

Состояние перекисного окисления липидов у больных острым панкреатитом

Проф. В. А. Кубышкин,
доц. В. С. Тарасенко,
Г. А. Гавриленко,
Проф. В.П. Твердохлиб,
Д. В. Волков,
Д. Б. Демин,
Т. В. Соломатина,
Т. Ю. Козлова
Институт хирургии им. А.В.
Вишневского РАМН
(директор - академик РАМН
В.Д. Федоров),
Оренбургская
государственная
медицинская академия

С целью уточнения роли ПОЛ в патогенезе острого панкреатита проведено изучение содержания в плазме крови больных одного из первичных (диеновые конъюгаты) и одного из вторичных (малоновый диальдегид) продуктов свободнорадикальных реакций. Определение содержания продуктов ПОЛ в крови проведено во всех фазах процесса и при условии лечения экстракорпоральными методами детоксикации. Кроме того, у части больных продукты ПОЛ определяли в тканях поджелудочной железы, печени, лимфоузлах верхнего этажа брюшной полости. Контрольной группой были больные инфарктом миокарда и умершие от остро развившегося инфаркта миокарда. Всего обследовано 220 больных. Установлены следующие закономерности: на всех стадиях ОП в плазме крови содержание ДК и МДА повышено, особенно высоки показатели при деструктивных формах; в тканях поджелудочной железы и печени обнаружены значительные скопления ДК, МДА и липофусцина; проведение плазмафереза больным с деструктивным панкреатитом выводит из организма токсические соединения ПОЛ.

Lipid Peroxidation in Acute Pancreatitis Patients

V. A. Kubishkin,
V. S. Tarasenko,
G. A. Gavrilenco,
V.P.Tverdokhiib,
D.V.Volkov,
D. B. Demin,
T. V. Sniomatma,
T. Yu. Koslova
A.V. Vishnevsky Institute
of Surgery RAMSci
(Director -Academician
RAMSci V.D.Fedorov),
Orenburg State Medical
Academy

Aiming specification of lipid peroxidation role in acute pancreatitis pathogenesis, assessment of plasma primary (dien conjugates) and secondary (malon dialdehyde) products of free radical reactions were carried out. Plasma lipid peroxidation products were assessed in all phases of acute pancreatitis and after extracorporeal detoxication. Besides in a group of patients lipid peroxidation products were defined in pancreatic, liver tissue and lymph nodes of upper abdomen. A control group was presented by myocardial infarction patients. It was revealed, that in all phases of acute pancreatitis development plasma dien conjugates and malon dialdehyde concentration was elevated. Especially high levels were stated in destructive pancreatitis cases. Significant amount of dien conjugates, malon dialdehyde and lipofuscin was discovered in pancreatic and liver tissue. Plasmapheresis remove toxic products of lipid peroxidation in acute pancreatitis patients.

Роль перекисного окисления липидов (ПОЛ) в патогенезе острого панкреатита (ОП), несмотря на значительное число исследований [1-3, 5, 7-12], до настоящего времени не установлена. Одним из самых неясных звеньев патогенеза ОП остается молекулярный механизм интрацеллюлярной активации протео- и липолитических ферментов. Гипотетическая цитокиназа как инициатор "ферментативного взрыва" не найдена ни в тканях ПЖ, ни в крови, ни в лимфе. Поэтому действие ингибиторов протеаз может быть реальным только тогда, когда процесс деструкции ПЖ уже запущен. Использование цитостатиков теоретически может остановить процесс, однако в клинической практике их тоже назначают уже в фазе деструкции, и лечебный эффект оставляет желать лучшего. Кроме того, цитостатики сами по себе токсичны и их назначение на фоне тяжелой интоксикации и пониженного иммунитета не очень оправдано.

