

ВЛИЯНИЕ ОЗОНА НА ПРОЦЕССЫ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ ПРИ ОСТРОМ ОБТУРАЦИОННОМ ХОЛЕСТАЗЕ

Беляев А. Н., Костин С. В., Беляев С. А., Захватов А. Н.

ФГБОУ ВО «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва»

EFFECTS OF OZONE ON FREE RADICAL OXIDATION IN ACUTE OBSTRUCTIVE CHOLESTASIS

Belyaev A.N, Kostin S.V, Belyaev S.A, Zakhvatov A.N

Ogarev Mordovia State University

Беляев А. Н. — заведующий кафедрой общей хирургии

Костин С. В. — к.м.н., доцент кафедры общей хирургии

Беляев С. А. — д.м.н., профессор кафедры общей хирургии

Захватов А. Н. — к.м.н., доцент кафедры общей хирургии

Belyaev A. N. — MD, Head of The Department of General surgery

Kostin S. V. — PhD, associate Professor of The Department of General surgery

Belyaev S. A. — MD, Professor of The Department of General surgery

Zakhvatov A. N. — PhD, associate Professor of The Department of General surgery

Беляев

Александр Назарович

Belyaev Alexander N.

belyaevan@mail.ru

Резюме

Цель работы. Изучить в эксперименте эффективность внутривенных инфузий озонированного 0,9% раствора натрия хлорида в коррекции процессов свободнорадикального окисления при остром обтурационном холестазе.

Материалы и методы. У 40 собак под тиопентал-натриевым (0,045–0,050 г/кг массы тела) наркозом моделировали механическую желтуху путем наложения петли удавки на общий желчный проток. Животные были распределены на 4 серии. В 1 и 2 сериях после моделирования холестаза на 3 сутки проводили декомпрессию холедоха. В 3 и 4 сериях после выполнения декомпрессии холедоха в течение 4 суток проводили инфузии 0,9% раствора натрия хлорида (ФР) и озонированного изотонического раствора натрия хлорида (ОФР). Изучение про- и антиоксидантного статуса организма проводилось определением уровня малонового диальдегида (МДА) и каталазы, измерением интенсивности свечения индуцированной хемилюминесценции плазмы (I_{\max}), а также светосуммы хемилюминесценции (S). Данные показатели определялись также в гомогенате поджелудочной железы.

Результаты. При перевязке общего желчного протока уровень общего билирубина на 3 сутки эксперимента превышал в 40,3 раза исходные показатели. Показатель I_{\max} увеличивался в 2,7 раза, светосумма хемилюминесценции в 2,6 раза относительно исходных величин. При внутривенных инфузиях озона на 7 сутки максимальная интенсивность хемилюминесценции снижалась в 1,7 раза, показатель S — на 68%.

Заключение. У животных развитие механической желтухи сопровождалось возрастанием интенсивности свободнорадикальных процессов. Инфузии ОФР у животных с обтурационным холестазом приводило к значительному снижению интенсивности свободнорадикальных процессов, что выражалось уменьшением количества продуктов липопероксидации и повышением активности антиоксидантных ферментов.

Ключевые слова: печень, поджелудочная железа, свободнорадикальное окисление, обтурационный холестаз, озон

Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология 2017; 141 (5): 39–42

Summary

Objective: The goals of this investigation is to study experimentally the effectiveness of intravenous infusions of ozonated 0.9% sodium chloride solution for the correction of free-radical oxidation processes in acute obstructive cholestasis.

Materials and methods: In 40 dogs under thiopental sodium (0.045–0.050 g / kg body weight) anesthesia was simulated a mechanical jaundice with the applying a loop on the common bile duct. Animals were divided into 4 series. In the first and second series after the simulation of cholestasis the common bile duct was decompressed on the third day. In the 3rd and 4th series after the decompression of the common bile duct for 4 days it were 0.9% chloride and ozonized isotonic sodium chloride solution (OIS) infused. The pro- and antioxidant status were measured with the help of the luminescence induced plasma chemiluminescence intensity (I_{\max} , S) in homogenates of the pancreas, the determination of the level of malondialdehyde (MDA) and catalase.

Results. When ligation common bile duct the total bilirubin level was 40.3 times higher on the 3rd day of the experiment than in baseline. I_{max} index was increased by 2.7 times, chemiluminescence light sum — by 2.6 times of the original value. When ozone intravenous infusion for 7 days the maximal chemiluminescence intensity was decreased by 1.7 times and S parameter — by 68 %.

Conclusion. Progressive obstructive jaundice in animals was accompanied by an increase in the intensity of free radical processes. But the infusions OIS followed by a significant decrease in the intensity of free radical processes that expressed by the decreasing in the amount of lipid peroxidation and was accompanied by increasing of antioxidant enzymes activity.

Keywords: liver, pancreas, free radical oxidation, obstructive cholestasis, ozone

Experimental'naya i Klinicheskaya Gastroenterologiya 2017; 141 (5): 39–42

Введение

К настоящему времени имеются публикации о патологических процессах, которые возникают в жизненно важных органах и системах организма при механической желтухе [1, 2, 3]. Высокая степень корреляции между уровнем перекисного окисления липидов в крови и выраженностью цитолиза гепатоцитов свидетельствуют об участии свободнорадикального окисления (СРО) липидов в механизмах повреждения печени. Это обосновывает включение в лечебный комплекс больных с заболеваниями печени лекарственных препаратов,

обладающих антиоксидантными свойствами [4]. Медицинский озон является универсальным, многокомпонентным средством, влияющим на ключевые звенья патогенеза обтурационного холестаза и в полной мере может быть использован в комплексной терапии данного состояния [5, 6, 7].

