

УДК 616-001.19-085:577.175.823

**ОЦЕНКА ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ
СЕРТОНИНА АДИПИНАТА, ОПИОИДНОГО ПЕПТИДА DSLET И ИХ КОМБИНАЦИИ
ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ КОНТАКТНОМ ОТМОРОЖЕНИИ
НА ФОНЕ АКТИВНОЙ ХИРУРГИЧЕСКОЙ ТАКТИКИ**

© *Чигунадзе А.Л., Артюшкова Е.Б., Мишустин В.Н., Горяинова Г.Н., Артюшкова Е.В.,
Гладченко М.П., Уханова И.Ю., Заугольникова Н.С.*

Курский государственный медицинский университет, Курск

E-mail: eartyushkova@mail.ru

Применение активной хирургической тактики (некрэктомия) в сочетании с комбинацией серотонина адипината 4,5 мг/кг и опиоидного пептида DSLET 10 мкг/кг способствует снижению выраженности и распространенности альтеративных изменений, ускорению формирования грануляционного вала, более интенсивному развитию репаративных процессов при моделировании холодовой травмы в сравнении с монотерапией. Наиболее эффективная коррекция контактного отморожения отмечена в сочетании некрэктомии и комбинации серотонина адипината и опиоидного пептида DSLET, что подтверждалось коррекцией показателей малонового диальдегида, супероксиддисмутазы, конечных стабильных метаболитов оксида азота, общей антиокислительной активности и каталазы к значениям интактных животных на 14-е сутки эксперимента и снижением уровня провоспалительных цитокинов (ИЛ-6, ФНО α) в 2 раза ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой.

Ключевые слова: контактное отморожение, активная хирургическая тактика, морфологическое исследование, провоспалительные цитокины, оксидантно-антиоксидантный статус.

**STUDY OF INFLUENCE OF SEROTONIN ADIPATE, DSLET AND THEIR COMBINED
ADMINISTRATION AGAINST THE BACKGROUND OF ACTIVE SURGICAL TACTICS
IN EXPERIMENTAL CONTACT FROSTBITE**

*Chigunadze A.L., Artyushkova E.B., Mishustin V.N., Goryainova G.N., Artyushkova E.V.,
Gladchenko M.P., Ukhanova I.Yu., Zaugolnikova N.S.*

Kursk State Medical University, Kursk

Active surgical tactics (necrectomy) with the combination of serotonin adipate 4.5 mg/kg and DSLET 10 mcg/kg reduces the severity and extent of alterations; contributes to faster formation of granulation bank, and more intensive reparative processes in simulating cold injury. The most effective correction of contact frostbite was detected in conjunction of necrectomy and combinations of serotonin adipate and DSLET, as evidenced by the correction of such indicators as malondialdehyde, superoxide dismutase, the final stable nitric oxide metabolites, total antioxidant activity and catalase up to the values of intact animals on the 14th day of the experiment and halved levels of proinflammatory cytokines (IL-6, TNF- α) ($p < 0.05$) compared with the control group.

Keywords: contact frostbite, active surgical approach, morphological study, pro-inflammatory cytokines, oxidant-antioxidant status.

Несмотря на существующие достижения в области хирургии, лечение отморожений на современном этапе остается открытой проблемой. С появлением новых антибактериальных и дезинтоксикационных средств удалось существенно снизить тяжесть явлений интоксикации у пострадавших с глубокими отморожениями, но при этом количество ампутаций остается высоким [13].

Отморожения представляют собой спектр повреждений от необратимого разрушения до обратимых изменений клеток, наблюдаемых после согревания. Эти изменения включают увеличение отека тканей, сосудистого стаза и распространяющегося тромбоза, ведущего к развитию микроциркуляторного коллапса и дальнейшего некроза ткани [3].

До сих пор остаются спорными вопросы определения степени и прогнозирования исхода

отморожения в разные периоды травмы, при этом изучение интенсивности процессов перекисного окисления липидов и состояние основного его регулятора – антиоксидантной системы – при воздействии холода на организм человека и животных, нуждаются в углубленном изучении [9, 17].

