

снижения уровня NO в плазме крови.

3. Выраженность изменений показателей эндотелиальной дисфункции и маркеров повреждения эндотелия при ХДЗП зависит от тяжести процесса: более низкий уровень NO и увеличение количества ДЭЦ были зарегистрированы в группе больных ЦП.

4. Уровень NO и количество десквамированных эндотелиоцитов находятся в отношении сильной отрицательной связи.

5. Дисфункция и повреждение эндотелия могут являться патогенетическими факторами прогрессирования хронических заболеваний печени.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бувальцев В.И. Дисфункция эндотелия как новая концепция профилактики и лечения ССЗ // Межд. мед. журн. — 2001. — № 3. — С. 202–208.

2. Горбаков В.В. Острые вирусные гепатиты // Практич. врач. — 2001. — № 17. — С. 6–10.

3. Звягинцева Т.Д., Гриднева С.В. Современные представления о сосудистом эндотелии в норме и при патологии желудочно-кишечного тракта // Экспер. и клин. гастроэнтерол. — 2005. — № 4. — С. 6–12.

4. Петрищев Н.Н., Беркович О.А. Диагностическая ценность определения десквамированных эндотелиоцитов в крови //Клин. лабор. диагно. — 2001. — № 1. — С. 50–52.

5. Петрищев Н.Н. Дисфункция эндотелия. Причины,

механизмы, фармакологическая коррекция / Под. ред. Н.Н.Петрищева. — СПб.: Изд-во СПбГМУ, 2003. — 184с.

6. Ратникова Л.И., Мельников И.В. Значение оксида азота в повреждении гепатоцитов при патологии печени // Эпидемиол. и инфекц. бол. — 2002. — № 4. — С. 50–54.

7. Шахильдян И.В., Михайлов М.И., Онищенко Г.Г. Парентеральные вирусные гепатиты (эпидемиология, диагностика, профилактика). — М.: ГОУ ВУНМЦ МЗРФ, 2003. — 384с.

8. Carter E.P., Ohara M., Martin P. Neuronal nitric oxide synthase and systemic vasodilation in rats with cirrhosis // Am. J. Physiol. — 2000. — Vol. 279. — P. 1110–1115.

9. Helmy A., Newby D.E., Jalan R. Enhanced vasodilatation to endothelin antagonism in patients with compensated cirrhosis and the role of nitric oxide // Gut. — 2003. — Vol. 52. — P. 410–415.

10. Jastwal M., LaRusso N.F., Gores G.J. Nitric oxide in gastrointestinal epithelial cell carcinogenesis: Linking inflammation to oncogenesis // Am. J. Physiol. — 2001. — Vol. 61. — P. 6388–6393.

11. Marcellin P., Asselah T., Boyer N. Fibrosis and disease progression in hepatitis C // Hepatology. — 2002. — Vol. 36. — P. 47–56.

Поступила 21.03.08.

ENDOTHELIAL DYSFUNCTION IN CHRONIC DIFFUSE LIVER DISEASES

I.A.Bulatova, A.P.Schekotova, Yu.I.Tretyakova

Summary

It has been shown that in chronic liver diseases, there are signs of disorders and endothelial dysfunction the intensity of which depend on the severity of the process.

КОРРЕКЦИЯ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ФОРМОЙ АНТИОКСИДАНТОВ И ПЕРФТОРАНА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ХРОНИЧЕСКОМ ПАНКРЕАТИТЕ

Игорь Александрович Радионов, Ренат Аркадьевич Мухамадияров

Кафедра госпитальной хирургии (зав. — проф. В.И. Подолужный), кафедра фармакогнозии и ботаники
(зав. — доц. Р.А. Махамадияров) Кемеровской государственной медицинской академии,
e-mail: radionov3@kemcity.ru

Реферат

Приведены результаты комплексной метаболической терапии больных с оксидативными нарушениями при панкреатите с использованием препарата, заключающего в липосомальной форме все исследуемые компоненты — эмоксипин, фридокс и перфторан. Снизилась выраженность негативных эффектов оксидативного стресса, что позволяет предположить возможный аналогичный эффект исследуемых антиоксидантов в терапии больных первичным хроническим панкреатитом, а также успешный исход заболевания при ранней коррекции нарушений системы антиоксидантной защиты.

