

ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ ИНТЕНСИВНОЙ ТЕРАПИИ ОСТРОГО ПАНКРЕАТИТА

**С.Г. Анаскин,
Т.И. Григорьева,
Г.Р. Рахметуллова,
С.В. Катков,
В.П. Власова,
С.В. Тингаев,**

ФГБОУ ВПО
«Мордовский
государственный университет
им. Н.П. Огарева», г. Саранск

Анаскин
Сергей Геннадьевич –
e-mail: vap.61@yandex.ru

Установлено, что прогрессирование острого экспериментального панкреатита сопровождается мембранодестабилизирующими явлениями как со стороны органа поражения (поджелудочная железа), так и других органов пищеварительной системы (печень, кишечник). В основе высокого мембраностабилизирующего действия этоксидаола лежит его способность уменьшать интенсивность перекисного окисления липидов и фосфолипазную активность, а также снижать выраженность явлений гипоксии тканевых структур органа поражения (поджелудочной железы) и других исследованных органов пищеварительной системы.

Ключевые слова: острый панкреатит, перекисное окисление липидов, этоксидаол.

It is established that advance of an acute experimental pancreatitis is accompanied by membrane destabilizing phenomena as from an organ lesions (pancreas), and other organs of the alimentary system (a liver, an intestine). At the heart of high membrane stabilizing actions etoxidolum its ability to reduce intensity peroxidations of lipids and phospholipase activity lies, and also to reduce expression of hypoxia phenomena of fabric structures of an lesion organ (pancreas) and other investigated organs of the alimentary system.

Key words: an acute pancreatitis, перекисное oxidation of lipids, etoxidolum.

ВВЕДЕНИЕ

Тяжелым и опасным для жизни заболеванием является острый панкреатит (ОП). На территории России, как и за рубежом, в последние годы неуклонно отмечается рост больных острым панкреатитом [1, 2]. Преобладающее большинство заболевших принадлежит к активному трудоспособному населению, что придает проблеме большую социально-экономическую значимость [3]. Важное значение в патогенезе ОП имеют мембранодестабилизирующие процессы, возникающие вследствие роста перекисного окисления липидов (ПОЛ) и активации фосфолипазы А₂ (ФЛА₂) [4]. На фоне эндогенной интоксикации (ЭИ), прогрессирования процессов липопереокисления и активации липолитических ферментов происходит развитие полиорганной недостаточности [5]. Одними из первых поражению подвергаются печень и кишечник, что является весьма неблагоприятным фоном для прогрессирования ОП [6].

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

На основе динамического изучения липидного состава мембран клеточных структур различных органов оценить роль системных мембранодестабилизирующих явлений в прогрессировании острого экспериментального панкреатита; установить эффективность антиоксиданта этоксидаола в их предупреждении.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В основу работы положены экспериментальные исследования на взрослых беспородных половозрелых собаках (n=36) обоего пола массой от 9,4 до 16,3 кг, разделенных на

две группы. Первая группа – контрольная (n=18). При остром экспериментальном панкреатите исследовали выраженность ЭИ по ее гидрофильному и гидрофобному компонентам в плазме крови, активность альфа-амилазы, морфологическое состояние поджелудочной железы (ПЖ); в тканевых структурах печени, кишечника и ПЖ оценивали качественный и количественный состав липидов, интенсивность ПОЛ, активность ФЛА₂, каталазы, показатели гипоксии. Вторая группа – опытная (n=18): исследовали влияние этоксидаола на вышеуказанные компоненты гомеостаза при остром экспериментальном панкреатите.

