

УДК 616-005.4-06:611.018.74-085.27.08

ДЕФЕРОКСАМИН В ПРОФИЛАКТИКЕ РЕПЕРFUЗИОННЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ ЭНДОТЕЛИЯ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИШЕМИИ/РЕПЕРFUЗИИ

*Ю.П. Орлов¹, В.Н. Лукач¹, В.Т. Долгих¹, Е.Л. Соболева², А.М. Иванова¹, Е.Ф. Кожевникова¹*¹Омская государственная медицинская академия (644043, г. Омск, ул. Ленина, 12),²Иркутская областная клиническая больница (664079, г. Иркутск, мкр. Юбилейный, 100)**Ключевые слова:** трансферрин, ферритин, эндотелиальная дисфункция, дефероксамин.

Для анализа патогенетической значимости нарушенного обмена железа в развитии эндотелиальной дисфункции в период реперфузии в опыте на 40 крысах-самцах линии «Вистар» моделировалась 15-минутная ишемия и 15-минутная реперфузия кишечника. Исследовали показатели центральной гемодинамики, вязкость крови, содержание в сыворотке крови трансферрина, ферритина, сывороточного железа и фактора Виллебранда. Выявлено, что в период реперфузии в сыворотке крови уменьшается концентрация трансферрина, увеличивается концентрация ферритина, фактора Виллебранда и регистрируются нарушения реологических свойств крови со снижением сердечного индекса и общего периферического сосудистого сопротивления. Предварительное введение дефероксамина приводило к восстановлению концентрации трансферрина, снижению уровня ферритина, нормализации реологии крови и показателей гемодинамики, и отмечалось снижение степени деструкции эндотелия, что связано с уменьшением концентрации в сыворотке крови Fe^{2+} . Заключение: предварительным введением дефероксамина можно эффективно предупреждать повреждение эндотелия во время реперфузии при критических состояниях.

Расстройства микроциркуляции на уровне сосудов кишечника и эндотелиальная дисфункция являются важными патогенетическими факторами развития критического состояния при различных абдоминальных катастрофах. Это обуславливает нестабильность центральной гемодинамики как во время оперативных вмешательств, так и в раннем послеоперационном периоде [1, 7]. Возникновение коллапса, а порой и стойкой артериальной гипотензии у больных после восстановления мезентериального кровотока объясняется эффектом перераспределения крови вследствие значительного и резкого увеличения объема сосудистого русла [3]. Быстротечность повреждения эндотелия объясняет быстроту развития синдрома «капиллярной утечки», что потенцирует прогрессирование гемодинамических расстройств уже в течение 20–30 мин после расправления инвагинатов, устранения странгуляционных спаек, санации кишечника [12]. Повреждение эндотелия в подобных случаях во многом связано с активацией процессов свободно-радикального окисления (СРО), так как при реперфузии отмечается восстановление притока насыщенной кислородом крови к поврежденным на фоне ишемии и гипоксии клеткам стенки кишки, в результате чего происходит их дальнейшее и необратимое повреждение [3, 5]. Именно свободные радикалы кислорода являются пусковым

фактором синтеза ряда биохимических субстанций, приводящих к нарушению трофики и архитектоники эндотелиальных клеток [14]. Так, при моделировании ишемии/реперфузии J.C. Yang et al. [15] обнаружили высокую концентрацию малонового диальдегида и активность супероксиддисмутазы не только в сыворотке крови, но и в гомогенатах тканей легких, почек и поджелудочной железы. В ряде работ подчеркивается связь повреждения эндотелия с нарушением реологических свойств крови и повреждающим действием избытка в сыворотке крови Fe^{2+} [4, 7, 13]. В этой связи целью настоящего исследования явился анализ патогенетической значимости нарушений обмена железа в расстройствах микроциркуляции и в развитии эндотелиальной дисфункции при ишемии/реперфузии.

