

О.А. Терещенко, В.И. Сергиенко,
Э.А. Петросян, А.А. Боташев, Ю.В. Помещик

Роль свободнорадикального окисления и эндотелиальной дисфункции в патогенезе желчного перитонита

Кубанский государственный медицинский университет, Краснодар

Резюме. В эксперименте на животных с желчным перитонитом в крови выявлен рост веществ средней и низкой молекулярной массы с дисбалансом, между процессом их синтеза и элиминации. Одновременно наблюдалось повышение концентрации первичных и вторичных продуктов перекисидации в плазме и на эритроцитах. На фоне иницирования процессов окислительного стресса отмечалось повышение каталазной активности крови, снижение пероксидазной активности и концентрации церулоплазмينا, увеличение количества десквамированных эндотелиоцитов, концентрации эндотелина-1 и фактора Виллинбрата. Установлено, что на фоне процессов окислительного стресса происходят метаболические и функциональные расстройства, приводящие к эндотелиальной дисфункции, маркеры которой можно рассматривать в диагностике желчного перитонита.

Ключевые слова: желчный перитонит, свободнорадикальное окисление, каталазная активность, церулоплазмин, эндотелиальная дисфункция, эндотелиоциты, окислительный стресс.

Введение. Несмотря на достижения современной хирургии, желчный перитонит (ЖП) и в настоящее время является довольно опасным и тяжёлым осложнением в хирургии вследствие отсутствия специфических признаков и скрытого течения патологического процесса [1]. Одним из путей развития ЖП является истечение желчи в свободную брюшную полость в результате различного рода посттравматических и огнестрельных повреждений в мирное и военное время [12, 15]. В целом, ЖП представляет собой сложное переплетение местных симптомов и общих нарушений, что затрудняет получение точной патогномоничной информации [16]. Современные представления о патогенезе эндогенной интоксикации при перитонитах, основывается на признании ведущей роли в нём эндотелиальной дисфункции (ЭД) [3]. При этом окислительный стресс является одним из основных механизмов развития воспаления брюшины при перитоните вне зависимости от этиологии [10].

Цель исследования. Изучить роль процессов свободнорадикального окисления и эндотелиальной дисфункции в патогенезе экспериментального ЖП.

Материалы и методы. Экспериментальная часть работы выполнена на 31 собаке-самцах, весом $15,3 \pm 1,1$ кг, разделенных на две группы: опытную (26 животных) и контрольную (31 животное). Для определения лабораторных показателей нормы были взяты все животные (31), из которых 5 были выведены из опыта для забора биоптатов, оставшиеся 26 сформировали опытную группу. У последних создавали модель 24-часового ЖП [7].

Важным аспектом процессов свободнорадикального окисления (СРО) при перитонитах является нарушение естественного протеолиза с появлением большого количества длинных фрагментов белковых молекул, среди которых особое внимание заслуживают вещества низкой и средней молекулярной массы (ВНСММ) [6]. Нормальная спектрограмма плазмы крови при длинах волн (λ) 238 и 242 нм имеет сопряжение с осью абсцисс (как правило, в данном диапазоне регистрируются вещества катаболического происхождения: ксенобиотики, продукты распада клеток тканей, микробной природы и др.). Поэтому появление высоких значений экстинкций (Е) при λ 238, 242 и 246 нм всегда свидетельствует о патологических процессах в организме. Расчет производился путем интегрального измерения площади фигуры, образованной осью абсцисс и полученными значениями Е для плазмы и эритроцитов: $VNSMM_{пл, эр} = (E_{238} + E_{250} + E_{260} + E_{270} + E_{280} + E_{290} + E_{300} + E_{310}) \times 10$ у. е. Определение качественных изменений пула ВНСММ в плазме и эритроцитах проводили на основании анализа спектрофотометрических кривых поглощения ВНСММ на аппарате «СФ-2000». Исследование степени загруженности транспортной системы эритроцитов проводили с помощью коэффициента (К), который показывает распределение ВНСММ между белками плазмы и гликокаликсом эритроцитов. Для анализа спектра изучаемого пула ВНСММ рассчитывался катаболический коэффициент (КК), как отношение величины площади под спектральной кривой поглощения в диапазоне длин волн 238–260 нм к величине площади в диапазоне λ 270–298 нм: $KK = (E_{238} + E_{250} + E_{260}) / (E_{270} + E_{280} + E_{290} + E_{298})$. Для изучения направленности изменений ВНСММ рассчитывали катаболический (КП) и

анаболический пулы (АП) в плазме и на эритроцитах: $KП=(E_{238}+E_{250}+E_{260})\times 10$; $АП=(E_{270}+E_{280}+E_{290}+E_{298})\times 10$.