Достижения мембранологии показали, что липидные и белковые структуры клеток подвергаются мощным атакам свободнорадикальных процессов и их токсичных соединений при многих заболеваниях, особенно тогда, когда имеет место острая локальная гипоксия. Не исключено, что, находясь внутри панкреатоцитов в неактивном состоянии, протео- и липолитические ферменты могут там же эндоцеллюлярно или при выходе из клеток подвергаться атаке активных форм кислорода и переходить здесь же в свою активную разрушающую форму. Последующее поддержание ПОЛ на уровне, значительно более высоком, чем в норме, обеспечивает сохраняющаяся в связи с отеком гипоксия в тканях ПЖ и более выраженный локальный лейкоцитоз с активным фагоцитозом.

Уточнение роли ПОЛ на разных этапах развития процессов ОП могло бы аргументировать назначение антиоксидантов и антигипоксантов. Кроме этого, наличие в тканях и крови соединений, характерных для ПОЛ, а также возможность контролирования их выведения при экстракорпоральных методах детоксикации могут не только подтвердить динамику свободнорадикальных процессов, но и объективно количественно учитывать динамику их удаления из организма.

Материал и методы

Целью настоящего исследования являлось уточнение состояния ПОЛ на стадиях развития ОП, количественное определение содержания начальных и конечных соединений ПОЛ в тканях ПЖ и печени, а также изучение динамики выведения их в процессе плазмафереза.

Материал основан на исследованиях, проведенных 220 больным ОП, из которых 20 имели отечную форму, 200 - деструктивную. Для сопоставления интенсивности ПОЛ в тканях ПЖ и печени проведено биохимическое изучение наличия ДК и МДА в операционных биоптатах, секционном материале и в аналогичных тканях у больных, умерших от острого инфаркта миокарда (ИМ). Всего подвергнуто исследованию 20 операционных биоптатов при лечении деструктивных форм ОП и соответствующие ткани от 10 больных, умерших от ОП и от 9 больных, умерших от ИМ.

Состояние поджелудочной железы, печени, внепеченочных желчных путей, контролировалось УЗИ, КТ, органоспецифическими ферментами (альфа-амилаза, липаза, АЛТ, АСТ, диастаза мочи), уровнем билирубина. При необходимости верификации диагноза и оценки степени выраженности панкреонекроза, количества и характера выпота проводилась лапароскопия, носившая диагностическую и лечебную направленность.

У 9% больных был гнойно-некротический панкреатит с абсцедированием, у 91% диагностирован геморрагический и жировой панкреонекроз. Оперативными вмешательствами при деструктивном ОП были в зависимости от показаний следующие: эндоскопическая холецистостомия с дренированием силиконовыми трубками брюшной полости; холецистэктомия, холедохотомия с холедохостомией, марсупиализация сальниковой сумки и дренирование брюшной полости, абдоминализация ПЖ; первичная и многократная секвестрэктомия по показаниям в фазе гнойно-некротических осложнений.

В комплексную лабораторную диагностику помимо общепринятых методик обследования больных ОП входило определение ЛИИ (Я.Я. Кальф-Калиф, 1941) и МСМ (Н.И. Габриэлян с соавт., 1983). Концентрацию ДК в крови определяли по методике И.Д. Стальной (1977), концентрацию МДА по методике R. McKnight et F. Hunter (1966). Указанные исследования проводили при поступлении больных, перед операцией, а также с недельным интервалом в динамике послеоперационного лечения. Во время сеанса плазмафереза (ПФ) эти соединения определяли также в "мешке" с последующим расчетом количества выведенных токсических соединений ПОЛ.

Концентрацию МДА в биоптатах тканей определяли методикой с 2-тиобарбитуровой кислотой. При этом образуется окрашенный триметиновый комплекс, содержащий одну молекулу МДА и две молекулы тиобарбитуровой кислоты (J. Bemheim et al., 1948). Интенсивность развивающегося розового окрашивания регистрировали на спектрофотометре при 532 нм (N.A. Potter et al., 1976). Количество МДА определяли с учетом коэффициента молярной экстинкции, равного $1.56/10^4$ (N.Y. Kohn, M. Liver-Sedge, 1944) и выражали в нмолях на мг белка. Концентрацию ДК в гомогенатах тканей определяли по характерному для них максимуму поглощения раствора липидов в системе изопропанолгептан (1: 1) при длине волны 232 нм (Z. Placer et al., 1966). Все манипуляции проводили в холодильной комнате при температуре 1-3 С°.

