

ОЦЕНКА МЕМБРАНОДЕСТАБИЛИЗИРУЮЩИХ ПРОЦЕССОВ ПРИ ОСТРОМ ПАНКРЕАТИТЕ

В.И. МАЛЯРЧУК

Кафедра хирургии РУДН. Ул. Миклухо-Маклая д. 8, Москва, Россия, 117198.

Медицинский факультет.

А.П.ВЛАСОВ, В.А.ТРОФИМОВ, Е.Л. ЛЯМИНА, О.Н. ЛАЗАРЕВА, Л.М. МОСИНА

Кафедра факультетской хирургии Мордовского госуниверситета. Ул. Большевикская,
д. 68, Саранск, Россия, 430000, Медицинский факультет

В экспериментальных исследованиях на собаках ($n=22$) на модели острого билиарного панкреатита показано, что в динамике развития заболевания отмечаются выраженные расстройства качественного и количественного состава липидов поджелудочной железы, печени, крови. Анализ липидного состава в исследованных тканевых структурах позволяет констатировать развитие выраженных мембраностабилизирующих процессов, которые во многом обусловлены активизацией перекисного окисления липидов и фосфолипаз, и лежат в основе расстройств многих компонентов гомеостаза. Установлено, что между нарушениями состава липидов плазмы крови и исследованных органов (поджелудочной железы, печени) имеются корреляционные зависимости, что позволило принять первые (доступные в клинике) в качестве диагностических. У больных отечной формой острого панкреатита ($n=40$) регистрировались нарушения гомеостаза, выражающиеся в модификации обмена липидов, интенсификации процессов перекисного окисления липидов, повышении фосфолипазной активности, гиперамилаземии, эндотоксемии. Выявлены четкие качественные и количественные изменения липидного состава плазмы крови. Их изменения во многом соответствовали таковым в эксперименте. Это позволило установить, что в поджелудочной железе и в печени уже при отечном панкреатите развиваются мембраностабилизирующие процессы. Полученные данные могут служить основанием для коррекции схем патогенетической терапии.

Последний Международный хирургический конгресс (М., 2003) показал, что проблема острого панкреатита остается чрезвычайно актуальной. Это обусловлено двумя обстоятельствами: ростом заболеваемости и сохраняющейся высокой летальностью (Винник Ю.С. и др., 2003). Усилия медиков направлены на совершенствование и разработку новых схем терапии заболевания. Успешное решение этой задачи возможно при детальном познании патогенеза этой грозной патологии. Одному из аспектов этого и посвящена настоящая работа.

Достижения физико-химической биологии свидетельствуют о фундаментальной роли липидов в молекулярной организации и функционировании живых структур [Селищев А.А., Козлов Ю.П., 1988; Степанов А.Е. и др., 1991]. Принципиальным представляется положение об адаптогенной роли липидов, организованных в биомембраны в «подвижную» молекулярную матрицу, в которой размещены и функционируют «независимо» от условий внешней среды белковые молекулы [Крепс Е.М., 1981; Хочачка П., Сомеро Дж. 1988]. В.С. Савельевым с соавт. (1999) обоснован и выделен в особую группу так называемый липидный дистресс-синдром. В этой связи становится очевидным, что нарушения обмена липидов являются иницирующим звеном в патогенезе различных заболеваний и требуют своевременной, целенаправленной их коррекции [Акалаев Р.Н., Абидов А.А., 1993; Соболева М.К., Шарапов В.И., 1993; Хышиктуев Б.С. и др., 1994]. Последнее возможно лишь при выяснении молекулярных аспектов патогенетических механизмов модификации липидного компонента и клеточных дисфункций при той или иной патологии [Трофимов В.А. и др., 1998].

Целью исследования явилось изучение в динамике некоторых показателей обмена липидов, выявить связь его с другими дестабилизациями.

В основу работы положены результаты экспериментальных исследований и клинических наблюдений.

Материалы и методы.

Панкреатит моделировали по способу В.М. Буянова с соавт. (1989) следующим образом. Под тиопентал-натриевым наркозом (0,04 г/кг массы) взрослым беспородным собакам ($n=22$) выполняли срединный разрез вентральной стенки брюшной полости, пунктировали желчный пузырь, забирали желчь с последующим лигированием места пункции.