Определение продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) проводилось по уровню первичных продуктов, к которым относятся диеновые конъюгаты (ДК) и вторичных продуктов – малонового диальдегида (МДА) [4]. Для изучения антиоксидантной системы крови (АОС) определяли каталазную (КАК) [5] и пероксидазную активность крови (ПАК) [8], а также концентрацию церулоплазмينا (ЦП) [11].

Концентрацию эндотелина-1 (Et-1) и фактор Виллинбрата (vWF) в плазме крови определяли методом иммуноферментного анализа на анализаторе «StatFax» с набором реактивов «Biomedica Group» и «Axis» (Соединенные Штаты Америки) соответственно. Количество циркулирующих эндотелиальных клеток [17] и десквамированных эндотелиоцитов (ДЭ) считали в двух сетках камеры Горяева методом фазово-контрастной микроскопии, а результат умножали на 104/л. Уровень метаболитов оксида азота (NO) в плазме и нейтрофильных гранулоцитах определяли по методике, предложенной П.П. Голиковым с соавт. [2]. Морфологические исследования биоптатов брюшины проводили на срезах, окрашенных гематоксилин-эозином. Клинико-лабораторный контроль выполняли до и после создания модели 24-часового ЖП.

Эксперименты проведены в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации [9] и Правилами лабораторной практики [13].

Материал обработан с помощью пакета прикладных программ «Microsoft Excel» и «Statistica 6,0» для Windows. Многокомпонентная математическая обработка данных включала параметрические и непараметрические критерии Стьюдента и Вилкоксона – Манна – Уитни. Результаты считались достоверными при двустороннем уровне значимости $p<0,05$. При построении кривых использовалась методика сглаживания.

Результаты и их обсуждение. Состояние животных с 24-часовым ЖП характеризовалось как средней тяжести. При лапаротомии определялось до 250 мл серозно-фибринозного выпота с примесью жёлчи.

При макроскопическом осмотре брюшина и стенки тонкой кишки покрыты множественными очагами геморрагии с налетом фибрина. При морфологическом исследовании препаратов париетальной брюшины обнаружен воспалительный отек, в участках деструкции наблюдалась очаговая лейкоцитарная инфильтрация, частичная десквамация мезотелия. В микроциркуляторном русле расширение капилляров со стазом и агрегацией эритроцитов.

У животных с 24-часовым ЖП наблюдался рост содержания в плазме ВНСММ до $28,5\pm 3,0$ у. е. против $7,9\pm 1,1$ у. е. в контрольной группе ($p<0,05$) и на эритроцитах до $32,6\pm 2,5$ у. е. против $15,5\pm 1,7$ у. е. ($p<0,05$) соответственно. Увеличение концентрации гидрофильных ВНСММ в плазме объясняется повышением катаболических процессов и всасыванием из брюшной полости и просвета кишечника токсических продуктов распада, в то время как рост гидрофобных ВНСММ указывает на развитие вторичной интоксикации. Менее интенсивная динамика роста ВНСММ на эритроцитах относительно его содержания в плазме объясняется ограниченной сорбционной возможностью гликокаликса эритроцитов и высокой степенью токсической загруженности эритроцитарных мембран, что подтверждается ростом коэффициента КПЛ/ЭР, отражающего соотношение плазменных и эритроцитарных метаболитов до $0,93\pm 0,11$ у животных с 24-часовым ЖП против $0,59\pm 0,16$ в контроле ($p<0,05$).

Рост интоксикации при развитии 24-часового ЖП подтверждается как количественными, так и качественными изменениями характера спектральных кривых ВНСММ (рис. 1).

Так, на кривой поглощения ВНСММ в плазме отмечается количественный рост поглощения на всех длинах волн, что является отражением активности метаболических процессов. Характерным признаком кривой поглощения у животных с 24-часовым ЖП является рост поглощения маргинальных фракций при $\lambda 238\div 250$ нм и $\lambda 300\div 310$ нм, что свидетельствует о росте содержания высокотоксичных продуктов воспалительного катаболизма. Появление второго пика на кривой поглощения при $\lambda=290$ нм характерно для