Плазмаферез (ПФ) проводили всем больным деструктивным ОП с выраженным синдромом эндогенной интоксикации (СЭИ). Для изучения эффективности ПФ и объективизации его детоксицирующего действия использовали следующие формулы:

$$1\text{ПФ } V_1 - v =$$

$$2\text{ПФ } V_2 - v =$$

$$3\text{ПФ } V_3 - v =,$$

где V – объем очищенной плазмы; v – объем жидкости в “мешке”.

$$\text{ПФ1 } Z_1 = vK_{\text{дк}} + vK_{\text{мда}}$$

$$\text{ПФ2 } Z_2 = vK_{\text{дк}} + vK_{\text{мда}}$$

$$\text{ПФ3 } Z_3 = vK_{\text{дк}} + vK_{\text{мда}}$$

v – объём жидкости в “мешке

$K_{\text{дк}}$ – концентрация ДК в 1 мл в условных единицах

$K_{\text{мда}}$ – концентрация МДА в 1 мл в условных единицах

Z – сумма удаленных соединений ПОЛ условных единицах

$\text{ПФЗ} = \text{ПФЗ}_1 + \text{ПФЗ}_2 + \text{ПФЗ}_3$ – суммарное выведение продуктов ПОЛ за серию сеансов ПФ

Статистическая обработка материала проведена с использованием стандартных методов Стьюдента и Фишера, а также непараметрических методов Вилкоксона и метода сигмальных отклонений.

Принципы диагностики и тактики лечения больных не отличались от опубликованных в 1996 г. [4].

Результаты

Результаты исследования содержания ДК и МДА в периферической венозной крови показывают превышение нормы уже на стадии отека ПЖ. Так, у 20 больных с отечной формой ОП, подтвержденной клинико-лабораторными признаками и данными УЗИ и лапароскопии, содержание ДК превышало норму на 54.5%, а МДА – на 44%. Деструктивные формы ОП характеризуются значительным приростом ДК и МДА. При этом высокий уровень содержания токсических соединений ПОЛ в венозной крови сохраняется долго, несмотря на все виды интенсивного лечения. Средние показатели концентрации ДК и МДА представлены в таблицах 1 и 2. Так, в фазе геморрагического панкреонекроза концентрация ДК достигала 3.26 ± 0.49 ед. опт. плотности/мл, что составляет 316.70% по отношению к норме, а концентрация МДА – 6.15 ± 0.5 нмоль/мл (274.75%).

При затянувшемся, осложненном гнойно-некротическим процессом течения ОП концентрация ДК и МДА в периферической крови снижается, но нормализации ПОЛ не происходит до выздоровления или летального исхода. Известно, что эти периоды болезни сопровождаются наиболее тяжелой интоксикацией, которая, естественно, не объясняется только активностью ПОЛ. Чрезвычайно многообразные токсические соединения, циркулирующие в крови и в лимфе, и действующие в самых разнообразных тканях, не отражаются даже уровнем в крови так называемых молекул средней массы. Интегрирующим показателем тяжести СЭИ до настоящего времени следует считать ЛИИ. Так, сопоставление ЛИИ, содержания МСМ и продуктов ПОЛ в крови показало следующее. При отечном панкреатите содержание МСМ в плазме почти не отличается от содержания их в крови здоровых лиц. Деструктивный ОП при всех клинических признаках интоксикации сопровождался относительно невысоким приростом МСМ (0.442 ± 0.047 усл. ед., или 176.8% от контрольного уровня), в то время как ЛИИ достигает $6,91 \pm 0,88$ (691,1 % от нормы), а уровень МДА превышал норму в среднем на 274% (6.15 ± 0.56). Представленные числа говорят о том, что концентрация ДК и МДА в крови больных ОП больше отражает тяжесть СЭИ, чем концентрация МСМ. Возможно, часть МСМ связывается в реакциях ПОЛ [6], но тогда соответствующая масса молекул ДК и МДА должна быть меньше. Следовательно, высчитывая сумму выведенных в процессе ПФ молекул ДК и МДА в стандартном объеме элиминированной жидкости, можно судить об эффективности ПФ. Так, общая сумма удаленных соединений ПОЛ в условных