Затем желчь вводили в паренхиму вертикальной части поджелудочной железы по 0,6 мл в 5 точек. Таким образом воспроизводили медленнопрогрессирующую форму течения острого экспериментального панкреатита. В контрольные этапы наблюдения (1-е, 3-и, 5-е сутки) выполняли релапаротомию, биопсию тканей поджелудочной железы и печени, забор крови. В послеоперационном периоде животным проводили инфузионную терапию (внутривенные введения 5% раствора глюкозы и 0,89% раствора хлорида натрия из расчета 50 мл/кг массы животного).

Выполняли макро- и микроскопические исследования поджелудочной железы, печени. Липиды из биоптатов поджелудочной железы и печени, из плазмы крови экстрагировали хлороформно-метанольной смесью. Нейтральные липиды разделяли на пластинках с тонким слоем силикагеля (ТОО «Хромтекс») в смеси растворителей гексантилэтиловый эфир-уксусная кислота (90:10:1). Фосфолипиды фракционировали в системе растворителей хлороформ-метанол-ледяная уксусная кислота-вода (60:50:1:4) на пластинках (TLC Plates, Sigma-Aldrich). Количественное определение липидов проводили непосредственно на хроматограммах, обработанных 5% фосфорномолибденовой кислотой в этаноле с помощью денситометра Model GS-670 (BIO-RAD, США) с соответствующим программным обеспечением (Phosphor Analyst/PS Software). Содержание диеновых и триеновых конъюгатов в липидах оценивали спектрофотометрическим методом по наличию максимумов поглощения при 232 и 275 нм. Уровень малонового диальдегида определяли спектрофотометрическим методом по реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой. Активность фосфолипазы A_2 оценивали потенциометрическим методом в среде, содержащей 10 ммоль трис-НСl-буфер (рН 8,0), 150 ммоль тритон X-100, 10 ммоль $CaCl_2$ и 1,2 ммоль фосфатидилхолин. Определяли выраженность эндогенной интоксикации. Содержание молекул средней массы в сыворотке крови измеряли на спектрофотометре СФ-46 при длине волны 250 и 280 нм. Для характеристики физико-химических свойств альбумина определяли эффективную и общую концентрацию альбумина в сыворотке крови флуоресцентным методом на специализированном анализаторе АКЛ-01 «Зонд». Рассчитывали: резерв связывания альбумина, индекс токсичности плазмы.

Клинический раздел включает 40 больных острым панкреатитом отечной формы, получавших традиционную терапию. Подбор больных осуществлялся по возрасту, полу, давности заболевания, причинам возникновения, сопутствующим заболеваниям, общему состоянию, клинической картине, данным инструментального (УЗИ, ФГДС) исследования, рутинным биохимическим показателям. Интегральную оценку тяжести и прогнозирования острого панкреатита производили по системе, предложенной Р.В. Вашетко с соавт. (2000).

При госпитализации в хирургическую клинику больным проводили комплексное консервативное лечение, которое включало инфузионную, антибактериальную, спазмолитическую, цитостатическую, антиферментную и др. терапии.

Результаты экспериментального раздела.

При экспериментальном панкреатите в течение всего периода наблюдения регистрировались явления эндогенной интоксикации, о чем свидетельствовало изменение показателей, отражающих ее гидрофильный и гидрофобный компоненты. Увеличивалось содержание молекул средней массы, образующихся в результате деградации белка и оказывающих повреждающее действие на организм, что является важным показателем эндогенной интоксикации [Ташев Х.Р., Благов И.Н., 1999]. Рост (почти в 2 раза) гидрофильных высокотоксичных продуктов сохранялся и к концу наблюдения.

Кроме водорастворимых токсинов в плазме крови накапливались и гидрофобные, которые считаются наиболее агрессивными [Гаврилов В.Б. и др., 1992]. Так, в первые трое суток наблюдалось снижение общей и эффективной концентрации альбумина. Лишь к концу наблюдения отмечалась тенденция к их увеличению, однако показатели общей и эффективной концентрации альбумина не приближались к первоначальному уровню. Представленная динамика изменения уровня общей и эффективной концентрации аль-

бумина обуславливала низкую удельную функциональную активность протеина по связыванию токсических веществ во все периоды наблюдения, что подтверждается снижением резерва связывания альбумина более чем на 30 % и повышением индекса токсичности плазмы более чем в 3 раза.