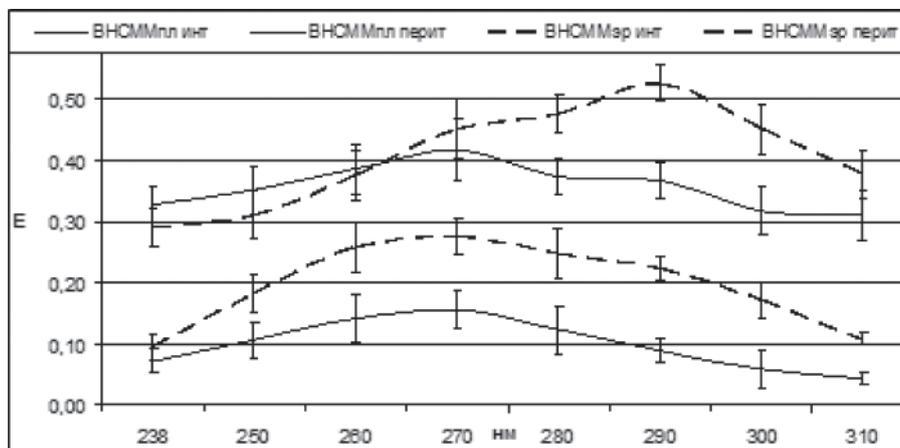


Рис. 1. Динамика показателей ВНСММ плазмы и эритроцитов у животных с 24-часовым ЖП

появления в крови ароматических продуктов катаболизма. Меняется также характер кривой поглощения ВНСММ на эритроцитах, где появляются два пика: первый при $\lambda=270$ нм, который отражает количественное увеличение ВНСММ и второй при $\lambda=290$ нм, являющийся следствием сорбции на мембране ароматических продуктов. Подобные изменения могут быть показателем окислительной деструкции гемоглобина, вызванной интенсификацией процессов ПОЛ на модифицированных эритроцитарных мембранах.

Развивающийся дисбаланс между образованием токсинов в крови и способностью систем организма их элиминировать подтверждается изменениями в соотношении кривых поглощения ВНСММ, которые отчетливо проявляются в области поглощения пептидных продуктов протеолиза (λ 238÷260 нм), где уровень ВНСММ в плазме превышает уровень ВНСММ на эритроцитах, т.е. образование этих продуктов выше возможностей их сорбции на эритроцитах. В то же время эритроциты продолжают интенсивно сорбировать ароматические и нуклеотидные ВНСММ в спектре λ 270÷310 нм. Подобный механизм, по-видимому, является защитным, который позволяет извлекать из кровотока наиболее токсичные продукты для организма.

Для оценки степени тяжести эндогенной интоксикации были исследованы показатели про- и антиоксидантной системы крови. Установлено, что у животных с 24-часовым ЖП отмечался рост концентрации ДК в плазме до $16,5 \pm 1,8$ отн. ед. против $6,7 \pm 1,0$ отн. ед. в контроле ($p < 0,05$), а на эритроцитах до $11,5 \pm 1,1$ отн. ед. против $2,95 \pm 0,5$ отн. ед. ($p < 0,05$) соответственно. Дальнейшее окисление ДК приводило к образованию вторичных продуктов ПОЛ, наиболее важным из которых является МДА. Рост последнего у животных с 24-часовым ЖП в плазме достигал $10,1 \pm 0,84$ мкмоль/л против $4,64 \pm 0,38$ мкмоль/л в контрольной группе ($p < 0,05$). При этом повышение МДА в плазме происходило более интенсивно, чем в эритроцитах, где его концентрация достигала $8,7 \pm 0,76$ мкмоль/л против $5,0 \pm 0,23$ мкмоль/л в контроле ($p < 0,05$). Менее интенсивный рост МДА в эритроцитах по сравнению

с ДК, объясняется большей устойчивостью АОС эритроцитов, тормозящей процессы СРО в основном на уровне первичных продуктов.

Таким образом, если рост ДК в эритроцитах можно отнести в разряд адаптивных реакций, то появление большого количества МДА в плазме является не только показателем активизации процессов СРО, но и фактором недостаточности АОС крови.

При изучении АОС крови у животных с 24-часовым ЖП отмечался рост КАК до уровня $11,8 \pm 0,50$ ммоль $H_2O_2/10^9$ эр/мин против $4,76 \pm 0,36$ ммоль $H_2O_2/10^9$ эр/мин в контрольной группе ($p < 0,05$), что, по-видимому, связано с защитной реакцией организма на рост процессов СРО. При этом одновременно наблюдалось достоверное снижение ПАК до 218 мкМ/мин/л против 438 мкМ/мин/л в контрольной группе ($p < 0,05$) и концентрации ЦП до $37,85 \pm 3,66$ мг/100мл против $49,79 \pm 1,66$ мг/100мл в контроле ($p < 0,05$) соответственно (рис. 2). Это свидетельствует об усилении процессов ПОЛ и ослаблении АОС крови.

