

ИНГИБИРОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ ЛИПОПЕРОКСИДАЦИИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ПАНКРЕОНЕКРОЗЕ

Ю. П. Орлов, А. В. Ершов

Омская государственная медицинская академия

Desferal-Induced Inhibition of Lipid Peroxidation Processes in Experimental Pancreatic Necrosis

Yu. P. Orlov, A. V. Yershov

Omsk State Medical Academy

Цель исследования — уменьшить активность процессов гипероксидации при экспериментальном панкреонекрозе путем предварительного введения десферала, как хелатора ионов Fe^{2+} , а также определить степень участия ионизированного железа в интенсификации эндотоксикоза — одного из ведущих факторов развития ПОН. **Материалы и методы.** Эксперимент проведен на 60 белых крысах-самцах, у которых моделировался панкреонекроз путем введения аутожелчи в поджелудочную железу из расчета 0,25 мл/кг с перевязкой общего желчного протока непосредственно перед местом его впадения в двенадцатиперстную кишку. В эксперименте оценивали показатели эндогенной интоксикации (содержание олигопептидов) и интенсивность процессов свободнорадикального окисления. Также оценивали влияние на данные показатели профилактического введения десферала. **Результаты.** Выявлено, что предварительное (за 3 часа до моделирования панкреонекроза) введение десферала в дозе 80 мг/кг позволяет избежать потенцирования процессов ПОЛ, что существенно уменьшает степень эндотоксикоза, развивающегося при панкреонекрозе. **Заключение.** Данные эксперимента дают основания для использования десферала в клинической практике, как патогенетически обоснованного препарата, с целью «обрывающей терапии» одного из патогенетических факторов (окислительного стресса) при прогрессировании острого панкреатита. **Ключевые слова:** панкреонекроз, олигопептиды, перекисное окисление липидов, десферал.

Objective: To experimentally reduce the activity of hyperoxidative processes in experimental pancreatic necrosis, by preadministering desferal as a Fe^{2+} chelator, and to determine the implication of ionized iron in the intensification of endotoxemia, one of the leading risk factors of multiple organ dysfunctions. **Subjects and methods.** An experiment was carried out in 60 albino male rats in which pancreatic necrosis was simulated, by administering 0.25 ml of autobile per kg into the pancreas and by ligating the common bile duct just at the mouth of the duodenum. The parameters of endogenous intoxication (the levels of oligopeptides) and the rate of free radical oxidation processes were estimated in the experiment. The impact of prophylactic desferal administration on the parameters was also evaluated. **Results.** It has been ascertained that preadministration (3 hours before the simulation of pancreatic necrosis) of desferal in a dose of 80 mg/kg can prevent the potentiation of LPO processes, which substantially reduces endotoxemia that develops in pancreatic necrosis. **Conclusion.** The findings give grounds to use desferal in clinical practice as a pathogenetically warranted agent to perform an abolishing therapy for one of the pathogenetic factors (oxidative stress) in acute progressive pancreatitis. **Key words:** pancreatic necrosis, oligopeptides, lipid peroxidation, desferal.

Критические состояния у хирургических больных, как правило, сопровождаются развитием синдрома полиорганной недостаточности (ПОН), от успешного лечения которого во многом зависит исход основного заболевания [1]. Патогенез возникновения и течения ПОН крайне сложен и до конца не ясен. Ведущими патогенетическими факторами ПОН являются нарушения микроциркуляции, гипоксия, эндотоксикоз и вторичный иммунодефицит [2–4]. В последние годы появились публикации, позволяющие утверждать о важной роли окислительного стресса (ОС) в генезе различных синдромов и синдрома ПОН, в частности. По мнению многих авторов, главным звеном ОС является неконтролируемая и неуправляемая генерация активных форм кислорода (АФК) [5, 6]. Это не что иное, как следствие сочетания синдромов гипоксии, ишемии и последующей реперфузии [7]. Основными повреждающими факторами в возникающей ситуации становятся гидроксильный радикал и перекись водорода, а мишенью их патогенного действия являются полиненасыщенные жирные кислоты мембранных фосфолипидов [8].