Ключевые слова: экспериментальный первичный хронический панкреатит, перекисное окисление липидов, оксидативный стресс, антиоксиданты, перфторан.

Оксидативный стресс (ОС), сопровождающий экспериментальный хронический панкреатит (ХП), безусловно, оказывает ряд негативных воздействий на отдельные стороны метаболизма. Чрезмерная интенсификация пероксидации ведет к нарушению микроциркуляции, обменных процессов и развитию гипоксии, которая сама по себе индуцирует перекисное окисление липидов (ПОЛ). Формируется “порочный круг” с нарушением ионного гомеостаза и биоэнергетики, что в случае длительного функционирования может

повредить клетки и вызвать их гибель.

В патогенезе алкогольного первичного хронического панкреатита (ПХП) [9, 17] участвуют такие механизмы, как постоянное неконтролируемое употребление этанола, нарушающее синтез фосфолипидов клеточных мембран, что вызывает повышение их проницаемости для ферментов, и угнетение этанолом биоэнергетических процессов в клетках с последующим уменьшением их устойчивости к повреждающим влияниям и ускорением некротического процесса.

При всех вариантах ПХП заметную роль играют изменения в системе микроциркуляции, приводящие в конечном итоге к гипоксии клеток поджелудочной железы (ПЖ), фиброзу мелких сосудов и повышению в них уровня циклического аденозинмонофосфата (цАМФ), который, в свою очередь, активизирует транспорт Ca^{2+} в клетки. Избыточное насыщение клеток кальцием и чрезмерное накопление его в митохондриях ведут к разобщению окисления и фосфорилирования и далее к фазе значительного снижения доставки крови к клеткам и нарастанию процессов дистрофии [4].

Одним из эффективных препаратов, обеспечивающим регуляцию подобных процессов в организме, является перфторан. Он устраняет спазм периферических сосудов, восстанавливает микроциркуляцию, тканевой газообмен и метаболизм, уменьшает отек эндотелия сосудов [5]. Перфторуглеродные эмульсии растворяются в липидах клеточных мембран, переносят в себе кислород и углекислый газ и становятся частью транспортной системы кислорода в клетках и тканях организма. Встраиваясь в структуру мембран клеток, эти эмульсии способны стабилизировать структуру эндотелия сосудов и клеточных мембран [10]. Кроме того, перфторан снижает интенсивность ПОЛ в тканях, разрешая вазоспазм, ослабляя микроциркуляторные расстройства и ишемию ткани [6].

Целью настоящей работы была оценка эффективности перфторана, его липосомальной (ЛП) формы и комплексного применения совместно с антиоксидантными препаратами в терапии оксидативных нарушений.

Эксперименты выполнялись на 63 белых

крысах-самцах линии Wistar массой 300–320 г в зимний период с использованием модифицированной модели дибутилтиндихлоридиндуцированного ПХП по G. Sparmann et al. [18] и J. Merkord et al. (1997) [13] в соответствии с требованиями «Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных», «Правила по обращению, содержанию, обезболиванию и умерщвлению экспериментальных животных». 0,6% раствор дибутилтиндихлорида (DBTC) вводили в хвостовую вену из расчета 6 мг/кг. В этой дозе дибутилтиндихлорид вызывает в течение 28 дней токсический некроз билиопанкреатического эпителия с формированием конгломератов с обструкцией панкреатических протоков, прямое повреждение панкреатических клеток, интерстициальный отек, активный воспалительный процесс и выраженный перидуктальный интерстициальный фиброз ПЖ. Развитие ХП подтверждено данными биохимических и морфологических исследований.