Сопоставление динамики морфологической картины на макро- и микроскопическом уровнях также актуально для определения адекватных сроков и тактики лечения холодовой травмы [2].

Несмотря на широкое применение лекарственной терапии при отморожениях, использование селективного агониста дельта опиоидных рецепторов DSLET и серотонинергического средства – серотонина адипината позволит раскрыть перспективу их целенаправленного использова-

ния в качестве дополнения к существующим методам лечения холодовой травмы [14, 18].

Цель исследования: улучшение результатов лечения контактного отморожения путем оптимизации хирургической тактики в комбинации с серотонином адипинатом и DSLET у экспериментальных животных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование выполнено на половозрелых крысах-самцах линии «Wistar», массой тела 250 г. Операции и все манипуляции с крысами проводились в условиях общего обезболивания путем внутривентриального введения хлоралгидрата в дозе 300 мг/кг [1].

У крыс контрольной серии после наступления наркотического сна моделировали отморожение по методу В.В. Бойко, 2010 г. [2].

На 3 сутки после моделирования отморожения под наркозом хлоралгидратом острым путем производили некрэктомию.

Крысы опытных групп получали: монотерапию DSLET в дозе 10 мкг/кг, монотерапию серотонина адипинат в дозе 4,5 мг/кг и комбинированное лечение DSLET в дозе 10 мкг/кг внутривентриально и серотонина адипинат в дозе 4,5 мг/кг внутривентриально после моделирования отморожения на первые, третьи, пятые и седьмые сутки после холодовой травмы.

Изучение биохимических показателей выполнялось во всех исследуемых группах: интактной, контрольной группе, опытных группах на 7-е и 14-е сутки.

Выраженность воспалительных процессов оценивали по количественному содержанию интерлейкина-6 (ИЛ-6) и фактора некроза опухоли альфа (ФНО α), которые определяли с помощью наборов для иммуноферментного анализа для крыс («Rat TNF- α Platinum ELISA» и «Rat IL-6 Platinum ELISA» фирмы «eBioscience», Австрия).

Достоверность наблюдавшихся при действии исследованных препаратов изменений параметров как абсолютных, так и в процентах от исходного уровня определяли путем расчета средней арифметической (M), ошибки средней арифметической ($\pm m$) и оценки достоверности различий сравниваемых параметров между группами с использованием функции t-test для групп с разными дисперсиями из программного пакета Microsoft Excel 2010. Для оценки летальности (выживаемости) использовался F-критерий Кокса при анализе данных выживаемости с помощью программы СТАТИСТИКА 8. Достоверными считались различия сравниваемых параметров при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В сыворотке крови нелеченых животных с контактным отморожением после проведения некрэктомии отмечается достоверное повышение концентрации МДА, снижение уровня каталазы и ОАА на 7-е и 14-е сутки, снижение активности СОД на 7-е сутки, а также снижение концентрации NOx на 7-е и 14-е сутки эксперимента.

Нами также установлено, что в контрольной группе на всех сроках исследования отмечалось достоверное повышение провоспалительных цитокинов, при этом максимальный подъем наблюдался на 7-е сутки эксперимента: ФНО α был выше в 3,2 раза, ИЛ-6 – в 2,66 раза по сравнению с группой интактных животных.

После проведения некрэктомии и введения серотонина адипината в сыворотке крови животных отмечается снижение концентрации МДА на 7-е сутки эксперимента с нормализацией его уровня к 14-м суткам, достоверное повышение каталазы и ОАА на 7-е сутки по сравнению с контрольной группой и последующим его повышением до уровня интактных крыс к 14-м суткам, достоверное увеличение активности СОД до уровня интактных животных на 7-е и 14-е сутки, а также повышение концентрации NOx к 14-м суткам эксперимента относительно контрольной группы.

