

УДК 576.8.094.7:616.37-002.1

МЕМБРАНОДЕСТАБИЛИЗИРУЮЩИЕ ЯВЛЕНИЯ В ПРОГРЕССИРОВАНИИ ОСТРОГО ПАНКРЕАТИТА И ИХ КОРРЕКЦИЯ

А.П. Власов, С.Г. Анашкин, Т.И. Григорьева, С.В. Катков, В.П. Власова, С.В. Тингаев,
ФГБУ ВПО «Мордовский государственный университет», г. Саранск

Власов Алексей Петрович – e-mail: vap.61@yandex.ru

Исследования показали, что прогрессирование острого экспериментального панкреатита сопровождается мембранодестабилизирующими явлениями не только в поджелудочной железе, но и в других органах пищеварительной системы (печень, кишечник). В основе высокого мембраностабилизирующего действия ремаксола лежит его способность снижать выраженность явлений гипоксии, а также уменьшать интенсивность перекисного окисления липидов и фосфолипазную активность в тканевых структурах органа поражения и других исследованных органов пищеварительной системы.

Ключевые слова: острый панкреатит, гипоксия, перекисное окисление липидов, ремаксол.

Researches have shown that advance of an acute experimental pancreatitis is accompanied by membrane destabilized phenomena not only in a pancreas, but also in other organs of the alimentary system (a liver, an intestine). At the heart of high membrane stabilized actions remaxolum its ability to reduce expression of the phenomena of a hypoxia lies, and also to reduce intensity peroxidations of lipids and phospholipase activity in fabric structures of an organ of a lesion and other investigated organs of the alimentary system.

Key words: acute pancreatitis, peroxide oxidation of lipids, remaxolum.

Введение

Одним из тяжелейших заболеваний в ургентной хирургии является острый панкреатит (ОП). В последние годы отмечается неуклонно рост больных острым панкреатитом [1, 2]. Преобладающее большинство больных ОП принадлежат 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 A_2 (ФЛА $_2$) [4]. На фоне эндогенной интоксикации (ЭИ), прогрессирования процессов липоперокисления 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 тканевых структур различных органов оценить эффективность антиоксиданта ремаксола в коррекции системных мембранодестабилизирующих явлений и предупреждении прогрессирования острого экспериментального панкреатита.

Материалы и методы

В основу работы положены экспериментальные исследования на взрослых беспородных половозрелых собаках ($n=30$) обоего пола массой от 8,5 до 15,2 кг, разделенных на две группы. Первая группа – контрольная ($n=16$). 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=14): исследовали влияние ремаксола 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 (Буянов В.М. и др., 1989). Таким образом воспроизводили медленно прогрессирующую форму течения острого экспериментального панкреатита. 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 релапаротомию, забор крови, биопсию тканей ПЖ, печени и кишечника. Животными выполняли только одну релапаротомию. 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 ремаксола из расчета 15 мл на 1 кг массы тела.

Определяли активность альфа-амилазы в плазме крови, используя метод ферментативного гидролиза крахмала. Регистрацию производили на ФЭКе при длине волны 630–690 нм (Досон Р. и др., 1991).

Оценка липидного обмена. Липиды из тканей печени, кишечника и ПЖ экстрагировали хлороформметаноловой смесью, фракционировали методом тонкослойной хроматографии (Хиггинс Дж. А., 1990). Полярные фосфолипиды разделяли на пластинах фирмы «Merk» на стеклянной основе, нейтральные липиды – на силикагелевых пластинах для обращенно-фазной тонкослойной хроматографии (Хиггинс Дж. А., 1990; Vaskovsky V. E. et al., 1975). 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 (Ганстон Ф. Д., 1986); уровень спонтанного малонового диальдегида – спектрофотометрическим методом в реакции с тиобарбитуровой кислотой (Sigma) (Егоров Д. Ю., Козлов А. В., 1988); активность супероксиддисмутазы – в реакции с нитросиним тетразолием (Гуревич В. С. и др., 1990); активность каталазы – спектрофотометрическим методом, основанным на способности перекисей образовывать с молибдатом аммония стойкий окрашенный комплекс. Активность ФЛА₂ определяли по каталитической деятельности фермента потенциометрическим методом (Трофимов В.А. и др., 2001).

