мг/кг, внутримышечно и раствор тиопентала натрия – 10 мг/кг, внутривенно) выполнялась типичная нефрэктомия справа. На втором этапе (через 2 недели) под общим обезболиванием выполнялась резекция верхнего и нижнего полюсов левой почки, гемостаз достигался прошиванием паренхимы органа кетгутом.

У крыс 3-й группы под общим обезболиванием проводилось рассечение кожи, подкожной жировой клетчатки и мышц в проекции почек с последующим послойным ушиванием операционной раны наглухо для оценки влияния анестезиологического пособия и травматического повреждения на показатели свободнорадикально-антиоксидантного гомеостаза.

Швы снимали на 7-е сутки после операции. Раны заживали первичным натяжением.

Субстратом для исследования системы «оксиданты/антиоксиданты» послужила сыворотка крови и гомогенаты легких. Состояние окислительных процессов изучали по содержанию в сыворотке крови

Таблица

Показатели перекисного окисления липидов и антиоксидантной активности сыворотки крови и липидных экстрактов из легких крыс ($M \pm m$)

Показатель		Группа животных			
		1-я	2-я	3-я	Контроль
Диеновые конъюгаты	в сыворотке крови, нмоль/мл	12,2 $\pm$ 1,3 ^{1,2}	18,5 $\pm$ 2,1 ¹	15,5 $\pm$ 2,3	15,9 $\pm$ 0,8
	в экстрактах легких, нмоль/мг	21,2 $\pm$ 1,9 ^{1,2}	40,1 $\pm$ 2,4 ¹	30,2 $\pm$ 1,7	31,1 $\pm$ 0,9
Гидроперекиси липидов	в сыворотке крови, нмоль/мл	23,5 $\pm$ 1,2	25,6 $\pm$ 1,7 ¹	21,2 $\pm$ 0,4	20,9 $\pm$ 0,8
	в экстрактах легких, нмоль/мг	48,5 $\pm$ 1,4 ²	67,7 $\pm$ 2,9 ¹	49,4 $\pm$ 0,9	47,2 $\pm$ 1,4
ТБК-реактивные продукты, нмоль/мл		5,1 $\pm$ 0,6 ¹	5,5 $\pm$ 0,9 ¹	4,2 $\pm$ 1,2	4,3 $\pm$ 0,8
Церулоплазмин, мг/100 мл		56,9 $\pm$ 2,1 ^{1,2}	26,6 $\pm$ 0,4 ¹	39,5 $\pm$ 1,6	41,6 $\pm$ 1,1
Витамин Е	в сыворотке крови, мкг/мл	23,1 $\pm$ 1,3 ¹	22,7 $\pm$ 1,2 ¹	31,8 $\pm$ 2,9	32,1 $\pm$ 1,3
	в экстрактах легких, мкг/мг	42,7 $\pm$ 2,1 ¹	43,1 $\pm$ 2,4 ¹	54,6 $\pm$ 1,8	55,2 $\pm$ 1,6

¹ Разница с контролем статистически значима.

² Разница со 2-й группой статистически значима.

продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-реактивных продуктов), в сыворотке крови и липидных экстрактах из легких крыс – диеновых конъюгат и гидроперекисей липидов. Количество ТБК-реактивных продуктов и диеновых конъюгат определяли по оптической плотности на фотоэлектроколориметре КФК-3 при длине волны 532 и 233 нм соответственно. Для определения содержания гидроперекисей липидов использовали их способность окислять ионы Fe^{2+} с последующей реакцией на Fe^{3+} с тиоцианатом аммония.

Для исследования системы антиоксидантной защиты определяли содержание церулоплазмина в сыворотке крови. Принцип метода основан на окислении р-фенилендиамина при участии церулоплазмина и образовании окрашенного комплекса. Оптическую плотность проб измеряли при длине волны 540 нм. Содержание витамина Е определяли в сыворотке крови и липидных экстрактах из легких по цветной реакции с дипиридилом и $FeCl_3$ при длине волны 540 нм.

Статистическая обработка данных проводилась при помощи программ Excel и Statistica 6.0.

Результаты исследования. Для подтверждения хронической почечной недостаточности определялся уровень мочевины и креатинина крови, полученной из шейных вен животных после выведения из эксперимента. У крыс с экспериментальной моделью ХПН отмечалась активация свободнорадикальных реакций, о чем свидетельствовало повышение по сравнению с контрольной группой концентрации диеновых конъюгат в сыворотке крови на 14 %, гидроперекисей липидов – на 18,4 %, ТБК-реактивных продуктов – на 22,2 % (табл.).