Общеизвестно, что активация процессов СРО сопровождается эндотелиальной дисфункцией [12]. Так, при исследовании высокоспецифичных маркеров эндотелиальной дисфункции у животных с 24-часовым ЖП выявлен рост количества ДЭ в крови до $10,4 \pm 0,7 \times 10^4$ /л против $3,2 \pm 0,2 \times 10^4$ /л в контрольной группе ($p < 0,001$), уровня Et-1 до $482,0 \pm 83,0$ пмоль/л против $311,0 \pm 60,0$ пмоль/л ($p < 0,05$) и vWF до $1,84 \pm 0,1$ МЕ/мл против $1,39 \pm 0,09$ МЕ/мл в контроле ($p < 0,05$) соответственно.

Выявлено, что у животных с 24-часовым ЖП на фоне развития синдрома эндогенной интоксикации наблюдается эндотелиальная дисфункция, которая сопровождается повреждением эндотелиоцитов. У этих животных установлена достоверная прямая корреляционная связь между количеством ДЭ, уровнем Et-1 и концентрацией vWF. Это подтверждает наличие эндотелиальной дисфункции у животных с ЖП на фоне эндогенной интоксикации. Кроме того, установлена сильная прямая корреляционная связь между содержанием ДЭ, с одной стороны, и уровнем Et-1 и vWF ($r =$

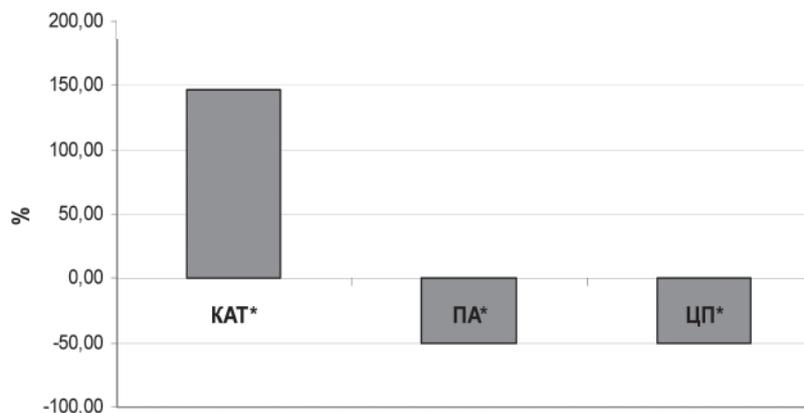


Рис. 2. Относительные изменения показателей АОС у животных с 24-часовым ЖП.

* – отличия по сравнению с контрольными животными, $p < 0,05$

0,72; $p < 0,001$ и $r = 0,80$; $p < 0,001$) – с другой, что подтверждает их высокую специфичность как маркеров эндотелиальной дисфункции и роль этих маркеров в патогенезе желчного перитонита.

Из всех факторов, синтезируемых эндотелием, роль модератора основных функций эндотелия принадлежит NO, который является нестабильной молекулой и обладает свойствами оксиданта [3, 9]. Так, у животных с 24-часовым ЖП отмечался достоверный рост содержания метаболитов NO в плазме до $5,2 \pm 0,2$ мкмоль/л против $4,3 \pm 0,2$ мкмоль/л у животных контрольной группы ($p < 0,05$). Очевидно, что в этом определенную роль играет активация фагоцитарной активности нейтрофилов.

Данное предположение находит подтверждение в результате достоверного роста NO в супернатанте культивируемых нейтрофилов крови у животных с 24-часовым ЖП до $2,32 \pm 0,06$ нмоль на 5×10^6 лейкоцитов против $0,91 \pm 0,09$ нмоль на 5×10^6 лейкоцитов в контроле ($p < 0,001$), что может быть связано с экспрессией индуцибельной iNOS-синтазы, эффект которого направлен на поддержание баланса структурных и функциональных нарушений в организме. Не исключено, что гиперпродукция NO направлена на уничтожение патогенных микробов и окисление токсинов.

Заключение. Установлено, что при развитии ЖП на фоне процессов свободнорадикального окисления происходят метаболические и функциональные расстройства, причиной которых является эндотелиальная дисфункция. Обнаруженное нарушение продукции изучаемых маркеров эндотелиальной дисфункции можно рассматривать в качестве нового направления в совершенствовании диагностики ЖП.