Однако процессы гипероксидации неразрывно связаны с участием ионизированного железа (Fe^{2+}) в синтезе наиболее токсичных по отношению к большинству клеток и тканей радикалов кислорода [8]. Более того, ионы Fe^{2+} сами обладают высокой цитотоксической активностью, и, возможно, влияют как на тяжесть эндотоксикоза, так и на развитие синдрома ПОН у пациентов в критическом состоянии, например, при деструктивном панкреатите, в развитии которого участвуют гипоксия, ишемия, деструкция клеток (и клеточных компартмен-

тов). Основными повреждающими факторами в возникающей ситуации становятся гидроксильный радикал и перекись водорода, а мишенью их патогенного действия являются полиненасыщенные жирные кислоты мембранных фосфолипидов [8]. Однако процессы гипероксидации неразрывно связаны с участием ионизированного железа (Fe^{2+}) в синтезе наиболее токсичных по отношению к большинству клеток и тканей радикалов кислорода [8]. Более того, ионы Fe^{2+} сами обладают высокой цитотоксической активностью, и, возможно, влияют как на тяжесть эндотоксикоза, так и на развитие синдрома ПОН у пациентов в критическом состоянии, например, при деструктивном панкреатите, в развитии которого участвуют гипоксия, ишемия, деструкция клеток (и клеточных компартмен-

Сравнительные показатели Fe^{2+} -индуцированной хемилюминесценции ($M \pm m$)

Группа исследования	Показатели Fe^{2+} -индуцированной хемилюминесценции		
	Вспышка, усл. ед.	Светосумма, усл. ед. \times мин	Спонтанная светимость, усл. ед.
I ($n=10$)	$1,73 \pm 0,19^*$	$5,23 \pm 0,27^*$	$0,59 \pm 0,07^*$
II ($n=10$)	$0,57 \pm 0,09^\#$	$1,35 \pm 0,17^\#$	$0,36 \pm 0,04^\#$
III ($n=10$)	$1,22 \pm 0,02^*$	$0,72 \pm 0,01^*$	$0,31 \pm 0,04^*$

Примечание. * — $p < 0,05$ при сравнении между группами; # — $p < 0,05$ при сравнении с контролем.