Для коррекции установленных нарушений в системе ПОЛ-АОЗ подопытным животным с моделированным ХП вводили антигипоксанта перфторан, его липосомальную форму, а также антиоксиданты — эмоксипин и фридокс с перфтораном в липосомальной форме. Липосомы (ЛП) готовили методом экструзии через поликарбонатные фильтры на экструдере. Липидная фаза липосом состояла из яичного лецитина и холестерина в молярном отношении 7:5. Антиоксиданты вводили в липосомы на стадии образования мультламеллярных везикул. Препараты вводили через хвостовую вену в дозе 25 мг/кг массы животного, при этом доза фридокса составляла 6 мг/кг, эмоксипина — 3 мг/кг, перфторана — 2 мг/кг. Использовали заводом нетоксичные дозы препаратов. Проводили 7 инъекций с интервалом в 48 часов. Через 24 часа после последней инъекции производили одномоментную декапитацию животных. Для исследования использовали сыворотку, эритроциты, образцы печени и ПЖ.

Для оценки интенсивности оксидативных процессов определяли содержание продуктов ПОЛ в плазме крови, а именно диеновых конъюгатов (ДК) и малонового диальдегида (МДА): первые — в гептановом слое липидного экстракта плазмы по величине оптической плотности при 232 нм [2], вторые — в плазме по продукту реакции с тиобарбитуровой кислотой в кислой среде в присутствии ионов Fe^{2+} [1], результаты выражали в мкмоль/л. Антиоксидантный потенциал оценивали по содержанию церулоплазмина (ЦП), интегральному показателю — суммарной антиокислительной активности (АОА) плазмы крови, а также активности ключевых ферментов АОЗ, локализованных в эритроцитах — катала-

Таблица 1

Показатели ПОЛ-АОС при метаболической коррекции нарушений, обусловленных экспериментальным хроническим панкреатитом у крыс

Группы животных	Сыворотка				Эритроциты	
	МДА, мкМ/л	ДК, E ₂₃₂ /мл	ЦП, мг/100мл	АОА, %	КАТ, мкМ/мин • мл	СОД, Ед/мл
Контроль (n=10) (1)	6,1±0,3 p ₁₋₂ **	3,7±0,1 p ₁₋₄ * p ₁₋₅ *	28,7±1,9	41,9±2,1 p ₁₋₂ ** p ₁₋₃ * p ₁₋₄ *	13,5±0,4	1533±60,3 p ₁₋₂ *
ХП (n=10) (2)	33,5±1,2	4,8±0,2	32,9±1,4	16,8±0,8	18,5±1,5 p ₂₋₄ *	856±32,6
ХП+ПФ (n=11) (3)	25,7±1,1* p ₃₋₄ *	4,3±0,3	36,8±1,8	17,9±0,8	14,2±0,8* p ₃₋₄ **	1015±59,9*
ХП+ПФ+ПП (n=12) (4)	13,2±0,7**	6,1±0,3*	26,2±1,0	23,1±0,9*	31,6±1,4**	1118±63,7*
ХП+Э+Ф+ПФ (n=9) (5)	19,7±1,4*	6,1±0,4*	37,1±2,7	26,4±1,9*	14,8±1,3	1284±64,9*

Примечание: достоверность различий показателей между животными с экспериментальным панкреатитом и группами с антиоксидантной и метаболической терапией выявлялась при * p<0,05; ** p<0,01. То же в табл. 2.