Оценка качественного и количественного состава липидов показала, что через сутки после моделирования патологии в ткани поджелудочной железы происходили изменения в содержании нейтральных липидов и фосфолипидов.

Высокую активность липолитических систем характеризовали значительное (в 2,5 раза) увеличение доли свободных жирных кислот, которые при преобладании катаболического метаболизма отражают высокую активность фосфолипаз A_2 и рост долей диацилглицеролов и лизофосфолипидов, накопление которых отмечается при активизации фосфолипаз C , разрывающих мембранные фосфолипиды. В пользу вышесказанного также свидетельствуют данные, полученные о росте при панкреатите в поджелудочной железе активности фосфолипазы A_2 . В динамике воспалительного процесса в поджелудочной железе активность фосфолипазы A_2 по сравнению с исходом повышалась более чем в 3 раза.

Нами обнаружено, что в других изученных тканях (плазма крови, печень) активность фосфолипазы A_2 также повышалась. Так, с первых суток наблюдения ее активность в плазме крови возрастала в 13, а в конечный срок наблюдения – в 14 раз. Отмечено также повышение активности фермента в тканях печени (увеличение в 1,8 – 2,1 раза).

Молекулярный анализ показал, что при остром панкреатите происходило заметное уменьшение (на 15 – 23 %) доли суммарных фосфолипидов. В их спектре отмечено уменьшение относительного содержания фосфатидилэтаноламина, фосфатидилхолина, сфингомиелина, а на этом фоне повышение доли фосфатидилинозита и фосфатидилсерина. Фосфатидилэтаноламин и фосфатидилхолин являются основными структурными липидами. Их особенностью является то, что они сбалансированы по заряду. Уменьшение уровня указанных фракций и рост лизофосфолипидов свидетельствуют о грубых деструктивных изменениях в мембранах клеток изучаемых тканей. Об этом также свидетельствует понижение уровня сфингомиелина. Перестройки в обмене мембранных липидов находят также свое отражение в уменьшении доли свободного холестерина и возрастании содержания его эфиров. В последующие этапы наблюдения изменения в спектре липидов сохранялись, особенно лизофосфолипидов. Так, через 5 суток их уровень превышал первоначальный в 6 – 8 раз.

Изучение количественного и качественного состава липидов в других исследованных тканях (печень, плазма крови) показало, что расстройства обмена липидов отчетливо регистрировались и в них. Общая характеристика их такова: отмечались стабильные динамические изменения во фракциях, свидетельствующих о мембранодестабилизирующих процессах. Следует отметить, что динамизм модификаций состава липидов плазмы крови соответствовал таковому в поджелудочной железе и печени. При проведении корреляционного анализа по большинству показателей выявлены достоверные корреляционные зависимости.

Опыты показали, что при остром панкреатите наблюдается интенсификация процесса перекисного окисления липидов в плазме крови, тканях печени и поджелудочной железы. Так, уровень диеновых конъюгатов во всех исследованных средах уже в первые сутки наблюдения был выше нормальных показателей. В последующие этапы (3 и 5 суток) содержание их продолжало увеличиваться, что свидетельствовало о нарастании эндогенной интоксикации. Причем, количество начальных продуктов липоперекисления на всех этапах наблюдения в наибольшей степени повышалось в тканях печени: соответственно на 78,1, 103,9 и 225,6 % выше нормы. Наименьшее количество диеновых конъюгатов наблюдалось в плазме крови (соответственно на 42,6, 59,1 и 97,4 % выше нормы). Прирост их уровня в тканях поджелудочной железы занимал промежуточное положение. Изменения наблюдались при исследовании содержания малонового диальдегида. Уро-

вень ТБК-активных продуктов перекисного окисления липидов был наиболее высоким (на 100,5, 136,9 и 198,9 % выше нормы соответственно) в тканях поджелудочной железы, меньше их было в плазме крови (на 52,9, 105,8 и 149,2 %) и в тканях печени (на 44,3, 77,5 и 73,2 %).