После проведения некрэктомии и введения DSLET отмечается статистически достоверная нормализация до уровня интактных крыс концентрации МДА на всех сроках исследования, достоверное повышение каталазы, ОАА и концентрации NOx на 7-е сутки по сравнению с контрольной группой и последующим их повышением до уровня интактных животных к 14-м суткам, а также достоверное увеличение активности СОД до уровня интактных животных 7-е и 14-е сутки эксперимента.

После проведения некрэктомии в сыворотке крови животных, получавших терапию серотонином адипинатом и DSLET, обращает на себя внимание более выраженный по сравнению с монотерапией результат сочетания активной хирургической тактики и комбинированного фармакологического лечения для показателей: МДА, каталазы, СОД и ОАА, уровень которых, начиная с 7-х суток и до конца эксперимента, был сопоставим со значениями интактных животных. Также отмечалось достоверное повышение концентрации NOx на 7-е сутки относительно контрольной группы и достижение уровня интактных животных на 14-е сутки исследования.

Большое значение в патогенезе холодовой травмы имеет не только оксидантно-антиоксидантный, но и цитокиновый статус, являющийся причиной локальных и системных изменений, обнаруживаемых при развитии острого воспалительного ответа, что подтверждается достоверным повышением уровня ИЛ-6 (рис. 1) и ФНО α (рис. 2) в сыворотке крови экспериментальных животных контрольной группы.

Активная хирургическая тактика (некрэктомия) в сочетании с монотерапией исследуемыми

препаратами и комбинированным лечением приводила к статистически достоверному снижению уровня ИЛ-6 относительно контрольной группы на протяжении всего эксперимента, при этом обращает на себя внимание то, что на фоне монотерапии серотонина адипинатом и комбинированной терапии уровень ИЛ-6 снижался до значений интактных животных как на 7-е, так и на 14-е сутки эксперимента (рис. 1).

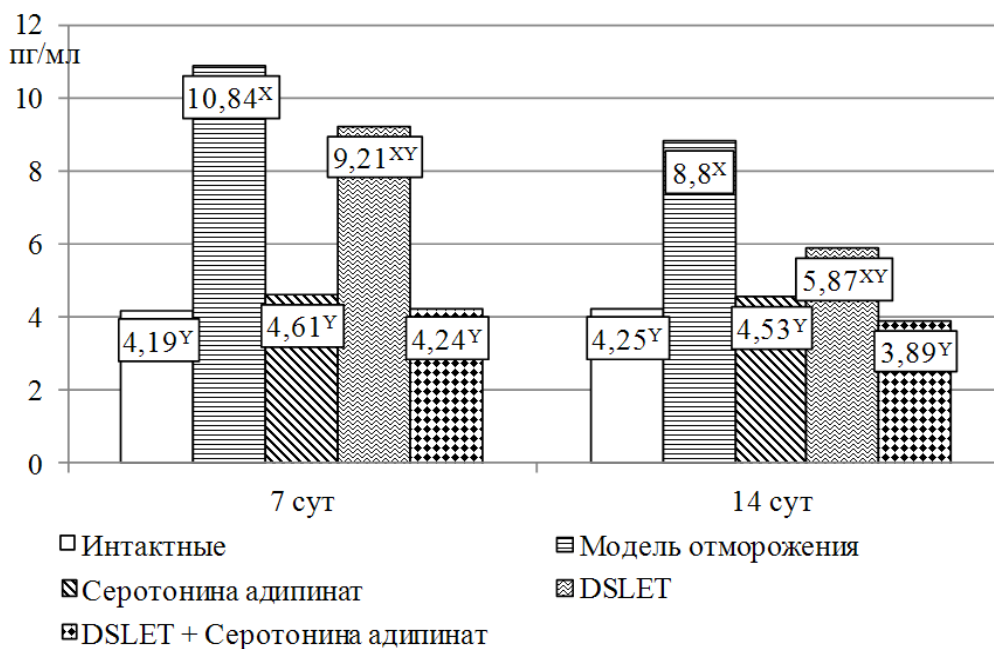


Рис. 1. Оценка уровня ИЛ-6 в крови экспериментальных животных в опытных группах в сравнении с контрольной группой и интактными животными (X – при $p < 0,05$ в сравнении с интактной группой; Y – при $p < 0,05$ в сравнении с контрольной группой).