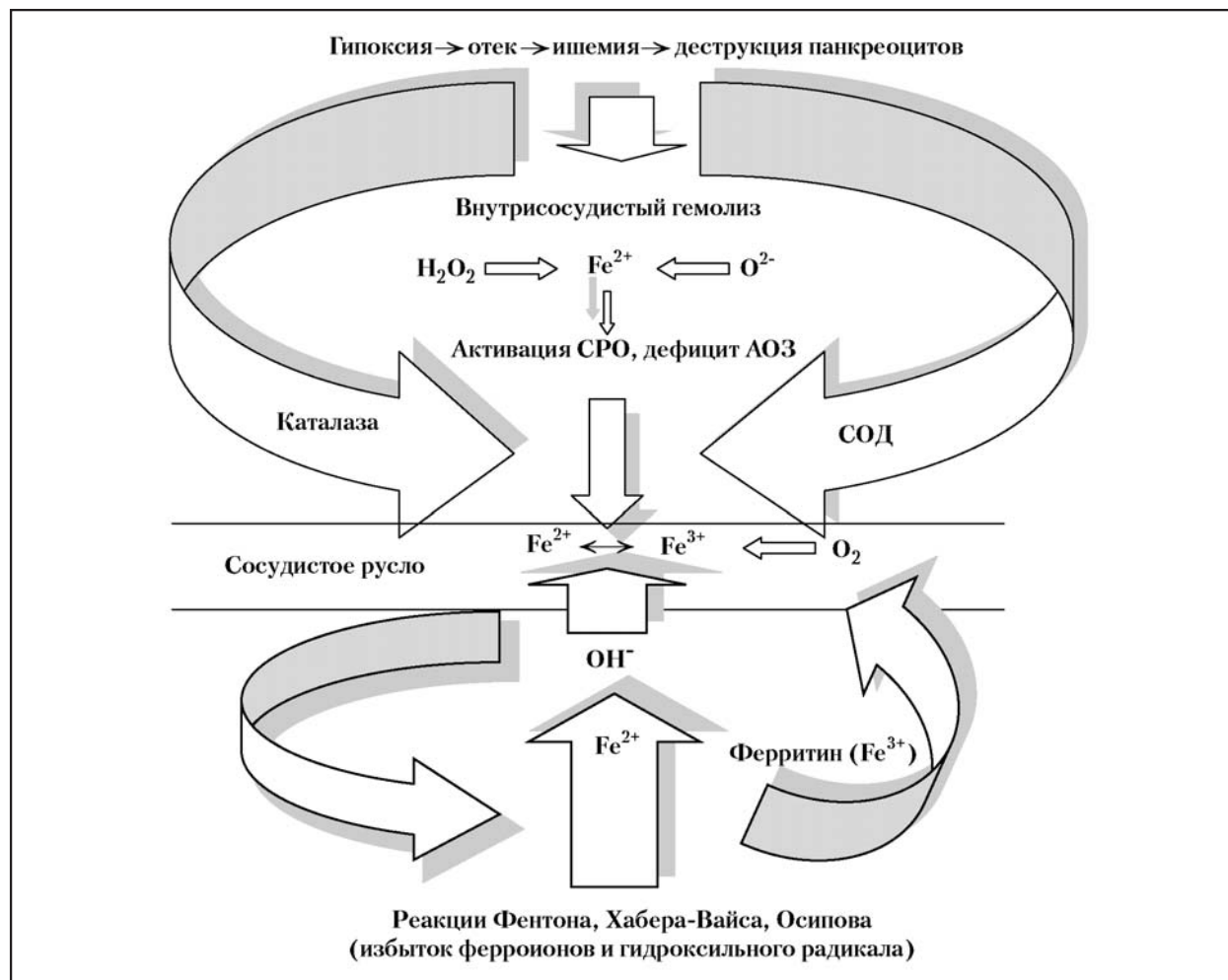


Рис. 1. Механизм избыточного накопления ионов двухвалентного железа, гидроксильного радикала и активации реакций свободнорадикального окисления.

тов) и реперфузия [9]. Наши собственные исследования подтверждают наличие нарушений обмена железа при остром панкреатите и панкреонекрозе [10, 11].

Цель исследования — уменьшить активность процессов гипероксидации при экспериментальном панкреонекрозе путем предварительного введения десферала, как хелатора ионов Fe^{2+} , а также определение степени участия ионизированного железа в интенсификации эндотоксикоза — одного из ведущих факторов развития ПОН.

Материалы и методы

Эксперименты были проведены на 60 белых беспородных крысах-самцах массой 200–250 грамм. В I группе ($n=20$) панкреонекроз воспроизводили путем введения аутожелчи в поджелудочную железу из расчета 0,25 мл/кг с перевязкой общего

желчного протока непосредственно перед местом его впадения в двенадцатиперстную кишку (Приоритетная справка по заявке на изобретение № 2004135980 от 08.12.2004). В группе II ($n=20$) за 3 часа до моделирования панкреонекроза внутрибрюшинно вводили десферал из расчета 80 мг/кг с последующим послойным ушиванием операционной раны. В контрольной группе III ($n=20$) проводили лапаротомию, ревизию органов брюшной полости и ушивание раны. Каждую группу разбили на 2-е подгруппы (по 10 животных), при этом животных 1-й подгруппы выводили из эксперимента через 12 часов после проводимых манипуляций, а 2-й — через 24 часа. В 1-й подгруппе определяли уровень свободнорадикального окисления, во второй — интенсивность эндогенной интоксикации.

Интенсивность процессов свободнорадикального окисления оценивали по уровню Fe^{2+} -индуцированной хемилюминесценции плазмы в модификации Р. Р. Фархутдинова [12]. При этом сравнивали значения следующих параметров: светосумма (усл. ед. \times мин), вспышка (усл. ед.) и спонтанная светимость (усл. ед.). Для оценки интенсивности эндотоксикоза определяли содержание олигопептидов в плазме крови животных по ме-