Таблица 1. Содержание ДК и МДА в плазме крови и в жидкости "мешка" у больных острым панкреатитом до и после проведения плазмафереза										
Группы обследования	Продукты ПОЛ	1-й сеанс плазмафереза			2-й сеанс плазмафереза			3-й сеанс плазмафереза		
		До ПФ	После ПФ	В мешке	До ПФ	После ПФ	В мешке	До ПФ	После ПФ	В мешке
Фаза отека (n = 20)	ДК	1.59 ± 0.15								
	МДА	3.21 ± 0.19								
Деструктивный панкреатит (n = 92)	ДК	1.23 ± 0.23	1.49 ± 0.3	1.95 ± 0.26	1.86 ± 0.22	1.2 ± 0.17*	2.14 ± 0.07	0.92 ± 0.07	0.82 ± 0.05	1.17 ± 0.1
	МДА	5.09 ± 0.46	3.88 ± 0.42	4.09 ± 0.2	5.46 ± 0.4	4.11 ± 0.46*	5.3 ± 0.37	5.42 ± 0.15	5.0 ± 0.207	7.04 ± 0.13
Сумма ДК и МДА, выведенных из организма (усл. ед.)	ДК			1560			1712			936
	МДА			3272			4240			5632
Группа контроля (n = 40)	ДК	1.03 ± 0.05								
	МДА	2.24 ± 0.01								

Единицы измерения содержания МДА в тканях: нмоль/мл; ДК в тканях: единицы оптической плотности/мл.
* - p < 0.05 (по сравнению с показателями ПОЛ до ПФ).

единицах на 800 мл жидкости в "мешке", рассчитанная по формуле ПФ7, может составлять 17352 усл. ед. В таблице 1 представлены данные, которые свидетельствуют о достаточно высоком лечебном действии ПФ. Повторные сеансы выводят из организма (из сосудистого бассейна и тканей) значительное количество высокотоксичных соединений, что сопровождается снижением ЛИИ (высокая обратная коррелятивная связь с содержанием МДА) и улучшением клинко-лабораторных данных. Кроме обычного выведения из организма токсических веществ, ПФ сопровождается гемодилюцией, улучшением реологических свойств крови, стабилизацией мембран форменных элементов крови. Все это приводит к уменьшению интенсивности ПОЛ. Однако, если больные переходили в фазу гнойно-некротических осложнений, снижалось содержание ДК и МДА в крови. По-видимому, это происходило в связи с истощением субстратов окисления и антиокислительных систем как в ПЖ, в первую очередь, так и в других тканях. Объективным подтверждением высокой степени активности ПОЛ в органах верхнего этажа брюшной полости являются результаты исследования содержания ДК и МДА в тканях ПЖ, печени, селезенки и лимфоузлах (таблица 2), а также большие скопления в них конечного продукта ПОЛ липофусцина. Данные, представленные в таблице 2, свидетельствуют о том, что концентрация продуктов ПОЛ в этих органах многократно превышает таковые в аналогичных тканях людей, умерших от ИМ. В то же время обращает на себя внимание то обстоятельство, что содержание ДК и МДА в мг тканей ПЖ, печени, селезенки, лимфоузлах и костном мозге почти одинаковое независимо от функции и расположения органа. В среднем концентрации в аналогичных тканях контрольной группы были ниже в 4 раза. Такая значительная разница сохранялась и тогда, когда содержание ДК и МДА в крови у больных ОГНП уменьшалось.