Определение эндогенной интоксикации.

Выраженность ЭИ оценивали по 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: $РСА = ЭКА / ОКА$; индекс токсичности: $ИТ = ОКА / ЭКА - 1$ (Грызунов Ю. А., Добрецов Г. Е., 1998).

Оценка гипоксии. Содержание пировиноградной кислоты (пирувата) в тканевых структурах ПЖ, печени и кишечника

ка определяли по реакции с 2,4-динитрофенилгидразином с оценкой результата по калибровочной кривой (Кушманова О.Д., Ивченко Г.М., 1983), уровень молочной кислоты (лактата) – по реакции с параоксидифенилом (Меньшиков В.В., 1987). Макроскопия проводилась при лапаротомии и релапаротомии.

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 их 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 плазмы крови установлено, что данный показатель значительно возрастал уже на 1-е сутки после моделирования патологического процесса, превышая норму на 251,2% ($p < 0,05$). На последующих этапах наблюдения (3-и и 5-е сутки) активность α -амилазы постепенно снижалась, но достоверно превышала исходный уровень на 134,1 и 72,3% соответственно ($p < 0,05$).

Одним из важнейших патогенетических проявлений ОП явилось развитие ЭИ. Нами выявлено существенное (в 1,5 – 2,8 раза, $p < 0,05$) 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 43,4–125,3 и 48,2–152,1% ($p < 0,05$), в ткани печени – на 90,4–140,2 и 80,3–158,5% ($p < 0,05$) и в ткани кишечника – на 38,2–80,1 и 92,3–189,4% ($p < 0,05$) (рис. 1).

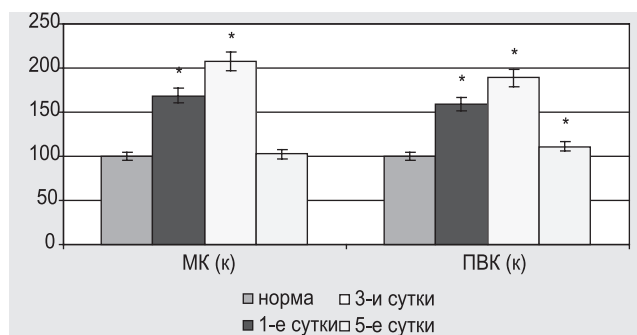


РИС. 1.

Уровень молочной (МК) и пировиноградной (ПВК) кислот в ткани поджелудочной железы при остром панкреатите (* – значения показателя, достоверно отличающиеся от нормы $p < 0,05$; к – контрольная группа).

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 (таблица). 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 5,2–7,3 раз ($p < 0,001$), в ткани печени – в 2,1–2,8 раза ($p < 0,05$) и в ткани кишечника – в 2,1–3,4 раза ($p < 0,05$).

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

В контрольной группе животных в тканевых структурах ПЖ выявлены следующие изменения липидного спектра: достоверное повышение уровня свободных жирных кислот на 60,3–174,3% ($p < 0,05$), диацилглицеролов – на 190,2–680,5% ($p < 0,05$), моноацилглицеролов – на 82,1–270,4% ($p < 0,05$), триацилглицеролов – на 58,4% ($p < 0,05$), лизофосфолипидов – в 6–14 раз ($p < 0,001$); снижение концентрации эфиров холестерина на 40,4% ($p < 0,05$), суммарных фосфолипидов – на 34,1–48,5% ($p < 0,05$), фосфатидилэтаноламина – на 25,4–38,7% ($p < 0,05$), фосфатидилсерина – на 28,1–60,5% ($p < 0,05$). 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 тканевых структурах исследованных органов пищеварительной системы возникают мембранодестабилизирующие явления (системный характер), которые в ряде случаев прогрессируют, приводя к необратимым морфологическим изменениям.