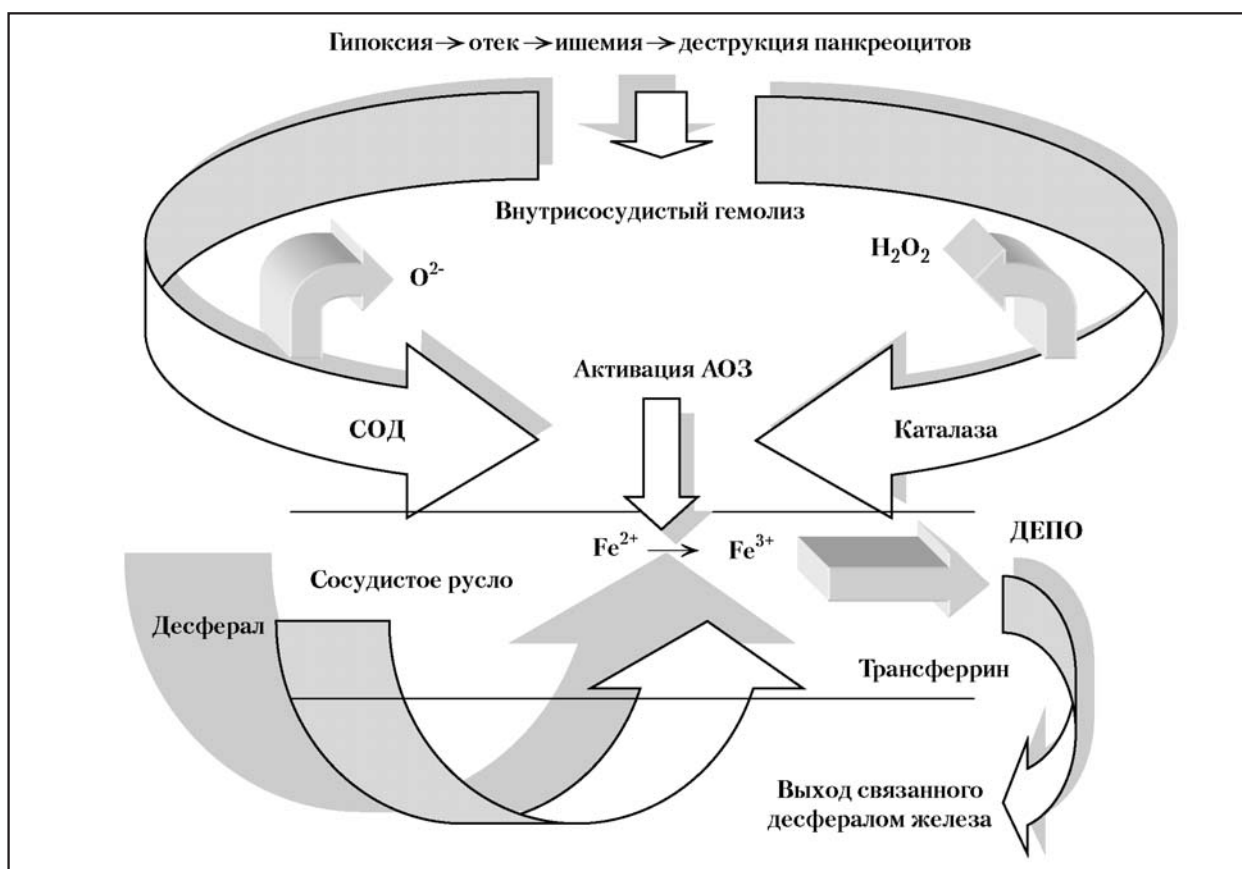


Рис. 2. Механизм связывания избытка ионизированного (Fe^{2+}) десфералом и активация эндогенных антиоксидантов.

тодике О. N. Lowry [13]. Для этого к 1 мл разведенного в соотношении 1:9 супернатанта, полученного при осаждении белков исследуемой среды раствором трихлоруксусной кислоты 150 г/л, добавляли 2 мл щелочно-медного реактива и оставляли при комнатной температуре на 10 мин. Затем добавляли 0,2 мл реактива Фолина-Чокалтеу, перемешивали и через 30–40 мин измеряли величину оптической плотности при $\lambda=750$ нм на спектрофотометре. В качестве стандарта использовали раствор альбумина с заведомо известной концентрацией. Изучаемые показатели обработаны методом вариационной статистики с вычислением средней арифметической (M), среднего квадратического отклонения (δ), коэффициента Стьюдента (t), показателей статистической достоверности (p).

Результаты и обсуждение

Как известно, показатели Fe^{2+} -индуцированной хемилюминесценции отражают присутствие в изучаемой системе (плазма крови) продуктов свободнорадикального окисления. Из данных таблицы видно, что в группе I на фоне экспериментального панкреонекроза имело место увеличение (по сравнению с контролем) всех параметров Fe^{2+} -индуцированной хемилюминесценции и, особенно, вспышки и светосуммы в 6–7 раз или на 50–60 и 50–55%, соответственно.