Характерно и то, что ткани, ответственные за иммунный ответ (печень, селезенка, костный мозг, лимфоузлы), содержали очень большое количество ДК и МДА, что не может не сказаться отрицательно на защитных силах больного ОП. Обращает на себя внимание факт снижения лейкоцитоза и уменьшения ЛИИ тогда, когда идет длительный период секвестрации ПЖ и формирования гнойников. В фазе далеко зашедших гнойно-некротических осложнений у больных были низкими ЛИИ, соответственно невысокий лейкоцитоз, значительная дис- и гипопропротеинемия, несмотря на многократные инфузии крови, плазмы, иммунокорректоров.

Обсуждение

Сопоставление полученных нами результатов с опубликованными ранее другими авторами показывает достаточную идентичность в общей картине свободнорадикальных процессов при ОП. Однако следует подчеркнуть, что большинство работ по изучению ПОЛ при ОП проведено в модельных экспериментах. Кроме того, нами впервые представлены данные о содержании в тканях веществ первичных и вторичных реакций липопероксидации.

Накопление и сохранение продуктов ПОЛ в жизненно важных органах на протяжении всей болезни дает ценную информацию, которая говорит о том, что снижение концентрации ДК и МДА в крови еще не является подтверждением того, что процессы свободно-радикального окисления прекратились, а ткани освободились от этих высокотоксичных соединений. Повторные сеансы ПФ способствуют освобождению организма от токсичных соединений типа ДК и МДА, но окончательно "очистить" его от продуктов ПОЛ и остановить сам процесс ПФ не может.

Возвращаясь к первой фазе ОП (фазе отека), мы также, как и другие исследователи (В.Г. Владимиров, В.М. Сергиенко, 1986; В.П. Григорьевский и соавт., 1989; Simovic M. et al., 1997) склонны считать, что на этой стадии повышение содержания соединений ПОЛ в крови больных достоверно свидетельствует об участии этих реакций уже в начале развития ОП. При этом уровень интенсификации ПОЛ, независимо от того, каким способом он был установлен - методом хемилюминисценции или биохимической реакцией, - как в экспериментах, так и в клинике в процентных соотношениях оказывается приблизительно одинаковым. Вероятно, такого уровня достаточно, чтобы включились биохимические механизмы активации эндоцеллюлярных протео- и липолитических ферментов. Запуск свободно-радикальных реакций в ПЖ может быть, в свою очередь, объяснен гипоксией как всей железы, так и ее фрагментов, если учесть фрагментарность

ее кровоснабжения и необходимость компенсации больших функциональных нагрузок (увеличение объема кровотока в 2-3 раза) после обильного приема пищи.

Исследуемый орган	Инфаркт миокарда (аутопсия) n = 9		Форма поражения поджелудочной железы					
			ОГЖП (n = 11) операционная биопсия		ОГНП (n = 9) операционная биопсия		Умершие от ОГЖП и ОГНП (n = 10)	
	МДА	ДК	МДА	ДК	МДА	ДК	МДА	ДК
Поджелудочная железа	1.49 ± 0.05	0.35 ± 0.02	6.86 ± 1.45*	3.05 ± 1.53*	9.65 ± 1.36*	5.02 ± 1.67*	7.47 ± 1.6*	4.49 ± 1.18*
Печень	1.56 ± 0.07	0.33 ± 0.008	6.19 ± 0.68*	2.5 ± 0.44*	12.0 ± 1.55*	3.1 ± 1.09*	6.04 ± 1.1*	2.8 ± 0.74*
Селезенка	1.62 ± 0.08	0.35 ± 0.01	—	—	—	—	7.88 ± 1.4*	4.75 ± 1.22*
Л/узлы верхнего этажа брюшной полости	1.54 ± 0.04	0.33 ± 0.02	6.26 ± 0.95*	3.93 ± 1.7*	10.5 ± 1.12*	1.83 ± 0.58*	9.84 ± 2.9*	3.3 ± 0.53*
Костный мозг	1.48 ± 0.05	0.35 ± 0.02	—	—	—	—	6.56 ± 1.4*	3.36 ± 1.45*