Учитывая высокую патогенетическую значимость свободнорадикальных механизмов оксидативного стресса в патогенезе мембранодеструктивных явлений, с целью стабилизации липидного метаболизма нами использован новый антигипоксант/антиоксидант – ремаксол. 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 ремаксола 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.

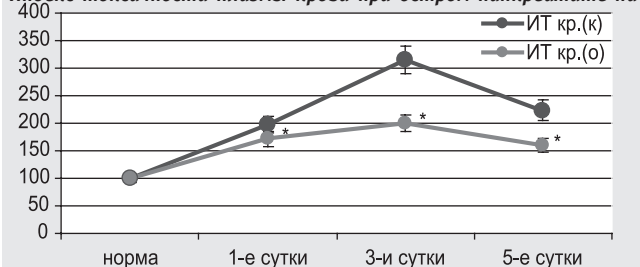
Анализ выраженности ЭИ на фоне применения ремаксола во второй группе показал уменьшение содержания токсических продуктов в крови относительно данных контрольной группы. Отмечалось повышение общей, эффективной концентрации альбумина и резерва его связывания относительно контроля на 25,4–26,5, 18,5–38,1 и 17,3% ($p < 0,05$) соответственно. Это свидетельствует о существенном положительном действии препарата. Индекс токсичности плазмы крови снижался относительно контроля на 24,1–38,5% ($p < 0,05$). Уровень молекул средней массы ($\lambda = 254$ нм и $\lambda = 280$ нм) превосходил норму, но был ниже контроля на 20,7–44,3 и 25,1–38,4% ($p < 0,05$) соответственно (рис. 2).

Применение ремаксола 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 42,4–53,3 и 29,4–45,6% ($p < 0,05$), в ткани печени – на 28,1–44,2 и 19,8–42,1 %

($p < 0,05$), в ткани кишечника – на 19,5–28,4 и 23,7–45,2% ($p < 0,05$) (таблица).

РИС. 2.

Индекс токсичности плазмы крови при остром панкреатите на



фоне терапии ремаксолом (* - достоверность отличия показателей по отношению к контролю при $p < 0,05$. к – данные контрольной группы исследований; о – данные опытной группы исследований).

ТАБЛИЦА.

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

Примечание: I – контрольная группа, II – опытная группа; ДК –

Показатель	Группа	Исходные данные	Этапы наблюдения (от момента моделирования)		
			1-е сутки	3-и сутки	5-е сутки
ДК, усл.ед./мг липидов	I	0,44±0,01	0,95±0,05*	0,91±0,04*	1,14±0,03*
	II		0,88±0,04*	0,73±0,03*	0,79±0,05*
МДА, нмоль/г белка	I	3,40±0,13	6,46±0,28*	13,67±0,61*	11,54±0,42*
	II		7,15±0,36*	6,82±0,50*	5,10±0,37*
Фосфолипаза А2, мкмоль/с/г белка	I	0,89±0,051	5,34±0,21*	7,83±0,37*	5,79±0,23*
	II		2,19±0,10*	3,56±0,14*	2,05±0,11*
Каталаза, мг H ₂ O ₂ /мин/г белка	I	2,20±0,10	2,28±0,16	6,45±0,32*	3,47±0,19*
	II		2,40±0,13	4,76±0,28*	2,72±0,12*
СОД, усл. ед.	I	14,30±0,42	8,16±0,37*	6,33±0,20*	12,24±0,40*
	II		10,54±0,52*	8,29±0,41*	14,47±0,52
Лактат, ммоль/г белка	I	0,333±0,009	0,561±0,028*	0,693±0,030*	0,341±0,019
	II		0,390±0,015*	0,328±0,025	0,349±0,013
Пируват, ммоль/г белка	I	0,027±0,001	0,043±0,002*	0,051±0,003*	0,030±0,001
	II		0,045±0,003*	0,032±0,002	0,089±0,005*

диеновые конъюгаты, СОД – супероксиддисмутаза; * - достоверность отличия по отношению к исходному уровню при $p < 0,05$; жирный шрифт – достоверность отличия по отношению к контролю ($p < 0,05$).