Материал и методы. Эксперименты проведены с учетом положений, рекомендованных Международным комитетом по науке о лабораторных животных и поддержанных ВОЗ, согласно требованиям Европейской конвенции (Страсбург, 1986) по содержанию, кормлению и уходу за подопытными животными, а также выводу их из эксперимента и последующей утилизации. В эксперимент брали крыс-самцов линии «Вистар» в возрасте 5–6 мес массой 222 ± 14 г через 10–12 часов после еды при свободном доступе к воде. Объем выборки животных рассчитывали по формуле F. Lopez-Jimenez et al. (1998).

В 1-й группе (10 животных) под диэтиловым эфирным наркозом (ОАО «Синтез», Курган, Россия) моделировали 15-минутную тотальную ишемию кишечника путем наложения зажима на корень брыжейки. После снятия зажима наблюдали реперфузию длительностью до 15 мин, а затем животных выводили из эксперимента. Во 2-й группе (10 животных) за 2 часа до моделирования ишемии/реперфузии внутрибрюшинно вводили дефероксамин (десферал) в дозе 80 мг/кг в 5 мл физиологического раствора хлорида натрия. В 3-й группе (10 животных) за 2 часа до моделирования ишемии/реперфузии предварительно вводили физиологический раствор хлорида натрия в объеме 5 мл (плацебо). 10 intactных животных составили 4-ю группу (контроль). Кровь для лабораторных исследований забирали из брюшной полости после вскрытия нижней полой вены. Исследовали концентрацию сывороточного железа с помощью набора реактивов компании «ДИАСИС» (Германия) на биохимическом анализаторе «Марс», трансферрина – иммунотурбидиметрическим

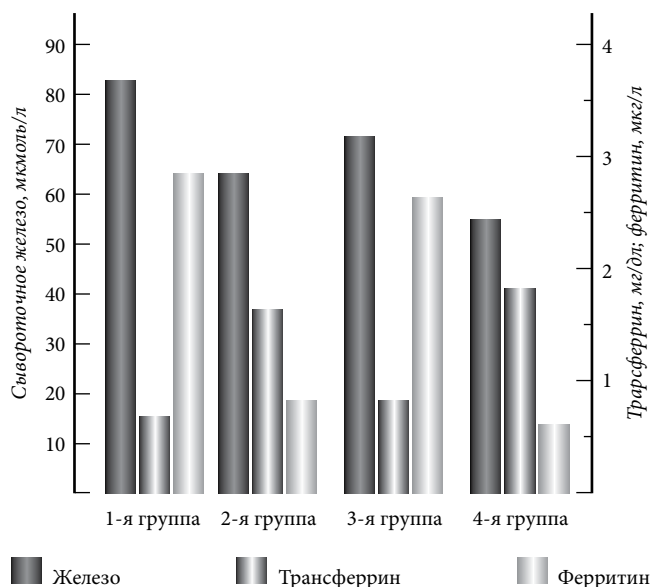


Рис. 1. Концентрация железа, трансферрина и ферритина в сыворотке крови животных в период реперфузии.

методом на автоматическом биохимическом анализаторе «Konelab-20», используя реактивы фирмы SENTINEL (Италия), ферритина – с помощью иммуноферментного теста UBIMAGIWELFerritin (Франция) и фактора Виллебранда – иммуноферментным методом с использованием набора реактивов TechnocloneGmbH (Австрия). У животных каждой группы в период реперфузии с помощью интегральной реографии (реоплетизмограф РПГ2-02, Россия) рассчитывали показатели сердечного индекса (СИ, мл/м²) и общего периферического сосудистого сопротивления (ОПСС, дин/сек/см²). Вязкость крови определяли на программируемом вискозиметре BrookfieldDV-II+Pro при разных скоростях сдвига. Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием параметрических и непараметрических критериев (Манна–Уитни), пакета прикладных программ Biostat и MSExcel.