Интенсивность процессов ПОЛ была более выражена в легочной ткани крыс 2-й группы, где концентрация диеновых конъюгат превысила контрольные значения на 22,4 %, гидроперекисей липидов – на 30,3 %. При этом наблюдалось угнетение механизмов антиоксидантной защиты, которое характеризовалось

снижением в сыворотке крови концентраций церулоплазмина на 36,1 % и витамина Е – на 29,3 %, содержания витамина Е в липидных экстрактах из легких – на 21,9 % по сравнению с контрольной группой. Отсутствие достоверных различий между показателями 3-й и контрольной групп указывало на то, что оперативное вмешательство и анестезиологическое пособие не являлись факторами, способными привести к развитию оксидативного стресса в отдаленном периоде после их выполнения.

Применение дигидрохверцетина в течение 12 недель с момента формирования ХПН способствовало снижению активности процессов ПОЛ, что выражалось в более низкой концентрации диеновых конъюгат в сыворотке крови крыс 1-й группы по сравнению с аналогичными значениями во 2-й и контрольной группах (на 34,1 и 23,3 % соответственно). Наибольшая эффективность антиокислительного действия дигидрохверцетина отмечалась в легочной ткани крыс 1-й группы, где концентрация диеновых конъюгат оказалась на 47,1 %, а гидроперекисей липидов на 28,4 % ниже, чем во 2-й группе. Введение дигидрохверцетина не привело к снижению содержания ТБК-реактивных продуктов у крыс 1-й группы, что характеризовалось отсутствием достоверных статистических различий с показателями 2-й группы.

При использовании дигидрохверцетина отмечалось увеличение концентрации церулоплазмина сыворотки крови в 2,1 раза по сравнению с показателями 2-й группы и на 26,9 % – по сравнению с группой контроля. Содержание витамина Е оказалось сниженным в во всех исследуемых субстратах крыс с экспериментальной моделью ХПН.

Обсуждение полученных данных. ПОЛ при ХПН, так же как и при других процессах, имеет несколько этапов. Диеновые конъюгаты и гидроперекиси липидов являются первичными продуктами ПОЛ, и их накопление оказывает повреждающее действие на белки, липопротеиды, нуклеиновые кислоты.

Избыточное образование этих продуктов в легочной ткани (по сравнению с сывороткой крови) подтверждает мнение о более выраженной активации ПОЛ в присутствии кислорода, содержащегося в атмосферном воздухе и являющегося инициатором цепи свободнорадикальных реакций.

Вторичными продуктами ПОЛ являются альдегиды и кетоны, к которым относятся ТБК-реактивные продукты (малоновый диальдегид). Их взаимодействие с мембранными соединениями приводит к деструкции мембран и гибели клеток. Увеличение концентрации продуктов ПОЛ не только в сыворотке крови, но и в легочной ткани экспериментальных животных, указывало на системность свободнорадикальных реакций при ХПН, приводящих к необратимым изменениям структуры и функции органов. Другим фактором, способствующим разрушению клеточных структур, является ухудшение антиоксидантной защиты, что у экспериментальных животных выражалось в снижении уровней церулоплазмينا и витамина Е. Развитие при ХПН оксидативного стресса, выражающегося в снижении антиоксидантной защиты и повышении активности прооксидантной системы, определяет необходимость назначения препаратов, обладающих антиоксидантными свойствами.

Применение дигидрохверцетина, являющегося фенольным соединением и за счет этого – акцептором свободных радикалов, показало его эффективность в ингибировании синтеза продуктов ПОЛ, однако преимущественно на первом этапе свободнорадикального окисления, тогда как концентрация ТБК-реактивных продуктов оставалась достаточно высокой. Кроме того, длительное введение дигидрохверцетина способствовало повышению антиоксидантной защиты, а именно – увеличению оксидантной активности церулоплазмينا, механизм действия которого связан с его способностью катализировать окисление ионов двухвалентного железа без сопутствующего выделения свободных радикалов. При этом антиокислительная способность витамина Е оставалась достаточно низкой, что указывало на отсутствие влияния дигидрохверцетина на это звено антиоксидантной защиты.

Выводы

1. Хроническая почечная недостаточность сопровождается активацией перекисного окисления липидов на фоне истощения системы антиоксидантной защиты.