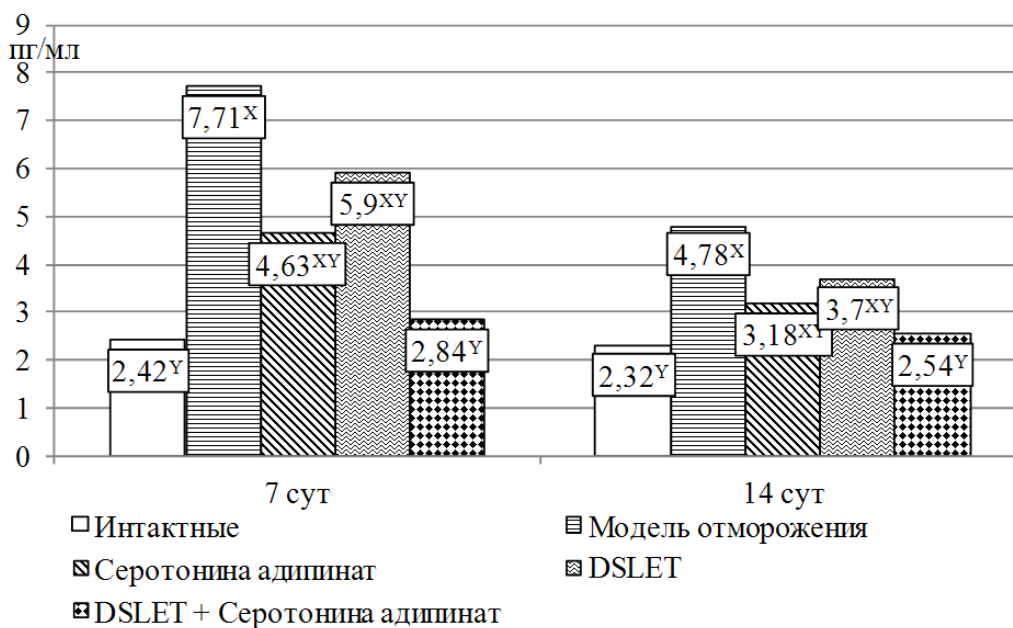


Рис. 2. Оценка уровня ФНО α в крови экспериментальных животных в опытных группах в сравнении с контрольной группой и интактными животными (X – при $p < 0,05$ в сравнении с интактной группой; Y – при $p < 0,05$ в сравнении с контрольной группой).