Моделирование ОП осуществляли путем введения желчи в паренхиму вертикальной части ПЖ по 0,6 мл в 5 точек. Таким образом воспроизводили медленно прогрессирующую форму течения острого экспериментального панкреатита. Все экспериментальные исследования проводили под внутривенным наркозом, используя тиопентал натрия из расчета 0,04 г на 1 кг массы животного. В контрольные сроки (1-, 3-, 5-е сутки) осуществляли забор крови, биопсию тканей ПЖ, печени и кишечника. В послеоперационном периоде проводили инфузионную терапию (внутривенные введения 5% раствора глюкозы и 0,89% раствора хлорида натрия из расчета 50 мл на 1 кг массы животного). В опытной группе в комплексную терапию включали ежедневные внутривенные вливания 5% раствора этоксидаола из расчета 10 мг на 1 кг массы тела.

Определяли активность альфа-амилазы, используя метод ферментативного гидролиза крахмала. Регистрацию

производили на ФЭКе при длине волны 630–690 нм. Липиды из тканей экстрагировали хлороформметаноловой смесью, фракционировали методом тонкослойной хроматографии. Полярные фосфолипиды разделяли на пластинах фирмы «Merk» на стеклянной основе, нейтральные липиды – на силикагелевых пластинах для обращенно-фазной тонкослойной хроматографии. Молекулярный анализ проводили на денситометре Model GS-670 (BIO-RAD, США) с соответствующим программным обеспечением (Phosphor Analyst/PS Software). Показатели интенсивности ПОЛ: диеновые и триеновые конъюгаты определяли спектрофотометрическим методом при длине волны 232–233 и 275 нм; уровень спонтанного малонового диальдегида – спектрофотометрическим методом в реакции с тиобарбитуровой кислотой (Sigma), антиокислительную активность липидов оценивали в модельных условиях; активность супероксиддисмутазы – в реакции с нитросиним тетразолием; активность каталазы исследовали спектрофотометрическим методом, основанным на способности перекисей образовывать с молибдатом аммония стойкий окрашенный комплекс. Активность ФЛА₂ определяли по каталитической деятельности фермента потенциометрическим методом. Выраженность ЭИ оценивали по следующим показателям: содержание молекул средней массы определяли спектрофотометрическим методом на спектрофотометре СФ-46 при длинах волн 254 и 280 нм; общую и эффективную концентрацию альбумина в сыворотке крови – флуоресцентным методом на специализированном анализаторе АКЛ-01 «Зонд»; резерв связывания альбумина определяли по формуле резерв связывания альбумина=эффективная концентрация альбумина/общая концентрация альбумина; индекс токсичности плазмы – по формуле индекс токсичности=общая концентрация альбумина/эффективная концентрация альбумина – 1. Содержание пировиноградной кислоты (пирувата) определяли при проведении реакции с 2,4-динитрофенилгидразином с оценкой результата по калибровочной кривой. Уровень молочной кислоты (лактата) устанавливали по реакции с параоксидифенилом. Макроскопия проводилась при лапаротомии и релапаротомии.

ОБРАБОТКА ДАННЫХ

Полученные цифровые данные обрабатывали методом вариационной статистики с использованием критерия Стьюдента, корреляционную зависимость устанавливали по критерию r . Вычисления производили на CPU 2500 MHz «Intel Pentium-D» с помощью пакета программ Microsoft Office 2003.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Нами установлено, что модель панкреатита оказалась адекватной для решения поставленных задач. У всех животных как контрольной, так и опытной групп, развился ОП.

В динамике острого экспериментального панкреатита исследованием активности α -амилазы крови установлено, что данный показатель значительно возрастал уже на 1-е сутки после моделирования патологического процесса, превышая норму на 278,6% ($p=0,006$). На последующих этапах наблюдения (3-и и 5-е сутки) активность α -амилазы постепенно снижалась, но достоверно превышала исходный уровень на 148,3 и 61,0% соответственно ($p<0,04$).

Одним из важнейших патогенетических проявлений ОП явилось развитие ЭИ. Нами выявлено существенное повышение содержания в плазме крови гидрофильных и гидрофобных токсических продуктов.