Результаты исследования. Рост концентрации сывороточного железа в 1-й и 3-й группах составил более 30 %. При этом концентрация трансферрина в указанных группах уменьшилась до 56 и 54 % соответственно. Во 2-й группе, животным которой предварительно вводился дефероксамин, выявлено достоверное снижение по сравнению 1-й и 3-й группами концентрации сывороточного железа и, одновременно, увеличение уровня трансферрина практически до нормальных значений. Концентрация ферритина, который является основным депо микроэлемента в организме млекопитающих [10], также изменялась. В период реперфузии в 1-й и 3-й группах отмечено увеличение содержания ферритина более чем в 4 раза по сравнению с контролем. И, напротив, при предварительном введении дефероксамина содержание ферритина оказалось более низким, превышая контроль всего на 23 % (рис. 1).

Однако увеличение концентрации ферритина, как и любой защитный механизм в организме, приводит

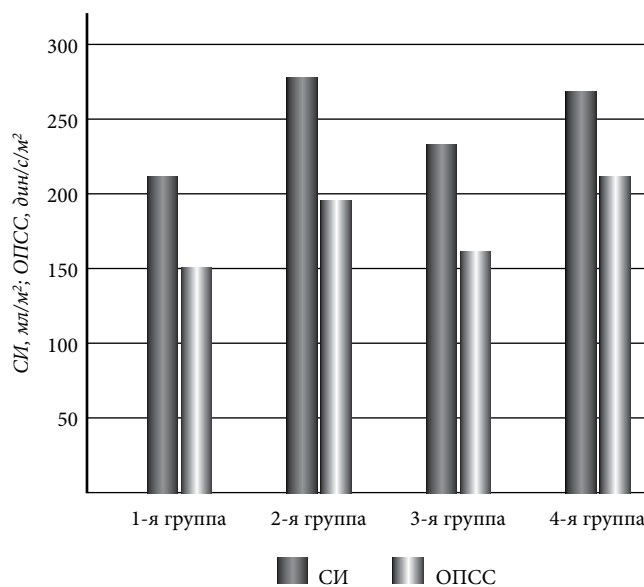


Рис. 2. Показатели системной гемодинамики у экспериментальных животных в период реперфузии.

к недостаточности физиологической функции белка и формированию патофизиологической направленности. С увеличением количества ферритина возрастает и его вазодилатирующий эффект [6, 8, 10]. Так, во 2-й группе имелась лишь тенденция к снижению ОПСС (всего на 7 % в сравнении с группой контроля), а СИ был незначительно выше контрольных значений. Напротив, в 1-й группе отмечалось достоверное по сравнению с контролем снижение этих показателей: СИ – на 20 %, ОПСС – на 27 %, что практически не отличалось от данных, полученных в 3-й плацебо-группе (рис. 2).

При исследовании параметров вязкости крови в период реперфузии также были получены интересные данные. Как известно, любое критическое состояние сопровождается централизацией кровообращения и нарушением реологических свойств крови за счет относительной или абсолютной гиповолемии [1, 7, 12]. У животных 1-й и 3-й групп вязкость крови снижалась при высоких скоростях сдвига (отражает кровоток в крупных сосудах). Так, при скоростях сдвига 150 с⁻¹, 100 с⁻¹ и 50 с⁻¹ параметры вязкости уменьшались по сравнению с контролем на 12, 40 и 30 %, а при низкой скорости сдвига (20 с⁻¹) они возрастали по сравнению с контролем на 25 %. Это свидетельствует о нарушениях, происходящих на уровне сосудов системы микроциркуляции за счет гемоконцентрации [6] и, возможно, за счет механического повреждения эндотелия капилляров увеличенными в размерах эритроцитами.

Учитывая, что эндотелиальная дисфункция относится к свободно-радикальной патологии, а активатором СРО являются ионы свободного железа [3, 4], то использование дефероксамина, как хелатора железа, представилось нам патогенетически обоснованным.

Увеличение концентрации фактора Виллебранда – характерного маркера эндотелиальной дисфункции в период экспериментальной 15-минутной ишемии

и последующей 15-минутной реперфузии в 1-й и 3-й группах животных превышало данные контроля в 46 и в 40 раз соответственно, что указывало на выраженные повреждения эндотелия. Введение до ишемии/реперфузии дефероксамина способствовало достоверному снижению уровня фактора Виллебранда, который превышал контрольные значения только в 7 раз, что указывает на факт участия ионов железа в патогенезе эндотелиальной дисфункции.