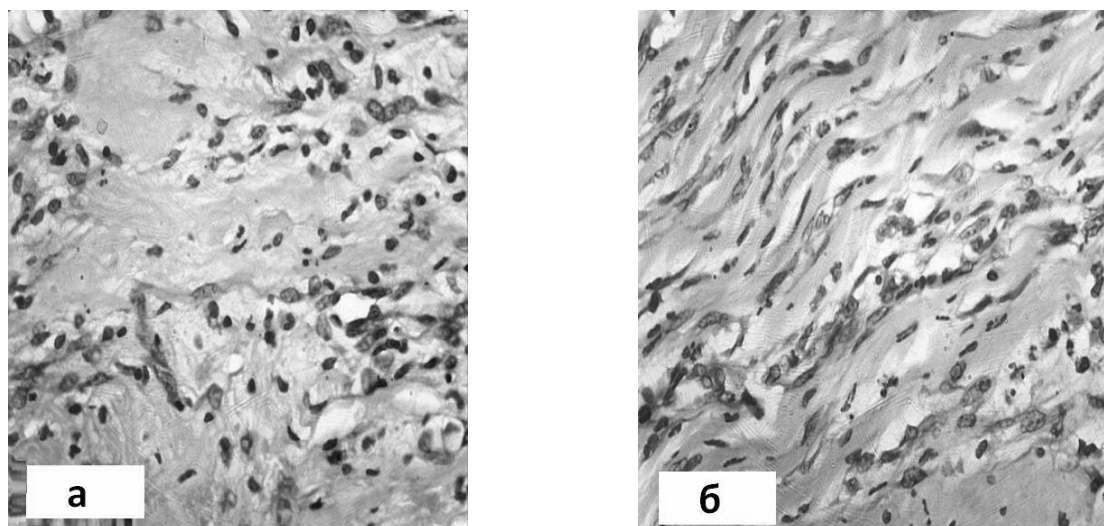


Рис. 3. Морфологические изменения тканей в области повреждения после некрэктомии на фоне применения комбинации серотонина адипината и DSLET при экспериментальном контактном отморожении.

Примечание: а – скопления соединительнотканых волокон в молодой соединительной ткани в области повреждения, 7-е сутки. Гематоксилин-эозин. Ув. $\times 400$.; б – соединительная ткань в формирующемся рубце в области повреждения, 14-е сутки. Гематоксилин-эозин. Ув. $\times 400$.

При оценке ФНО α было получено, что монотерапия (серотонина адипинатом, DSLET) и комбинированное лечение приводили к статистически достоверному снижению данного показателя по сравнению с контрольной группой. В отличие от ИЛ-6 снижение уровня ФНО α до значений интактных животных наблюдалось лишь при активной хирургической тактике на фоне комбинированного лечения (рис. 2).

Таким образом, было установлено благоприятное влияние комбинированного лечения животных с контактном отморожением серотонинергическим средством серотонина адипинатом и опиоидным пептидом DSLET в сочетании с некрэктомией на показатели ИЛ-6 и ФНО α .

При морфологическом исследовании в контрольной группе с активной хирургической тактикой макроскопически обнаруживаются к 7-м суткам формирование демаркационной зоны вокруг некротизированных тканей и струпа в области повреждения. К 7-м суткам появляются отдельные очаги развития молодой соединительной ткани, лишь к 14-м суткам зона некроза окружена грануляционной тканью, созревание ее замедлено.

После некрэктомии на фоне применения серотонина адипината на 3-и сутки обнаруживаются мелкие участки некроза мышечной и жировой ткани в краях операционной раны, окруженные тонким слоем нейтрофилов, кнаружи от которого формируются очаги грануляционной ткани. В пограничной области выявляются воспалительные клеточные инфильтраты, лейкостаз. К 7-м суткам очаги некроза окружены плотным скоплением нейтрофилов (демаркационная зона) и слоем грануляционной ткани, в которой появляются воло-

нистые структуры. Грануляционная ткань рыхло связана с окружающими тканями. В новообразованных сосудах выявляются форменные элементы крови. К 14-м суткам грануляционная ткань полностью выполняет область повреждения.

После некрэктомии на фоне использования опиоидного пептида DSLET на 3-и сутки (непосредственно после некрэктомии) микроскопическое исследование обнаруживает выраженную зону демаркации, отграничивающую операционную рану, кнаружи окруженную тонким слоем рыхлой грануляционной ткани, в которой формируются соединительнотканые волокна, сосуды в виде пакетов. К 7-м суткам слой молодой соединительной ткани утолщается, пучки грануляций вырастают вглубь некротических масс. Просветы новообразованных сосудов содержат форменные элементы крови. Через 2 недели рана выполнена грануляционной тканью, богатой волокнистыми структурами, плотно связанной с окружающими тканями.

После некрэктомии на фоне использования комбинации препаратов серотонина адипината и DSLET макроскопически четко определяется зона демаркации на 3-и сутки, в связи с чем, возможно провести адекватную некрэктомию в пределах границ некроза. При микроскопическом исследовании на 3-и сутки некротические массы отсутствуют, имеются небольшие воспалительные клеточные инфильтраты. В краях раны формируется грануляционная ткань. К 7-м суткам слой грануляций утолщается, накапливаются плотные соединительнотканые волокна (рис. 3-а), к 14-м суткам формируется зрелая волокнистая соединительная ткань (рис. 3-б).