зы (КАТ) и супероксиддисмутазы (СОД). Определение ЦП, основного плазменного фермента, обладающего антиоксидантной активностью, основано на его способности окислять пара-фенилендиамин. Активность фермента выражали в мг/100 мл [16]. Суммарную антиоксидантную емкость плазмы крови (АОА) определяли по методу Al-Timimi et al. в модификации М.В. Прохмислова [7, 11]. Активность КАТ в эритроцитах оценивали по методу, основанному на фиксации комплекса H₂O₂ – молибдат при 410 нм [12]. Активность СОД измеряли при минимальном деструктивном воздействии на эритроциты способом генерации супероксид-анион-радикалов в системе НАД•Н-фенозинметасульфат-нитросиний тетразолевый (НТС) [15] в модификации Г.Ю. Мальцева [3]. Активность фермента выражали в условных единицах/мл.

Все операции по приготовлению гомогенатов печени и ПЖ (1/15 М фосфатный буфер, pH 7,4; разведение 1:10) производили при температуре 0-4°С. В гомогенатах определяли концентрацию продуктов ПОЛ, реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой (МДА, нмоль/г ткани), по методу [8] и активность СОД (относит. ед/г ткани) [14]. Спектрофотометрические измерения проводились с использованием кинетического спектрофотометра. Полученные результаты анализировали методами вариационной статистики с использованием пакета программ Statistica. Определяли средние значения, ошибку среднего, для сравнения значений использовали t-критерий Стьюдента.

Перфторан в терапии экспериментального ХП

применяли в трех различных сериях: перфторан, перфторан в липосомальной форме и перфторан, эмксипин и фридокс в липосомальной форме.

Как показали результаты исследования (табл. 1), использование в терапии экспериментального ХП только перфторана хотя и вызвало снижение выраженности оксидативных процессов, однако его результативность была значительно ниже, чем при назначении липосомальной формы исследованных антиоксидантов. Так, в крови животных данной группы сохраняется достаточно высокий уровень продуктов ПОЛ в сыворотке крови на фоне низкой антиоксидантной активности сыворотки крови, которая более чем в 2 раза ниже оптимального значения, установленного в группе контрольных животных. Активность СОД в эритроцитах была снижена в среднем на 33,4% от контрольного уровня.

При исследовании ткани ПЖ (табл. 2) следует отметить весьма позитивный эффект метаболической терапии перфтораном оксидативных нарушений, обусловленных развитием экспериментального ХП. Как содержание вторичных продуктов окисления, так и величина активности ключевого фермента АОЗ-СОД в ткани ПЖ животных данной группы достоверно не отличались от контрольных значений. В то же время в ткани печени животных после применения перфторана

Таблица 2

Маркёры оксидативного стресса при экспериментальном первичном хроническом панкреатите после антиоксидантной и метаболической коррекции у крыс

Группы животных	ПЖ		Печень	
	МДА, нмоль/г	СОД, Ед/г	МДА, нмоль/г	СОД, Ед/г
Контроль (n-10) (1)	38,89±2,5	0,303±0,041	45,8±4,5 p ₁₋₂ *	0,236±0,039
ХП (n-10) (2)	47,7±3,2	0,335±0,045	71,6±5,8	0,292±0,032
ХП+ПФ (n-11) (3)	39,96±3,1	0,356±0,044 p ₁₋₃ *	71,9±6,1 p ₁₋₃ *	0,275±0,029
ХП+ПФ+ЛП (n-12) (4)	37,26±2,5* p ₂₋₄ *	0,422±0,061* p ₁₋₄ **, p ₂₋₄ *	69,3±5,9 p ₁₋₄ *	0,284±0,035
ХП+Э+Ф+ПФ (n-9) (5)	37,18±2,7* p ₂₋₅ *	0,256±0,038** p ₂₋₅ **	69,4±5,7 p ₁₋₅ *	0,280±0,034

был отмечен высокий уровень продуктов перекисидации, в 1,5 раза превышавший контрольный. В печени была несколько увеличена и активность СОД. Полученные достоверно значимые результаты, вероятно, могут быть обусловлены локализацией первичного очага воспаления, где эффект метаболической коррекции достигается быстрее, чем в печени.