Обсуждение полученных данных. Можно констатировать, что концентрация сывороточного железа никак не связана с концентрациями трансферрина и ферритина, ответственных за связывание и утилизацию железа [10]. Это подтверждается одинаковым снижением концентраций трансферрина в 1-й и 3-й группах на фоне высокого уровня в плазме крови сывороточного железа. Логично предположить, что в обеих ситуациях имеет место трансферриновая недостаточность, которая не может быть обусловлена недостаточной белковообразующей функцией печени, а связана с повышенной тратой трансферрина на связывание свободного железа. Вероятность второго варианта развития трансферриновой недостаточности у экспериментальных животных подтверждалась тем, что при одинаковой модели реперфузии только у животных 2-й группы (где предварительно вводился дефероксамин) отмечалось достоверное увеличение концентрации трансферрина практически до нормы. Подобного не было отмечено в группах животных, где предварительно вводили плацебо и выполнялся «чистый» эксперимент.

Концентрация ферритина в сыворотке крови, как известно, характеризует объем депонированного железа [10]. При истинном дефиците железа характерен низкий уровень ферритина, что свидетельствует об абсолютном уменьшении пула железа в организме [10, 11]. При воспалительных процессах, напротив, значения ферритина нормальные или повышены [11]. В ряде исследований высказывалось мнение о том, что в условиях воспаления уровень ферритина повышается, но при этом концентрация железа и трансферрина в сыворотке крови снижаются, так как ретикулоэндотелиальные клетки используют для продукции ферритина железо, высвобождающееся из транспортных белков, и в первую очередь из белков с неустойчивой связью, например, альбумина, который олицетворяет связанное железо [10]. Увеличение при реперфузии концентрации ферритина в 4 раза, по нашему мнению, является следствием гипоксии и ацидоза на фоне гипоперфузии кишечника. Именно в этих условиях ферритин меняет свою валентность ($\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$) и может связывать свободное железо вместо трансферрина [6, 10]. Вполне возможно, что выход ферритина в системный кровоток является защитным механизмом (при трансферриновой недостаточности), так как ферритин – это универсальная форма депонирования железа (одна его молекула способна удерживать до

4500 атомов железа), а концентрация ферритина 1 нг/мл (мкг/л) эквивалентна 8 мг (143 мкмоль) железа в организме [10, 11]. По нашему мнению, именно ферритин в период реперфузии обуславливает снижение сердечного индекса, что отражается на общем сосудистом сопротивлении и на системной гемодинамике. Высокие концентрации ферритина и его негативное влияние на показатели системной гемодинамики были выявлены нами ранее у пациентов с панкреонекрозом [8]. К этому следует добавить, что период ишемии и последующей реперфузии, как следует из данных литературы, всегда сопровождается активацией СРО, и артериальная гипотензия во многом обусловлена синтезом пероксинитрита, который также является мощным вазодилататором [14, 15].

В исследованиях, направленных на раскрытие механизмов повреждения и поиска возможной профилактики микроциркуляторных нарушений при критических состояниях, авторы обходят стороной вполне логичную ситуацию: начало микроциркуляторных нарушений и синтез эндотелием многочисленных «повреждающих» факторов происходит по механизму причинно-следственной связи, т.е. в ответ на какое-то «первичное» раздражение эндотелия. На наш взгляд, все начинается с реализации защитного фактора – централизации кровообращения в ответ на различные чрезмерные стрессовые факторы (травма, кровопотеря, сепсис и т.д.), как следствия выхода в кровоток эндогенных катехоламинов в ответ на сигнал от баро- и хеморецепторов. Спазм артериол и прекапилляров способствует не только временному увеличению объема циркулирующей крови и поддержанию кровотока в жизненно важных органах (головной мозг, сердце), но и к гипоперфузии других органов и тканей и, следовательно, к локальной гипоксии и локальному ацидозу [3, 5, 14, 15]. Все вместе взятое (в первую очередь ацидоз) создает агрессивную среду для эритроцитов, которая способствует повреждению их мембраны, проникновению воды и натрия в клетку, увеличению размера эритроцитов, внутрисосудистому гемолизу и дальнейшему метаболизму гемоглобина до свободного железа (Fe^{2+}) [2, 10]. Вполне возможно, что механическое раздражение эндотелия увеличенными эритроцитами и продуктами его гемолиза приводит к синтезу супероксидного радикала, который в присутствии Fe^{2+} «включает» реакцию Хабера–Вайса с продукцией более токсичного гидроксильного радикала, дающего начало разветвлению цепи СРО и перекисного окисления липидов [3, 13]. В исследовании Е.П. Ткач и др. [9], отмечено, что супероксиддисмутаза, как один из основных ферментов антиоксидантной системы на уровне тканей кишечника, не компенсировала в достаточном объеме увеличения генерации супероксидного радикала в тканях. При этом образуется порочный круг – интенсификация процессов перекисного окисления липидов на фоне снижения активности ферментов