2. Высокая активность перекисного окисления липидов в легочной ткани может являться одним из факторов повреждения респираторной системы при хронической почечной недостаточности.

3. Растительный биофлавоноид дигидрохверцетин обладает способностью стимулировать некоторые звенья антиоксидантной защиты и подавлять

активность свободнорадикальных реакций, тем самым обеспечивая сохранение окислительно-антиоксидантного баланса клеток.

Литература

1. Бабенкова И.В., Теселкин Ю.О., Ребров Л.Б. и др. Механизм ингибирующего действия дигидрохверцетина на процесс перекисного окисления фосфолипидов мембран // Биомед. технологии и радиоэлектроника. 2003. № 6. С. 37–43.
2. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты / Меньшикова Е. Б., Ланкин В. З., Зенков Н. К. и др. М.: Слово, 2006. 553 с.
3. Annuk M., Zilmer M., Lind L. et al. Oxidative stress and endothelial function in chronic renal failure // J. Am. Soc. Nephrol. 2001. Vol. 12. P. 2747–2752.
4. Boaz M., Smetana S., Weinstein T. et al. Secondary prevention with antioxidants of cardiovascular disease in end-stage renal disease (SPACE): randomized placebo-controlled trial // Lancet. 2000. Vol. 356. P. 1213–1218.
5. De Backer W. Renal failure and the lung // Eur. Respir. J. 2006. Vol. 34. P. 102–111.
6. Donate T., Herreros A., Martinez E. et al. Protein oxidative stress in dialysis patients // Adv. Perit. Dial. 2002. Vol. 18. P. 15–17.
7. Kasacka L., Pilat-Marcinkiewicz B., Pankiewicz W. et al. Morphological evaluation of the lungs in rats with experimentally induced renal failure // Rocz. Akad. Med. Bialymst. 2004. Vol. 1, No. 49. P. 204–206.
8. Lee Y.S. Ultrastructural observations of chronic uremic lungs with special reference to histochemical and X-ray microanalytic studies on altered alveolocapillary basement membranes // Am. J. Nephrol. 1985. Vol. 5, No. 4. P. 255–266.
9. Massy Z.A., Nguyen-Khoa T. Oxidative stress and chronic renal failure: markers and management // J. Nephrol. 2002. Vol. 15. P. 336–341.
10. Pierson D.J. Respiratory considerations in the patient with renal failure // Respir. Care. 2006. Vol. 51, No. 4. P. 413–422.
11. Senatore M., Buemi M., Di Somma A., Sapio C. et al. Respiratory function abnormalities in uremic patients // G. Ital. Nefrol. 2004. Vol. 21, No. 1. P. 29–33.
12. Siems W., Quast S., Carluccio F. et al. Oxidative stress in chronic renal failure as a cardiovascular risk factor // Clin. Nephrol. 2002. Vol. 58, No. 1. P. 12–19.
13. Siwik D. A. Oxidative stress regulates collagen synthesis and matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts // Am. J. Physiol. 2001. Vol. 280. P. 53–60.
14. Yao H., Yang S.R., Kode A. et al. Redox regulation of lung inflammation: role of NADPH oxidase and NF-kappaB signaling // Biochem. Soc. Trans. 2007. Vol. 35, No. 5. P. 1151–1155.

Поступила в редакцию 25.12.2010.

INTENSITY OF LIPID PEROXIDATION PROCESSES IN THE RESPIRATORY SYSTEM IN RAT WITH EXPERIMENTAL CHRONIC RENAL INSUFFICIENCY

Y.S. Landyishev¹, N.A. Scherban²

¹Amur State Medical Academy (95 Gorkogo St. Blagoveshchensk 675013 Russia), ²Saint-Petersburg State Medical University Named After Academician I.P. Pavlov (6/8 L. Tolstogo St. Saint-Petersburg 197022 Russia)

Summary – The model of experimental chronic renal insufficiency allowed to study the state of lipid peroxidation processes in rats' respiratory system, identify activation of free radical reactions in pulmonary tissue proved to be several times more than the serum indices, and detect considerable anti-oxidative effect of bioflavonoid dihydroquercetin that manifested itself in inhibiting induction of the first stage lipid peroxidation products and increasing activity of serum ceruleoplasmin.

Key words: lipid peroxidation, respiratory system, chronic renal insufficiency, dihydroquercetin.

Pacific Medical Journal, 2011, No. 2, p. 31–34.