Более значительной эффект в коррекции оксидативных нарушений отмечен при использовании перфторана в форме липосом. Позитивным моментом в направленности изменений, определяемых применением липосомальной формы перфторана, является значительное снижение количества МДА в сыворотке, одновременно с этим повышается суммарная АОА сыворотки крови животных. Некоторое увеличение пула ДК в данном случае может быть связано с улучшением оксигенации тканей, обусловленным воздействием перфторана.

Активность ключевого фермента АОЗ крови — СОД у животных данной группы на 18,6% превышала аналогичный показатель, установленный в предыдущей группе. В эритроцитах крови животных после применения липосомальной формы перфторана наблюдалась наиболее высокая активность КАТ — фермента, основным механизмом действия которого является разрушение перекисей.

В ПЖ, несмотря на достаточно низкий уровень продуктов ПОЛ, отмечалась повышенная активность СОД, что может являться компенсаторно-приспособительной реакцией на проявление оксидативных процессов, обусловленных ХП.

В ткани печени, как и у животных предыдущей группы, было увеличено содержание продуктов ПОЛ.

Комплексный препарат, заключающийся в липосомальной форме все исследуемые компоненты — эмоксипин, фридокс и перфторан, использовался в терапии последней группы подопытных животных с ПХП. Каждый из входящих в состав смеси компонентов, как уже упоминалось выше, обладает определенным эффектом воздействия на патологическую цепь оксидативных превращений липидов. Полученные результаты достоверно подтвердили эффективность комплексного применения исследуемых антиоксидантов совместно с перфтораном в форме липосом в коррекции нарушений, обусловленных ОС. Так, эффект совместного применения антиоксидантов и перфторана определяется более высокой, чем в двух предыдущих группах, активностью СОД и суммарной АОА сыворотки. В то же время увеличенный уровень первичных продуктов ПОЛ может оказаться в данном случае маркером инициации оксидативных процессов. Дополнительное присутствие в составе используемых липосом антиоксидантов практически не повлияло на показатели оксидативных процессов в ПЖ и печени, за исключением снижения активности СОД в ткани ПЖ в среднем на 16% от контрольного уровня.

Значительное накопление МДА в ткани печени (более чем в 1,5 раза превышавшее контрольный уровень; p<0,01) у всех животных с ПХП, получавших препараты

с перфтораном, позволяет предположить некоторое негативное действие препарата, оказываемое на метаболизм гепатоцитов. При всем этом активность СОД в печени обследованных групп животных остается на достаточно высоком уровне.

Сопоставление полученных данных позволяет заключить, что при использовании оксигенированного перфторана в печени животных с экспериментальным ПХП одновременно с увеличением оксигенации ткани и интенсификацией клеточного метаболизма, могут активироваться и оксидативные процессы. Как известно, применение перфторана улучшает метаболическое обеспечение гепатоцитов в целом и обновление фосфолипидов биомембран в частности. Вместе с тем возрастает нагрузка на системы АОЗ с последующим снижением антиоксидантных ресурсов, что и определяет, в свою очередь, накопление продуктов ПОЛ.

Ранняя коррекция нарушений системы АОЗ, обусловленных развитием оксидативного стресса, сопровождающего ПХП, может способствовать успешному исходу заболевания у больных.