Единицы измерения содержания МДА в тканях: нмоль/мг; ДК в тканях: единицы оптической плотности/мг.
* — p < 0.001 (по сравнению с показателями ПОЛ при инфаркте миокарда).

Таким образом, все стадии острого панкреатита сопровождаются значительным повышением содержания в крови больных диеновых конъюгатов и малонового диальдегида. На стадии отека и смешанного панкреонекроза их концентрация нарастает, на стадии гнойно-некротических осложнений концентрации ДК и МДА снижаются.

В операционных биоптатах, взятых во время операции по поводу панкреонекроза, а также в тканях умерших от панкреонекроза больных, обнаружено высокое содержание ДК и МДА в поджелудочной железе, печени, селезенке, лимфатических узлах верхнего этажа брюшной полости и в костном мозге.

Определение в плазме крови и в системе плазмафереза ДК и МДА позволяет высчитать объем выводимых соединений ПОЛ как за один сеанс, так и за серию сеансов. Это, в свою очередь, позволяет более объективно оценить тяжесть СЭИ и эффективность плазмафереза.

Список литературы

1. Владимиров В.Г., Сергиенко В.И. Острый панкреатит. Экспериментально-клинические исследования. М., 1986.
2. Гольдберг А.А., Поберезкина Н.Б. Роль антиоксидантных факторов в патогенезе острого панкреатита. Клинич. хирургия, 1987, № 1. С. 23-24.
3. Григаревский В.П., Короткина Р.Н., Карелии. А.А. Роль ксантиноксидазы в генезе острого панкреатита. Патол. физиология и эксп. терапия, 1989. № 2. С. 60-62.
4. Кузовлев Н.Ф. 4-я конференция хирургов-гепатологов России и СНГ. Хирургия, 1997, №3. С. 77-79.
5. Савельев В.С., Буянов В.М., Очнев Ю.В. Острый панкреатит. - М., 1983. 240 с.
6. Тузикова З.А. Влияние молекул средней массы, выделенных из сыворотки крови обожженных, на процессы перекисного окисления липидов. Вопр. мед. химии. 1983, т. 39, № 3. С. 108-111
7. Kishimoto W., Nakao A., Nakano M., Takahushi A., Inaba H., Takagi H. Detection of superoxide free radicals in rats with acute pancreatitis. Pancreas. 1995, vol. 11(2), p. 122-126.
8. Levy P., Letteron P., Paye F., Molas G., Guimont M.C., Pessayre D., Bernades P., Roze C. In vivo assessment of lipid peroxidation in experimental edematous and necrotizing rat. pancreatitis. Pancreas. 1997, vol. 14(4), p. 350-354.
9. Nonaka A., Manube T., Kyogoku T., Tamura K., Tobe T. Nippon-Shokakibyō-Gakkai-Zasshi. 1990, vol. 87(5), p. 1212-1216.

10. Schoenberg M.H., Buchler M., Gaspar M., Stinner A. et al. Oxygen free radicals in acute pancreatitis of the rat. Gut. 1990, vol. 31(10), p. 1138-1143.
11. Simovic M.O., Bonham M.J., Abu-Ziban FM. et al. -Pancreas, 1997, vol. 15(1), p. 78-82.
12. Sweiry J.H., Mann G.E. Role of oxidative stress in the pathogenesis of acute pancreatitis. Scand-J-Gastroenterol-Suppl. 1996: vol. 219, p. 10-15.