Исследованиями установлено, что при остром панкреатите происходит внутриорганная активация ферментов поджелудочной железы, приводящая к ферментативному повреждению паренхимы органа и поступлению энзимов в кровь. Подтверждением этому служит повышение активности альфа-амилазы в плазме крови во все сроки наблюдения. Несмотря на то, что отмечалась тенденция к снижению активности фермента, его значение превышало нормальные показатели.

Таким образом, экспериментальные исследования показали, что при остром панкреатите развиваются выраженные мембранодестабилизирующие процессы. Одними из важных патогенетических компонентов в этом выступают интенсификация свободно-радикальных реакций ПОЛ и активизация фосфолипазы A_2 в тканевых структурах поджелудочной железы и печени, а также в плазме крови. Указанное обуславливает развитие выраженного интоксикационного синдрома, при котором возникает декомпенсация детоксикационных систем организма, что приводило к высокой летальности животных.

Результаты клинического раздела.

Оценка тяжести и прогнозирования острого панкреатита у больных при поступлении в клинику показала, что признаки панкреатита по сумме оценочных баллов определялись на уровне $1,35 \pm 0,11$. Следовательно, у них имелся «потенциально тяжелый» острый панкреатит, при котором без интенсивной терапии состояние больных будет прогрессивно ухудшаться.

Биохимические исследования показали, что у больных при поступлении в стационар регистрировались выраженные расстройства гомеостаза, проявляющиеся в модификации обмена липидов, интенсификации процессов перекисного окисления липидов, повышении фосфолипазной активности, гиперамилаземии, эндотоксиемии.

На фоне применения традиционной терапии изменения гомеостатических констант у больных сохранялись, особенно в первые трое суток. Так, содержание среднемoleкулярных пептидов было выше нормы в 1,5 – 2,4 раза. Показатели общей и эффективной концентрации альбумина на протяжении всего срока наблюдения сохранялись на низком уровне. При этом регистрировалась повышенная активность альбумина по связыванию гидрофобных токсических веществ: резерв связывания альбумина снижался на 18 – 29 %, а индекс токсичности плазмы повышался в 2,8 – 4,9 раза ($p < 0,05$).

Ключевыми расстройствами явились качественные и количественные изменения липидного состава плазмы крови. Их изменения во многом соответствовали таковым в эксперименте. Как указано выше, по модификации липидов плазмы крови можно судить об изменениях обмена липидов на органном уровне. Поэтому предоставляются основания констатировать, что в поджелудочной железе и в печени при отечном панкреатите возникают выраженные мембранодестабилизирующие процессы.

Следует подчеркнуть, что у больных острым панкреатитом интенсифицировались свободно-радикальные реакции процессов перекисного окисления липидов и липопротеинов. Как известно, при патологии они являются одними из связующих патогенетических звеньев [Азизова О.А., Власова И.И., 1993; Власов А.П. и др., 2000]. Обращал на себя внимание факт резкой активизация фосфолипазы A_2 . Активность энзима в плазме крови больных острым панкреатитом возрастала в 4 – 6 раз. Причем на фоне традиционной терапии повышенная активность перекисного окисления липидов и фосфолипазы A_2 сохранялась.

Таким образом, результаты экспериментальных исследований и клинических наблюдений показывают, что уже при отечной форме острого панкреатита возникают выраженные мембранодестабилизирующие процессы, которые, безусловно, во многом опре-

деляют расстройства в других компонентах гомеостатического процесса. Указанный факт имеет не только академическое значение, но и первооснову для осмысленных лечебных действий.