ВЫВОД

Применение антиоксидантов и перфторана в форме липосом в терапии экспериментального хронического панкреатита в значительной мере снизило выраженность негативных эффектов оксидативного стресса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Андреева Л.И., Кожемякина Л.А., Кишун Л.А. Модификация методов определения перекиси липидов в тесте с ТБК // Лаб. дело. — 1988. — № 11. — С. 41-43.
2. Костюк Б.А., Потапович А.И., Лунец Е.Ф. Спектрофотометрическое определение диеновых конъюгатов // Вопр. мед. химии. — 1984. — Т. 30. — № 4. — С. 125-127.
3. Мальцев Г.Ю., Васильев А.Г. Способ определения активности каталазы и супероксиддисмутазы эритроцитов на анализаторе открытого типа // Вопр. мед. химии. — 1994. — Т. 40. — № 2. — С. 56-58.
4. Минушкин О.Н. Хронический панкреатит: некоторые аспекты патогенеза, диагностики и лечения // Consil. med. — 2002. — Т. 4. — Вып. 1. — С. 23-26.
5. Мороз В.В. Перфторуглеродистые соединения в лечении гипоксии и критических состояний / В кн.: Перфторорганические соединения в биологии и медицине. — Пушкино, 1999. — С. 26-30.
6. Мусалатов Х.А. Промывание раневых полостей с помощью перфторана / В кн.: Перфторорганические

соединения в биологии и медицине. — Пушкино, 1999. — С. 62-69.

7. Промыслов М.В., Демчук М.Д. Модификация метода определения суммарной антиоксидантной активности сыворотки крови // Вопр. мед. химии. — 1990. — № 4. — С. 90-92.

8. Разумов А.С., Пеганова Ю.А., Вандакуров Е.В. Определение статических и динамических показателей липопероксидации / Под ред. А.С. Разумова. — Кеморо, 1997. — 20 с.

9. Шалимов, А.А., Грубник В.В., Горвиц Дж. Хронический панкреатит. Современные концепции патогенеза, диагностики и лечения. — Киев: Здоров'я. — 2000. — 255 с.

10. Шумаков В.И., Онищенко Н.А., Савяхметов Э.Ш. и др. Использование перфторуглеродистых эмульсий при трансплантации органов (итоги и перспективы) / В кн.: Перфторорганические соединения в биологии и медицине. — Пушкино, 1999. — С. 143-146.

11. Al-Timini D.L., Dormandy T.L. Summari antioxidant active // Biochem. J. — 1997. — Vol. 168. № 2. — P. 283-288.

12. Goth L. // Clin. Chim. Acta. — 1991. — Vol. 196. — P.143-152.

13. Mercord J., Jonas L., Weber H. et al. Acute interstitial pancreatitis in rats induced by dibutyltin dichloride: patogenesis and natural course of Itsions // Pancreas. — 1997. — Vol. 15. — № 4. — P. 392-401.

14. Mistra, A.P., Fridorich J. // J. Biol. Chem. — 1972. — Vol. 247. — P. 6960.

15. Niashikimi M., Rao N.A., Jagi K. Identification metod for superoxide dismutase // Biochem.biophes. Res. Commun. — 1972. — Vol. 46. — P. 849-854.

16. Ravin H.A. An improved colorimetric enzymatic assay of ceruloplasmin // J. Lab. Clin. Med. — 1961. — Vol. 58. — P. 161-168.

17. Riaz C., Ochi K., Tanaka J. et al. Does recurrent acute pancreatitis lead to chronic pancreatitis? Sequential morphological and biochemical studies // Pancreas. — 1997. — Vol. 14. № 4. — P. 334-341.

18. Sparmann G., Merkord J., Jdschke A. et al. Pancreatic fibrosis in experimental pancreatitis induced by dibutyltin dichloride // Gastroenterology. — 1997. — Vol. 112. — № 5. — P. 1664-1672.

Поступила 03.06.08.

CORRECTION OF OXIDATIVE STRESS BY LIPOSOMAL FORM OF ANTIOXIDANTS AND PERFTORAN IN EXPERIMENTAL CHRONIC PANCREATITIS

I.A.Radionov, R.A. Muhamadiyarov

Summary

Given are the results of complex metabolic therapy of patients with oxidative disorders and pancreatitis using a drug which in the liposomal form included all investigated components — emoxipin, fridox and perftoran. The expression of negative effects of oxidative stress decreased, which suggests a possible similar effect of studied antioxidants in treatment of patients with primary chronic pancreatitis, as well as positive outcome of the disease during early correction of antioxidant system disorders.