Данное обстоятельство необходимо связывать с активацией процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) на фоне экспериментального панкреонекроза, который сопровождается повреждением (или гибелью) определенной массы панкреоцитов за счет гипоксии, отека и ишемии стромы железы [14]. Актив-

ация процессов ПОЛ реализуется за счет поступления в кровоток ионов Fe^{2+} (рис. 1) и активного их включения в реакции Хабер-Вайса, Фентона и Осипова [8]. Источником же высвобождения Fe^{2+} являются, по всей видимости, разрушенные мембраны митохондрий панкреоцитов и выход ферритина, депонированного в слизистой оболочке кишечника, на фоне его пареза [6]. Полученные экспериментальные данные подтверждаются собственными клиническими наблюдениями, где у пациентов с панкреатитом (панкреонекрозом) отмечалось увеличение концентрации свободного гемоглобина, ферритина, сывороточного железа, общей железосвязывающей способности (ОЖСС) и увеличение процента насыщения железом трансферрина параллельно активации процессов ПОЛ, регистрируемых методом Fe^{2+} -индуцированной хемилюминесценции [15].

В группе II показатели Fe^{2+} -индуцированной хемилюминесценции существенно отличались от аналогичных данных I группы. Регистрировалось уменьшение всех изучаемых параметров: светосумма имела уменьшение на 20–25% от данных I группы, а показатели вспышки и спонтанной светимости снижались на 30–35 и 60–70%, соответственно. В данном случае предварительное введение десферала позволяло профилировать активацию процессов ПОЛ путем исключения основного субстрата (ионов Fe^{2+}) из вышеуказанных биохимических реакций (рис. 2). По всей видимости, устранение ионизированного железа позво-

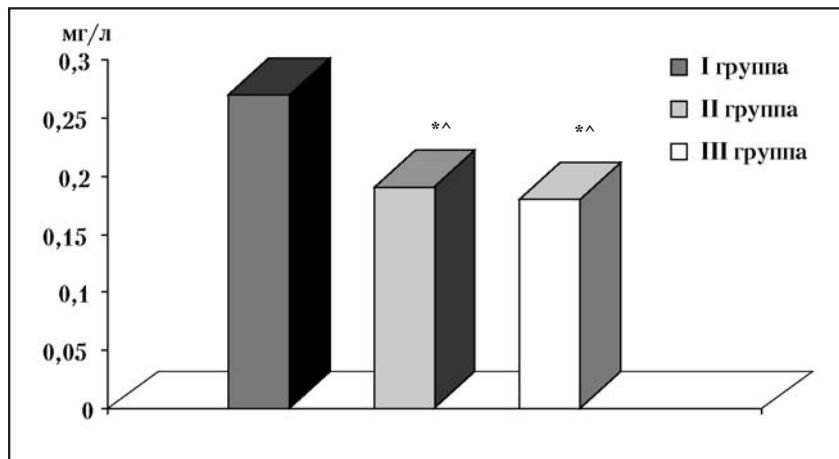


Рис. 3. Концентрация олигопептидов плазмы в исследуемых группах ($M \pm m$).

Примечание: * — $p < 0,05$ при сравнении данных с группой контроля; ^ — $p_{I-II} < 0,001$.

ляет собственной системе антиоксидантной защиты (СОД, каталаза, глутатион) справиться с избыточным количеством супероксидного радикала и перекиси водорода и не допускать продукции более активного радикала — гидроксильного радикала. Активация процессов ПОЛ характеризуется накоплением недоокисленных продуктов метаболизма, закислением внутри- и внеклеточной среды за счет избытка перекиси и лактата на фоне внутриорганной активности протео- и липолитических ферментов. В данном случае создаются условия для развития тяжелого эндотоксикоза, который и обуславливает высокую летальность при указанной патологии. Для определения степени интоксикации у экспериментальных животных было проведено исследование уровня олигопептидов (рис. 3).

Из данных, представленных на рис. 3 видно, что концентрация олигопептидов в I группе достоверно выше (0,27 мг/л), чем в контроле (0,18 мг/л), что указывает на наличие высокой степени эндотоксикоза при созданном экспериментальном панкреонекрозе. Однако предварительное введение десферала позволило существенно (практически до нормы) уменьшить концентрацию олигопептидов (0,19 мг/л), как

одного из маркеров эндотоксикоза. Это, по нашему мнению, подтверждает значимую роль ионизированного железа в развитии эндотоксикоза при критических состояниях различной этиологии [15] и панкреонекроза, в частности.