Важную роль в прогрессировании воспалительного процесса в органе непосредственного поражения и в смежных системах играет гипоксия. Экспериментально установлено, что на всех сроках периода наблюдения показатели гипоксии в исследуемых тканях были повышены. Содержание молочной и пировиноградной кислот в ткани ПЖ было выше нормы на 39,3–117,7 и 50,0–145,8% ($p<0,04$), в ткани печени – на 84,6–138,5 и 76,2–166,7% ($p<0,03$) и в ткани кишечника – на 40,4–76,9 и 89,8–193,9% ($p<0,04$).

Процесс ПОЛ считается самым важным в инициации липидных перестроек в тканевых структурах. В процессе эксперимента выявлена интенсификация процессов ПОЛ в тканях ПЖ, печени и кишечника. Следует отметить, что нарастание уровня продуктов ПОЛ регистрировалось до третьих суток исследования.

ФЛА₂, как известно, приводит к образованию свободных жирных кислот и лизофосфолипидов, способных оказывать мембранодеструктивное действие. В данной серии экспериментов в ткани ПЖ активность ФЛА₂ превышала исходные данные в 5,5–8,0 раз ($p<0,001$), в ткани печени – в 2,1–2,7 раза ($p<0,03$) и в ткани кишечника – в 2,0–3,2 раза ($p<0,02$).

Указанные изменения сопровождались ростом активности каталазы и угнетением активности супероксиддисмутазы в исследуемых тканях.

В контрольной группе животных в клеточных структурах ПЖ выявлены следующие изменения липидного спектра: достоверное повышение уровня свободных жирных кислот на 52,5–158,2% ($p<0,04$), диацилглицеролов – на 187,4–659,1% ($p<0,01$), моноацилглицеролов – на 83,2–252,0% ($p<0,04$), триацилглицеролов – на 50,5% ($p=0,036$), лизофосфолипидов – в 5–13 раз ($p<0,001$); снижение концентрации эфиров холестерина на 39,8% ($p=0,041$), суммарных фосфолипидов – на 33,5–43,1% ($p<0,05$), фосфатидилэтаноламина – на 22,7–38,1% ($p<0,05$), фосфатидилсерина – на 24,9–58,7% ($p<0,04$). Наибольшие изменения показателей были зарегистрированы на 1–3-и сутки наблюдения. Динамика показателей липидных перестроек на фоне ОП в тканях печени и кишечника сходна с вышеописанной, но имеет меньшую выраженность.

Таким образом, при ОП на фоне интенсификации процессов ПОЛ, повышения фосфолипидной активности, нарастания явлений гипоксии в клеточных структурах исследованных органов пищеварительной системы возникают мембранодестабилизирующие явления (системный характер), которые в ряде случаев прогрессируют, приводя к необратимым морфологическим изменениям.

ТАБЛИЦА.

Показатели перекисного окисления липидов, фосфолипидной активности и гипоксии в ткани поджелудочной железы на фоне применения этоксида, $M \pm m$ (n=18)

Показатель	Группа	Исходные данные	Этапы наблюдения (от момента моделирования)		
			1-е сутки	3-е сутки	5-е сутки
ДК, усл.ед./мг липидов	I	0,39±0,016	0,87±0,045*	0,95±0,056*	1,34±0,088*
	II		0,66±0,038*	0,71±0,042*	0,74±0,043*
ТБК-активные продукты, нмоль/г белка	I	6,24±0,33	13,48±0,71*	16,26±0,95*	19,32±1,22*
	II		11,53±0,72*	11,97±0,78*	13,46±0,74*
Фосфолипаза А2, мкмоль/с/г белка	I	0,93±0,04	5,27±0,32*	6,34±0,45*	7,52±0,53*
	II		2,59±0,17*	3,07±0,19*	3,22±0,08*
Каталаза, мг H2O2/мин/г белка	I	2,41±0,13	2,76±0,15	5,24±0,33*	4,62±0,29*
	II		2,27±0,14	4,36±0,34*	3,19±0,18*
СОД, усл. ед.	I	15,26±0,74	8,37±0,45*	5,56±0,28*	9,74±0,63*
	II		9,44±0,54*	7,99±0,45*	13,95±0,77
Лактат, ммоль/г белка	I	0,328±0,017	0,594±0,031*	0,714±0,046*	0,457±0,018*
	II		0,503±0,025*	0,476±0,028*	0,374±0,021
Пируват, ммоль/г белка	I	0,024±0,0013	0,043±0,0026*	0,059±0,0032*	0,036±0,0018*
	II		0,036±0,0021*	0,041±0,0025*	0,029±0,0018*