антирадикальной защиты приводит к прогрессированию и новым проявлениям СРО.

Подтверждение нашей гипотезы реализовалось следующим образом. У животных 2-й группы после предварительного введения дефероксамина регистрировались параметры вязкости крови, практически соответствовавшие данным контроля при различных скоростях сдвига, что свидетельствовало об отсутствии как реологических расстройств, так и влияния этих нарушений на функции центральной гемодинамики. Напротив, у животных, где выполнялся «чистый» эксперимент, и у животных, получавших плацебо, показатели вязкости крови достоверно отличались от данных 2-й группы. Данное обстоятельство позволяет предположить патогенетическую значимость свободного железа в механизмах нарушения микроциркуляции при критических состояниях различной этиологии, если учесть факт связывания дефероксатином только свободного железа [11].

Таким образом, результаты проведенных экспериментов подтверждают участие нарушений обмена железа в патогенезе расстройств микроциркуляции при критических состояниях. Микрогемоциркуляторные расстройства в условиях эндотелиальной дисфункции и снижения параметров центральной гемодинамики являются следствием гиперферритинемии и трансферриновой недостаточности, что свидетельствует о наличии в сыворотке крови высоких концентраций свободных ионов железа. Накопление Fe^{2+} с последующей инициацией СРО приводит к образованию активных форм кислорода и повреждению радикалами мембран эндотелиальных клеток, что подтверждается высокой концентрацией фактора Виллебранда в сыворотке крови экспериментальных животных. Участие ионов свободного железа в патогенезе эндотелиальной дисфункции, развивающейся в период ишемии/реперфузии, подтверждается положительным эффектом от введения дефероксамина – препарата, который, связывает избыток ионов высокоактивного в восстановительно-окислительном отношении металла. Полученные в ходе экспериментов данные открывают широкие перспективы для профилактики реперфузионного синдрома, что на сегодняшний день является одной из основных задач медицины критических состояний.

References

1. Bagnenko S.F., Lapshin V.N., Shah B.N. The principles of diagnosis and correction of hemodynamics for patients with concomitant trauma in the acute period of traumatic disease - the basis of hypoxic prophylactic and reperfusion injury, *Eferentnaja terapija*. 2004. Vol. 10, No. 3. P. 60–68.
2. Vasil'eva E.M. The biochemical characteristics of erythrocytes. The influence of pathology, *Biomedicinskaja himija*. 2005. Vol. 51, No. 2. P. 118–126.
3. Zinchuk V.V., Hodosovskij M.N., Dremza I.K. The blood oxygen function and prooxidant-antioxidant status during of the liver reperfusion, *Pat. fiziologija i jeksperim. terapija*. 2002. No. 4. P. 8–11.
4. Kashibadze K.N., Nakashidze I.M. The oxidant-antioxidant

processes in the materials in ischemic and reperfusion injury of the small intestine, *Pat. fiziologija i jeksperim. terapija*. 2009. No. 2. P. 19–22.