Литература

1. Азизова О.А., Власова И.И. Влияние липопротеидов, модифицированных ПОЛ на агрегацию тромбоцитов // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1993. – № 11. – С. 485 – 487.
2. Акалаев Р.Н., Абидов А.А. Фосфолипидный состав эритроцитов у больных хронической почечной недостаточностью // Вопросы мед. химии. – 1993. – № 5. – С. 43– 45.
3. Буянов В.М., Ступин И.В., Егеев В.Н. и др. Моделирование острого панкреатита // Клиническая хирургия. – 1989. – № 11. – С. 24 – 26.
4. Вашетко Р.В., Толстой А.Д., Курыгин А.А., Стойко Ю.М., Краснорогов В.Б. Острый панкреатит и травмы поджелудочной железы: руководство для врачей. - СПб: Питер, 2000. – 320 с.
5. Власов А.П., Трофимов В.А., Аширов Р.З. Роль нарушений липидного гомеостаза в патогенезе перитонита. - Саранск: Изд-во Мордов. ун-та, 2000. – 208 с.
6. Винник Ю.С., Черданцев Д.В., Миллер С.В., Перова О.В., Миллер М.С. Влияние способа оперативного вмешательства при синдроме системной воспалительной реакции при панкреонекрозе // Труды международного хирургического конгресса «Актуальные проблемы современной хирургии». - М., 2003. – С.31.
7. Гаврилов В.Б., Бидула М.М., Фурманчук Д.А., Конев С.В. Оценка интоксикации организма по нарушению баланса между накоплением и связыванием токсинов в плазме крови // Клин. лаб. диагностика. – 1992. – № 2. – С. 13 – 17.
8. Кренс Е.М. Липиды клеточных мембран - Л.: Наука, 1981. – 341 с.
9. Степанов А.Е., Краснополянский Ю.М., Швец В.И. Физиологически активные липиды. - М.: Наука, 1991. – 136 с.
10. Селищева А.А., Козлов Ю.П. Метаболизм фосфолипидов и биологические мембраны. - Иркутск: Изд. Иркутск. ун-та, 1988. – 88 с.
11. Соболева М.К., Шаранов В.И. Жирнокислотный состав и функциональное состояние эритроцитарных мембран у больных сепсисом // Вопросы мед. химии. – 1993. – № 5. – С. 19 – 21.
12. Ташев Х.Р., Благов И.Н. Детоксикационная терапия при остром разлитом перитоните // Хирургия. – 1999. – № 3. – С. 37-39.
13. Трофимов В.А., Власов А.П., Миннебаев М.М. Качественные и количественные изменения липидов при экспериментальном перитоните // Казанский медицинский журнал. – 1998. – № 5. – С. 382 – 387.
14. Хочачка П., Сомеро Дж. Биохимическая адаптация. - М.: Мир, 1988. – 508 с.
15. Хышиктуев Б.С., Хышиктуева Н.А., Иванова В.Н., Даренская С.Д., Новиков С.В. Жирнокислотный состав липидов плазмы крови и эритроцитов у больных раком лёгкого // Вопросы мед. химии. – 1994. – № 5. – С. 48 – 50.

APPERIATION OF MEMBRANODESTABILIZATION PROCESS IN OEDEMAC PANCREATITIS

V.I. MALYARCHUC

Department of Surgery RPFU. *M-Maclaya st., 8, Moscow, Russia, 117198. Medical faculty*

A.P.VLASOV, V.A.TROFIMOV, E.L. LYAMINA, O.N. LASAREVA, L.M. MOSINA

Department of Surgery Mordovian State University. *Bolchevistcaya st 68. Saransk, Russia, 430000. Medical faculty.*

It has been found out in experiments on dogs (n=22) on an acute bilic pancreatitis model, that in the dynamics of disease development the lipid spectrum in pancreatic tissues, in the liver and blood plasma is likely to undergo significant modifications. Analysis of lipid composition is likely to result from increase of membranodestabilisation process which potientiale lipid peroxidation and phospholipase activity. It is result some homeostatic disorders. Our study of the correlations among lipid composition in blood plasma and pancreas with liver has provided evidence that the first is basic for the diagnostic. The patient with oedematic pancreatitis (n=40) underwent conventional homeostatic disorders is likely to result from modification of lipid metabolism, free radical modification of lipoproteids increase the level of phospholipase and amylase activity, endotoxycose. It has been found out the quantitative and qualitative changing of lipid composition in blood plasma. It was dentical the same in experiments. The expressed membranodestabilization process take place in pancreas and liver at oedematic pancreatitis. It is a base from correction some plans of pathogenic therapy.