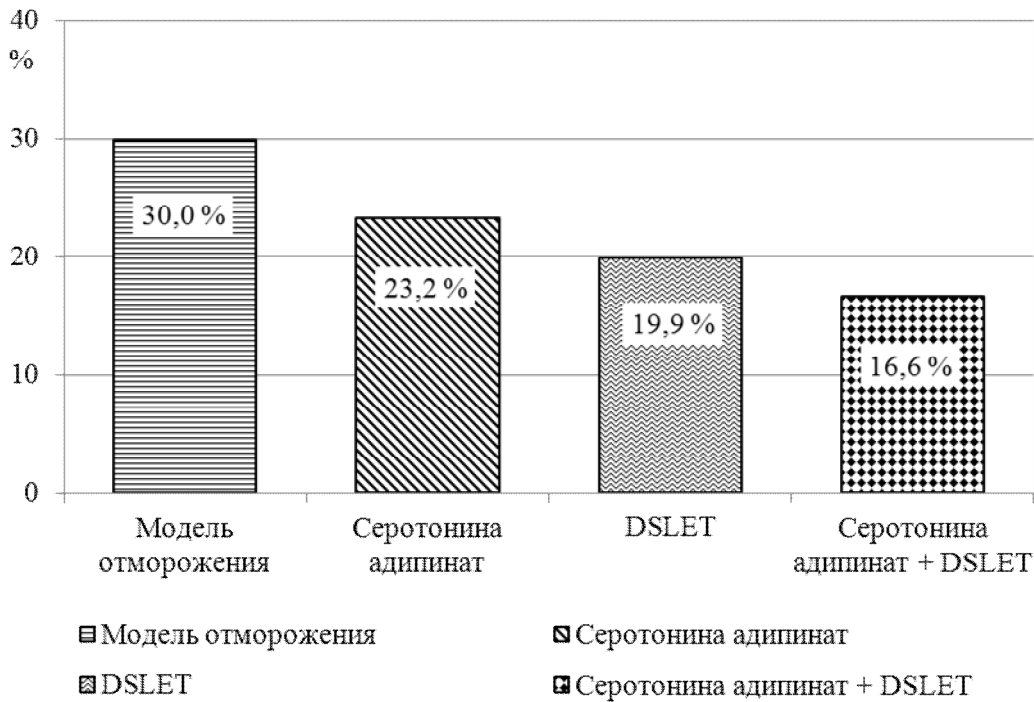


Рис. 4. Летальность экспериментальных животных на фоне лечения серотонина адипинатом 4,5 мг/кг, DSLET 10 мкг/кг и их комбинацией в сочетании с некрэктомией на 14-е сутки моделирования контактного отморожения.

Таким образом, активная хирургическая тактика (некрэктомия) в сочетании с комбинацией серотонина адипината 4,5 мг/кг и DSLET 10 мкг/кг способствует снижению выраженности и распространённости альтеративных изменений, ускорению формирования грануляционного вала, более интенсивному развитию репаративных процессов при моделировании холодовой травмы.

Одним из основных и наиболее информативных критериев, характеризующих эффективность лечения, является оценка уровня летальности в ходе эксперимента. Нами был проведен анализ данного показателя во всех исследуемых группах животных.

Некрэктомия в сочетании с комбинированным лечением исследуемыми препаратами приводила к максимальному снижению летальности до 16,6%, что на 6,6% и 3,3% ниже по сравнению с монотерапией серотонина адипинатом и DSLET, соответственно (рис. 4).

Анализируя литературные данные и результаты собственных исследований можно заключить, что воздействие низких температур приводит к функциональным, биохимическим и морфологическим изменениям в тканях в месте отморожения, холодовое повреждение инициирует изменения состояния микроциркуляции и компонентов регуляции сосудистого тонуса, которые в последующем приводят к дистрофическим процессам.

Таким образом, практический интерес могут представлять исследования, направленные на поиск наиболее оптимальных дополнительных мер

коррекции контактного отморожения, способных уменьшать выраженность некротических изменений.