Примечание: I – контрольная группа, II – опытная группа; ДК – диеновые конъюгаты, СОД – супероксиддисмутаза; * – достоверность отличия по отношению к исходному уровню при $p < 0,05$; **жирный шрифт** – достоверность отличия по отношению к контролю ($p < 0,05$).

Учитывая высокую патогенетическую значимость свободнорадикальных механизмов оксидативного стресса в патогенезе мембранодеструктивных явлений, с целью стабилизации липидного метаболизма нами использован новый антиоксидант – производное 3-оксипиридина этоксидол. В сравнительном аспекте следует отметить, что на фоне применения препарата морфологически воспалительный процесс был значительно менее выражен. Анализируя активность α -амилазы крови, установлено, что данный показатель достоверно отличался от контрольного: уже на первые сутки после введения этоксида он был ниже на 18,2% ($p=0,042$), а на последующих этапах наблюдения (3-и и 5-е сутки) – на 31,7 и 27,2% ($p < 0,05$) соответственно.

Анализ выраженности ЭИ на фоне применения этоксида показал уменьшение содержания токсических продуктов в крови относительно данных контрольной группы. Отмечалось повышение общей, эффективной концентрации альбумина и резерва его связывания относительно контроля на 23,2–25,2, 17,4–34,6 и 14,5% ($p < 0,05$) соответственно. Это свидетельствует о существенном положительном действии препарата. Индекс токсичности плазмы крови

снижался относительно контроля на 25,5–33,9% ($p < 0,04$). Уровень молекул средней массы ($\lambda=254$ нм и $\lambda=280$ нм) превосходил норму, но был ниже контроля на 19,6–42,6 и 24,6–37,7% ($p < 0,05$) соответственно.

Применение этоксида позволило снизить выраженность явлений гипоксии в тканевых структурах печени, кишечника и ПЖ на всех сроках исследования. Экспериментально доказано, что содержание молочной и пировиноградной кислот в ткани ПЖ было ниже контроля на 15,3–33,3 и 16,3–30,5% ($p < 0,05$), в ткани печени – на 17,9–35,5 и 13,5–37,5% ($p < 0,05$), в ткани кишечника – на 16,4–22,6 и 18,3–36,7% ($p < 0,05$) (таблица).

Терапия с включением этоксида способствовала значительному снижению интенсивности процессов ПОЛ и фосфолипидной активности в ткани ПЖ. Было зафиксировано достоверное уменьшение концентрации первичных и вторичных продуктов ПОЛ на 24,1–44,8% ($p < 0,05$), снижение активности ФЛА2 на 50,9–59,2% ($p < 0,03$). Активность супероксиддисмутазы увеличилась на 22,1–43,0% ($p < 0,039$). В тканях печени и кишечника отмечены сходные изменения. Препарат начинал проявлять положительное действие уже с 1-х суток терапии.