5. Lajpanov H.I.–H.M., Petrosjan Je.A., Sergienko V.I. The morphological changes of lungs in the modeling of acute ischemia syndrome and reperfusion limb in the experiment, *Bjul. eksperim. biologii i mediciny*. 2006. Vol. 142, No. 7. P. 118–120.
6. Mchedlishvili G.I. Hemorheology in the microcirculation: its specificity and practical significance, *Tromboz, gemostaz i reologija*. 2002. Vol. 4, No. 12. P. 18–24.
7. Nakashidze I., Chikovani T., Sanikidze V., Bahutvshvili V. The manifestations of oxidative stress and its correction in traumatic shock, *Anesteziol. i reanimatol*. 2003. No. 5. P. 22–24.
8. Orlov Ju.P., Ershov A.V. Inhibition of lipid peroxidation process by using desferal in experimental pancreatitis, *Obwaja reanimatologija*. 2007. Vol. III, No. 4. P. 106–109.
9. Tkach E.P., Voevidka O.S. The activity of superoxide dismutase in patients with the intestine chronic ischemia, *Rossijskij zhurnal gastrojenterologii, gepatologii i koloproktologii*. 1998. Vol. 8, No. 5. P. 114.
10. Beaumont C., Vaulont S. Iron homeostasis. Disorders of iron homeostasis, erythrocytes, erythropoiesis, *Eur. Sc. Hematologes*. 2006. № 33. P. 393–405.
11. Brittenham G.M. Iron chelators and iron toxicity, *Alcohol*. 2003. Vol. 10, No. 12. P. 1021–1034.
12. Ceppa E.P., Fuh K.C., Bulkley G.B. Mesenteric hemodynamic response to circulatory shock, *Curr. Opin. Crit. Care*. 2003. Vol. 9, No. 2. P. 127–132.
13. Huang F.R., Xi G., Keer R.F.J. Brain edema after experimental intracerebral hemorrhage: role of hemoglobin degradation products, *Neurosurg*. 2002. Vol. 96. P. 287–293.
14. Khanna A. Intestinal and hemodynamic impairment following mesenteric ischemia-reperfusion, *J. Surg. Res*. 2001. Vol. 99, No. 1. P. 114–117.
15. Yang J.C. Multiple organ injury at early stage of intestinal and hepatic ischemia-reperfusion in rats, *Di. Yi. Jun. Xue. Xue. Bac*. 2004. Vol. 24, No. 2. P. 198–200.

Поступила в редакцию 25.02.2012.

DEFEROXAMINE IN THE PREVENTION OF ENDOTHELIAL REPERFUSION INJURIES IN CASE OF EXPERIMENTAL ISCHEMIA/REPERFUSION

Yu.P. Orlov¹, V.N. Lukach¹, V.T. Dolgikh¹, E.L. Soboleva², A.M. Ivanova¹, E.F. Kozhevnikova¹

¹ Omsk State Medical Academy (12 Lenina St. Omsk 644043 Russia),

² Irkutsk Oblast Clinical Hospital (100 Yubileyniy Distr. Irkutsk 664079 Russia)

Summary – 15-minute ischemia and 15-minute intestinal reperfusion have been simulated to analyse the pathogenetic importance of the impaired iron exchange in forming endothelial dysfunction during the reperfusion in the experiment on 40 'Vistar' male rats. The authors studied the central hemodynamics indices, blood viscosity, content of transferrin, ferritin, serum iron and von Willebrand factor, and revealed that during the reperfusion the transferrin content decreased, the ferritin content and the von Willebrand factor increased, and there were disturbances in the rheological properties of blood with the tendency towards the decrease in the cardiac index and total peripheral vascular resistance. The preliminary infusion of deferoxamine allowed recovery of the transferrin content, decrease of the ferritin level, normalisation of the blood rheology and hemodynamics indices. This appeared to result in the reduction of the endothelial destruction due to reducing content of Fe^{2+} in blood serum. As a conclusion, the preliminary infusion of deferoxamine allows efficiently prevent the endothelium injuries during the reperfusion under critical conditions.

Key words: transferrin, ferritin, endothelial dysfunction, deferoxamine.

Pacific Medical Journal, 2012, No. 3, p. 54–57.