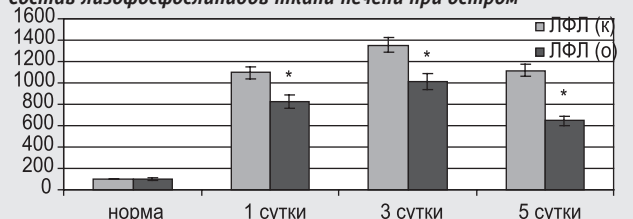
Терапия с включением ремаксола во второй группе способствовала значительному снижению интенсивности процессов ПОЛ и фосфолипидной активности в ткани ПЖ. Было зафиксировано достоверное уменьшение концентрации первичных и вторичных продуктов ПОЛ на 27,5–49,1% ($p < 0,05$), снижение активности ФЛА₂ на 47,3–63,4% ($p < 0,05$). Активность супероксиддисмутазы увеличилась на 13,8–47,1% ($p < 0,05$). В тканях печени и кишечника отмечены сходные изменения. Препарат начинал проявлять положительное действие уже с 1-х суток терапии.

Применение ремаксола во второй группе отразилось на липидном спектре тканевых структур ПЖ. Выявлено снижение по сравнению с контролем уровня свободных жирных кислот на 40,1–63,5% ($p < 0,05$), диацилглицеролов – на 32,4–74,5% ($p < 0,04$), моноацилглицеролов – на 30,5–68,1% ($p < 0,05$), триацилглицеролов – на 30,5% ($p < 0,05$), лизофосфолипидов – на 40,2–63,4% ($p < 0,05$); увеличение концентрации эфиров холестерина на 71,4% ($p < 0,05$), сум-

марных фосфолипидов – на 29,2–80,5% ($p<0,03$), фосфатидилэтаноламина – на 21,4–49,2% ($p<0,05$), фосфатидилсерина – на 88,1–151,6% ($p<0,05$). Положительное действие препарат начинал оказывать с первых суток применения. Примечательно, что на последнем этапе исследования многие показатели приблизились к исходным данным (рис. 3).

РИС. 3.

Состав лизофосфолипидов ткани печени при остром



панкреатите на фоне применения ремаксола.

Мембраностабилизирующий эффект ремаксола 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 тканевых структурах данных органов. Развитие мембранодеструктивных процессов в тканях ПЖ, печени и кишечника обусловлено усилением ПОЛ тканевых мембран и активацией липолитических ферментов, где наибольшее значение имеет ФЛА₂. Данные изменения протекают на фоне глубокой депрессии антиоксидантных ферментных систем. Все эти патологические процессы в совокупности усугубляют состояние организма и создают благоприятный фон для дальнейшего прогрессирования ЭИ с вовлечением новых органов в порочный круг нарушенного метаболизма.

Опытным путем выявлено, что ремаксол вызывает быстрое

(уже с первых суток применения) и значительное снижение выраженности гипоксии и 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 ремаксола. Данный факт подтверждается достоверной корреляционной связью между динамикой липидного метаболизма тканей изученных органов, явлениями гипоксии, течением процессов липоперекисления и фосфолипазной активностью (в частности, в тканевых структурах ПЖ между исследованными показателями $r=0,80-1,00$, в печени – $r=0,69-0,94$, в кишечнике – $r=0,74-0,98$).

В целом данные проведенного исследования не только вносят определенный вклад в совершенствование 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».

МА

ЛИТЕРАТУРА

1. Власов А.П., Крылов В.Г., Тарасова Т.В. и др. Липидомодифицирующий 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 – atiology, 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.