Применение этоксида отразилось на липидном спектре тканевых структур ПЖ. Выявлено снижение по сравнению с контролем уровня свободных жирных кислот на 36,8–59,9% ($p < 0,04$), диацилглицеролов – на 24,1–69,6% ($p < 0,04$), моноацилглицеролов – на 26,3–61,2% ($p < 0,05$), триацилглицеролов – на 28,4 % ($p < 0,05$), лизофосфолипидов – на 38,7–57,8% ($p < 0,05$); увеличение концентрации эфиров холестерина на 70,2% ($p=0,021$), суммарных фосфолипидов – на 43,1–67,1% ($p < 0,03$), фосфатидилэтаноламина – на 20,9–47,0% ($p < 0,05$), фосфатидилсерина – на 91,0–141,4% ($p < 0,03$). Положительное действие препарат начинал оказывать с первых суток применения. Примечательно, что на последнем этапе исследования значения многих показателей приблизились к нормальному уровню.

Мембраностабилизирующий эффект этоксида в тканях печени и кишечника также начинал проявляться с первых суток и достигал максимальной выраженности на 3–5-е сутки применения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На фоне острого воспалительного процесса в ПЖ и усиления панкреатогенной ферментативной активности плазмы крови происходит поражение смежных органов и систем организма, в нашем случае – кишечника и печени. Одной из причин прогрессирования и генерализации воспалительного процесса в брюшной полости выступает разбалансировка липидного метаболизма в клеточных структурах данных органов. Развитие мембранодеструктивных процессов в тканях ПЖ, печени и кишечника обусловлено усилением ПОЛ клеточных мембран и активацией липолитических

ферментов, где наибольшее значение имеет ФЛА₂. Данные изменения протекают на фоне глубокой депрессии антиоксидантных ферментных систем. Все эти патологические процессы вкуче усугубляют состояние организма и создают благоприятный фон для дальнейшего прогрессирования ЭИ с вовлечением новых органов в порочный круг нарушенного метаболизма.

Опытным путем выявлено, что этоксилол вызывает быстрое (уже с первых суток применения) и значительное ингибирование процессов ПОЛ тканевых структур ПЖ, печени и кишечника. Важным патогенетическим эффектом препарата является снижение в исследуемых тканях активности ФЛА₂ и повышение собственной антиоксидантной защиты, что и обуславливает выраженное мембранопротекторное действие этоксилола. Данный факт подтверждается достоверной корреляционной связью между динамикой липидного метаболизма тканей изученных органов и течением процессов липоперекисления и фосфолипазной активностью ($r=0,53-0,95$).

В целом данные проведенного исследования не только вносят определенный вклад в совершенствование интенсивной терапии больных ОП, но и позволяют расширить знания о механизмах его угрожающего прогрессирования.

НИР проведена в рамках реализации ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России».

ЛИТЕРАТУРА

1. Власов А.П., Крылов В.Г., Тарасова Т.В. и др. Липидмодифицирующий компонент в патогенетической терапии. Москва: Наука, 2008. 374 с.
2. Савельев В.С., Гельфанд Б.Р., Филимонов М.И. и др. Оптимизация лечения панкреонекроза – роль активной хирургической тактики и рациональной антибактериальной терапии. *Анналы хирургии*. 2000. № 2. С. 12-16.
3. Жидкова С.В., Вишняков С.С., Шачинова Т.П. и др. Патогенетические основы оптимизации терапии экспериментального панкреатита. «Общество, здоровье, лекарство»: Материалы Всероссийской научно-практической конференции. Саранск. 2005. С. 49-51.
4. Власов А.П., Трофимов В.А., Крылов В.Г. Системный липидный дистресс-синдром в хирургии. Москва: Наука, 2009. 224 с.
5. Schulz H., Schulz E. Akute pankreatitis – atologie, pathologische anatomie und pathogenese. *Zschr. Inn. Med.* 1990. Bd. 117. № 8. P. 467-473.
6. Wang Z.H., Iguchi H., Ohshio G. Increased pancreatic metallothionein and glutathione levels: protecting against cerulein and taurocholate-induced acute pancreatitis in rats. *Pancreas*. 1996. № 13. P. 173-183.