В данном контексте следует отметить, что в настоящее время проводятся поиски путей «обрывающей терапии», которая позволила бы избежать прогрессирующего панкреатита с исходом в панкреонекроз, при котором летальность достигает 20–25% [14]. Данные экспериментально-

го исследования и собственные клинические наблюдения [11, 15] дают основания для включения в программу «обрывающей терапии» десферала, как патогенетически обоснованного препарата.

Заключение

Таким образом, результаты проведенных исследований указывают на активное участие ионов Fe^{2+} в инициации процессов ПОЛ и эндотоксикоза при экспериментальном панкреонекрозе, что подтверждается данными Fe^{2+} -индуцированной хемилюминесценции и увеличением концентрации олигопептидов в плазме крови животных. Предварительное (за 3 часа до моделирования панкреонекроза) введение десферала в дозе 80 мг/кг позволяет избежать потенцирования процессов ПОЛ, что существенно уменьшает степень эндотоксикоза, развивающегося при панкреонекрозе. Данные эксперимента дают основания для использования десферала в клинической практике, как патогенетически обоснованного препарата, с целью «обрывающей терапии», одного из патогенетических факторов ОС при прогрессировании острого панкреатита.

Литература

1. Пасечник И. Н. Окислительный стресс и критические состояния у хирургических больных. Вестн. интенс. терапии 2004; 3: 27–30.
2. Сапрын А. Н., Калинина Е. В. Окислительный стресс и его роль в механизмах апоптоза и развитии патологических процессов. Успехи биол. химии 1999; 39: 289–326.
3. Knight J. A. Free radicals: their history and current status in aging and disease. Ann. Clin. Lab. Sci. 1998; 28: 331–346.
4. McCord J. M. The evolution of free radical and oxidative stress. Am. J. Med. 2000; 108: 652–659.
5. Betteridge D. J. What is oxidative stress? Metabolism 2000; 49 (1): 3–8.
6. Gutteridge J. M., Halliwell B. Free radical and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. In: Ann. N.Y. Acad. Sci. 2000; 899: 136–147.
7. Биленко М. В. Ишемические и реперфузионные повреждения органов. М: Медицина; 1989.
8. Владимиров Ю. А. Свободные радикалы и антиоксиданты. Вестн. РАМН 1998; 7: 43–51.
9. Баркова Э. Н., Сивков О. Г., Кузнецов Э. В. и др. Ранняя диагностика эндотоксикоза и прогнозирование полиорганной недостаточности при сепсисе. В кн.: Тез. докл. 9 съезд Федерации анестезиологов и реаниматологов. 27–29 сентября. Иркутск; 2004. 24–25.
10. Орлов Ю. П. Роль ионизированного железа в генерации активных форм O_2 в процессе перекисного окисления липидов и перспективы использования дефероксамина как ингибитора свободнорадикального окисления. Омский науч. вестн. 2005; 5 (3): 211–215.
11. Орлов Ю. П., Долгих В. Т. Влияние свободного гемоглобина на тяжесть нарушений сосудистой микроциркуляции и его роль в развитии критических состояний. В кн.: Болезни цивилизации в аспекте учения В. И. Вернадского; Материалы 3 междунар. конференции. М: Изд-во РУДН; 2005. 265–267.
12. Фархутдинов Р. Р., Лиховских В. А. Хемилюминесцентные методы исследования свободно-радикального окисления в биологии и в медицине. Уфа; 1995.
13. Lowry O. N., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. Protein measurement with the folin reagent. J. Biol. Chem. 1951; 193 (1): 265–275.
14. Толстой А. Д., Гольцов Р. В. Возможности «обрыва» деструктивного процесса на ранних стадиях панкреонекроза. Общая реаниматология 2005; 1 (3): 58–60.
15. Орлов Ю. П. Роль нарушений обмена железа в патогенезе эндотоксикоза при критических состояниях хирургического профиля. В кн.: Критические состояния у шахтеров при заболеваниях и техногенных катастрофах. Новокузнецк; 2005. 305–311.

Поступила 02.05.06