Литература

1. Багненко, С.Ф. Желчный перитонит как осложнение лапароскопической холецистэктомии / С.Ф. Багненко, В.Б. Мосягин, Е.А. Карпова // Эндоскопическая хирургия. – 2000. – № 2. – С. 6–7.
2. Голиков, П.П. Оксид азота и перекисное окисление липидов как факторы эндогенной интоксикации при неотложных состояниях / П.П. Голиков [и др.] // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2000. – № 2. – С. 6–9.

3. Дисфункция эндотелия / под ред. Н.Н. Петрищева. – СПб., 2003. – 184 с.
4. Камышников, В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике / В.С. Камышников. – Минск: Беларусь, 2002. – Т 1. – 495 с.
5. Крайнев, С.И. Методика параллельного определения каталазной активности интактных эритроцитов, активности и каталитической емкости гемолизата в одном объеме крови / С.И. Крайнев // Лаб. дело. – 1967. – № 9. – С. 562–563.
6. Малахова, М.Я. Эндогенная интоксикация как отражение компенсаторной перестройки обменных процессов в организме / М.Я. Малахова // Эфферентная терапия. – 2000. – № 4. – С. 3–14.
7. Пат. № 2175784 Российская Федерация, МКИ6 А61 В 17/00. Способ моделирования желчного перитонита / Э.А. Петросян [и др.]. – Опубл. 10.11.2001, БИ. – № 31.
8. Попов, Т. Метод определения пероксидазной активности крови / Т. Попов, Л. Нейковская // Гигиена и санитария. – 1971. – № 10. – С. 89–90.
9. Правила лабораторной практики / Приказ МЗ РФ № 708н от 23.08.2010 г. // Российская газета. – 2010. – 22 окт.
10. Савельев, В.С. Эндотелиальная дисфункция: современное состояние вопроса / В.С. Савельев, В.А. Петухова // Хирургия. – 2008. – № 1. – С. 3–11.
11. Тен, Э.В. Экспресс-метод определения активности церулоплазмина в сыворотке крови / Э.В. Тен // Лаб. дело. – 1981. – № 6. – С. 334–335.
12. Томашук, И.П. Лечение инфекционно-раневых перитонитов / И.П. Томашук, Я.С. Кукуруз, И.И. Томашук // Анналы хирургической гепатологии. – 1998. – № 3. – С. 287.
13. Хельсинкская декларация всемирной медицинской ассоциации: рекомендации для врачей по проведению биомедицинских исследований на людях // Междунар. журнал мед. практики. – 2000. – № 4. – С. 41–42.
14. Michael, T. Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potential / T. Michael, M. Gewaltig, G. Kojda // Cardiovascular research. – 2002. – Vol. 55. – P. 205–260.
15. Carrillo, E.H. Delayed laparoscopy facilitates the management of biliary peritonitis in patients with complex liver injuries / E.H. Carrillo [et al.], // Surg. endosc. – 2001. – Vol. 15. – № 3. – P. 319–322.
16. Lochan, R. Bile peritonitis due to intra-hepatic bile duct rupture / R. Lochan, B.V. Joypaul // World j. gastroenterol. – 2005. – Vol. 11. – № 42. – P. 6728–6729.
17. Hladovec, J. Circulating endothelial cells in acute myocardial infarction and angina pectoris / J. Hladovec [et al.] // Klin. wochenshr. – 1978. – Vol. 56. – P. 1033–1036.

O.A. Tereschenko, V.I. Sergienko, E.A. Petrosyan, A.A. Botashev, Yu.V. Pomeschik

Role of free radical oxidation and endothelial dysfunction in pathogenesis of experimental choleperitonitis

Abstract. In the experiment on animals with choleperitonitis the growth of medium and low molecular weight substances with the disbalance between the processes of their genesis and elimination was identified. At the same time we observed increase of concentration of peroxidation primary and secondary products in plasma and on erythrocytes. Against the initiation of oxidative stress processes there was the increase of blood catalase activity, the decrease of blood peroxidase activity and the concentration of hepatocuprein, a growing number of desquamated endotheliocytes, the concentration of endothelin-1 and von Willebrand factor. These results indicate that against the processes of oxidative stress the metabolic and functional disorders takes place, that lead to the endothelial dysfunction. Markers of endothelial dysfunction can be considered in the diagnosis of choleperitonitis.

Key words: choleperitonitis, free radical oxidation, catalase activity, ceruloplasmin, endothelial dysfunction, endothelial cells, oxidative stress.

Контактный телефон: +7-903-410-11-88; e-mail: superego_ksmu@mail.ru