По данным литературы, в настоящее время актуальной является перспектива использования синтетических опиоидных пептидов, которые обладают уникальной совокупностью физиологических свойств. Являясь ведущим компонентом антистрессорной системы организма, опиоидные пептиды не только подавляют продукцию стрессорных гормонов (АКТГ, кортизола, катехоламинов), но и проявляют иммуномодуляторные свойства [5, 10], влияют на рост сосудов и костномозговую ткань [6].

В то же время доказаны многочисленные точки приложения серотонина адипината: под его воздействием происходит стимулирующее действие на гладкую мускулатуру сосудов, снижается интенсивность свободнорадикального окисления, увеличивается стойкость капилляров [7, 12], нормализуется функция нейтрофилов при различной патологии [4]. В литературе также известно, что состояние микроциркуляции зависит от характера работы и чувствительности гладкой мускулатуры сосудов, контролирующей их способность к дилатации и констрикции, при этом поддержание базального тонуса гладкой мускулатуры сосудов и его повышение обусловлены серотонином [4].

В последние годы развивается новое направление отечественной медицины – NO-терапия, основанное на использовании экзогенного оксида

азота, который является универсальным регулятором разнообразных физиологических процессов и принимает участие в различных патологических и регенераторных процессах, в том числе и в воспалении и заживлении ран. В связи с чем данные о взаимодействии опиатных рецепторов с ионными каналами, NO-синтазой и внутриклеточными мессенджерами [8] позволяют раскрывать их механизм фармакологического действия. Установлено, что расширение периферических сосудов после инъекции эндоморфинов является результатом увеличения активности NO-синтазы, а также, что сосудорасширяющее влияние морфина сопровождается увеличением синтеза оксида азота [15, 16, 19]. В экспериментах на изолированном перфузируемом сердце крысы в условиях моделирования окислительного стресса обнаружено кардиопротективное действие дельта-агонистов DSLET и DTLET, связанное с активацией NO-синтазы [11]. Таким образом, механизм действия дельта-опиоидов на клетку представляет довольно пеструю картину, которая включает снижение уровня цАМФ, увеличение продукции NO, усиление синтеза цГМФ, подъем уровня инозитолтрифосфата [8].

В этой связи несомненный интерес представляет изучение возможности дополнительной фармакологической коррекции стандартной терапии отморожений препаратами из группы опиоидных пептидов и серотонинергических средств.

Таким образом, основываясь на полученных данных, можно заключить, что активная хирургическая тактика (некрэктомия) на фоне внутрибрюшинного введения комбинации серотонина адипината (4,5 мг/кг) и DSLET (10 мкг/кг) является одним из оптимальных способов лечения контактного отморожения в эксперименте, что позволяет рекомендовать данный метод ведения контактных отморожений для дальнейшей доклинической и клинической апробации.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Артюшкова Е.В.* Эндотелио- и кардиопротективные эффекты мельдония и триметазидина при L-NAME-индуцированной эндотелиальной дисфункции в эксперименте // Курский науч.-практ. вестн. «Человек и его здоровье». – 2010. – № 3. – С. 5-10.
2. *Бойко В.В.* Изучение морфологических особенностей в тканях экспериментальных животных при моделировании холодовой травмы // Вестник морфологии. – 2010. – № 16(3). – С. 526-528.
3. *Иванов В.А., Витковский Ю.А., Михайличенко М.И., Шаповалов К.Г., Томина Е.А.* Содержание цитокинов в крови больных при местной холодовой травме // Медицинская иммунология. – 2008. – № 1. – С. 89-92.
4. *Лазаренко В.А., Симоненков А.П., Лазарев Е.В.* Лечение критической ишемии нижних конечностей с использованием серотонина // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2003. – № 2. – С. 26-30.
5. *Ляшев Ю.Д.* Влияние опиоидных пептидов DAGO и DSLET на содержание розеткообразующих клеток в селезенке при травме костей // Курский научно-практический вестник. – 2001. – № 2. – С. 36-39.
6. *Ляшев Ю.Д.* Влияние опиоидных пептидов на репаративную регенерацию костной ткани // Архив патологии. – 2002. – № 1. – С. 6-8.
7. *Ляшев Ю.Д., Князев А.И., Солин А.В.* Влияние опиоидных пептидов на процессы свободнорадикального окисления в регенерате кости после перелома // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2005. – № 1. – С. 19-20.
8. *Маслов Л.Н., Лишманов Ю.Б., Гросс Г.Дж., Шульц Дж.Э.Дж., Стефано Дж.* Активация опиатных рецепторов изменяет устойчивость сердца к ишемическим и реперфузионным повреждениям // Вестник аритмологии. – 2002. – № 28. – С. 67-78.
9. *Николаев В.М., Алексеев С.Н., Алексеев Р.З.* Перекисное окисление липидов у больных с холодовой травмой разной степени тяжести // Наука и образование. – 2006. – № 2(42). – С. 140-144.
10. *Николаев С.Б., Быстрова Н.А., Ляшев Ю.Д.* Иммунометаболические эффекты агонистов опиоидных рецепторов при экспериментальной ожоговой травме // Курский науч.-практ. вестн. «Человек и его здоровье». – 2005. – № 3. – С. 16-24.
11. *Реброва Т.Ю., Маслов Л.Н., Лишманов А.Ю., Там С.В.* Стимуляция μ - и δ -опиатных рецепторов и устойчивость изолированного сердца к окислительному стрессу: роль NO-синтазы // Биохимия. – 2001. – Т. 66, № 4. – С. 520-527.
12. *Симоненков А.П.* Современная теория старения с учетом новых данных о роли серотонина в организме человека и животных // Профилактическая медицина. – 2010. – № 4. – С. 48-53.
13. *Шуткин А.В., Коваленко А.В., Донсков В.В., Хасанов А.А.* Современные возможности хирургического лечения пациентов с глубокими холодовыми поражениями (обзор литературы) // Вестник Новгородского государственного университета. – 2010. – № 59. – С. 80-84.
14. *Amireault P., Sibon D., Côté F.* Life without peripheral serotonin: insights from tryptophan hydroxylase 1 knockout mice reveal the existence of paracrine/autocrine serotonergic networks // ACS Chem Neurosci. – 2013. – Vol. 16, Vol. 4, N 1. – P. 64-71.
15. *Champion H.C., Bivalacqua T.J., Friedman D.E., Zaidina J.E., Kastin A.J., Kadowitz P.J.* Nitric oxide release mediates vasodilator responses to endomorphin 1 but not nociceptin/OFQ in the hindquarters vascular bed of the rat // Peptides. – 1998. – Vol. 19, N 9. – P. 1595-1602.
16. *Champion H.C., Kadowitz P.J.* D-[Ala²]endomorphin 2 and endomorphin 2 have nitric oxide-dependent vasodilator activity in rats // Am J Physiol. – 1998. – Vol. 274, N 5, Pt 2. – P. 1690-1697.

17. *Imray C., Grieve A., Dhillon S.* Cold damage to the extremities: frostbite and non-freezing cold injuries // *Postgrad. Med. J.* – 2009. – Vol. 85, N 1007. – P. 481-488.
18. *Khalefa B.I., Mousa S.A., Shaqura M., Lackó E.* Peripheral antinociceptive efficacy and potency of a novel opioid compound 14-O-MeM6SU in comparison to known peptide and non-peptide opioid agonists in a rat model of inflammatory pain // *Pharmacol.* – 2013. – Vol. 713, N 1-3. – P. 54-57.
19. *Stefano G.B., Salzet M., Magazine H.I., Bilfinger T.V.* Antagonism of LPS and IFN-gamma induction of iNOS in human saphenous vein endothelium by morphine and anandamide by nitric oxide inhibition of adenylate cyclase // *J Cardiovasc Pharmacol.* – 1998. – Vol. 31, N 6. – P. 813-820.