Цель работы: изучить в эксперименте эффективность внутривенных инфузий озонированного 0,9 % раствора натрия хлорида в коррекции процессов свободнорадикального окисления при остром обтурационном холестазе.

Материалы и методы

Для решения поставленных задач проведены эксперименты на 40 собаках обоего пола массой 12–26 кг под внутривенным тиопентал-натриевым (0,045–0,050 г/кг массы тела) наркозом. Исследования проводились в соответствии с требованиями Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным (2000 г.).

Механическую желтуху моделировали путем наложения петли удавки на общий желчный проток (удостоверение на рационализаторское предложение № 101, выдано 01.04.2003 г. ГОУВПО «МГУ имени Н.П. Огарёва»).

При обтурации холедоха наиболее выраженные изменения в организме животного возникали на третьи сутки, поэтому релапаротомию, с целью декомпрессии билиарного тракта производили в эти сроки.

Животные были распределены на 4 серии. В 1 серии экспериментов (n=10) проводили моделирование механической желтухи путем наложения лигатурной перетяжки на общий желчный проток. Во 2 серии экспериментов (n=10) на третьи сутки моделирования механической желтухи производилось удаление петли удавки с холедоха. В последующих экспериментах моделирование обтурационной желтухи и декомпрессию желчевыводящих путей

дополняли проведением инфузионной терапии в течение 4 дней 1 раз в сутки. В 3 серии (n=10) сразу после выполнения декомпрессии желчевыводящих путей проводили внутривенное введение 0,9 % раствора натрия хлорида (физиологического раствора — ФР) в объеме 20 мл/кг. В 4 серии (n=10) экспериментов изучали влияние озонированного изотонического раствора натрия хлорида (озонированного физиологического раствора — ОФР). ОФР получали путем барботирования 0,9 % раствора натрия хлорида озono-кислородной смесью, с помощью озонатора АОН-01-Арз. Концентрация озона в озonoкислородной смеси на выходе из озонатора составляла 2500 мкг/л.

Активность каталазы плазмы крови определяли по М.А. Королюк, малонового диальдегида (МДА) по С.Г. Конюховой. Изучение хемилюминесценции сыворотки крови и в гомогенате поджелудочной железы проводилось на универсальном полуавтоматическом анализаторе. В качестве индуктора свечения использовали перекись водорода. Изучали показатель максимальной индуцированной хемилюминесценции (I_{max}, усл. ед.), отражающую максимальную способность объекта к перекисному окислению липидов; светосумму (S, усл. ед.) — буферную емкость антиоксидантной системы.

Результаты

Содержание общего билирубина на 3 сутки обтурации холедоха было выше исходного в 40,3 раза

Показатель I_{max} увеличивался на 3 сутки эксперимента в 2,7 раза, а на 15 сутки в 4,7 раза (p<0,01)

Исследуемые показатели	Исходные показатели	Этапы эксперимента (сутки)					
		3		5		7	
		ФР	ОФР	ФР	ОФР	ФР	ОФР
МДА мкмоль/л	3,68	14,76	17,24	14,72	11,53	13,29	7,86
	±0,32	±1,33	±0,79	±2,06	±0,69	±1,56	±0,45
	—	<0,001	<0,001	<0,01	<0,001	<0,001	<0,01
Каталаза мккат/л	3,75	2,58	2,36	2,62	3,32	2,86	3,74
	±0,22	±0,19	±0,17	±0,2	±0,31	±0,27	±0,18
	—	<0,01	<0,05	<0,01	>0,05	<0,05	>0,05
I _{тах} усл. ед.	1,22	4,17	4,36	3,56	2,94	3,52	2,51
	±0,2	±0,14	±0,26	±0,2	±0,31	±0,26	±0,17
	—	<0,001	<0,001	<0,001	<0,01	<0,001	<0,01
S усл. ед.	15,7	51,3	52,5	44,5	37,1	43,6	31,4
	±1,32	±3,17	±2,39	±3,62	±2,83	±3,47	±2,9
	—	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,01
	—	—	—	>0,05	<0,01	>0,05	<0,01

Таблица 1.
Динамика показателей свободнорадикального окисления на фоне декомпрессии холедоха с внутривенным вливанием ФР и ОФР

Примечание:
p — достоверность отличий величин относительно исходных данных;
p₁ — достоверность отличий величин относительно 3 суток холестаза

относительно исходных величин. Светосумма хемилюминесценции на 3 и 15 сутки холестаза превышала исходные данные в 2,6 и 4 раза (p<0,05).

После восстановления пассажа желчи по билиарному тракту и инфузий 0,9 % раствора натрия хлорида (3 серия экспериментов) I_{тах} и S соответствовали 3,52±0,26 усл. ед. и 0,083±0,008 усл. ед., что превышало исходные показатели на 288 и 2,5 % соответственно. Содержание антиоксидантного фермента — каталазы в плазме крови повысилось до 2,86±0,27 мккат/л при в/в введении, оставаясь ниже исходного показателя (3,75±0,22 мккат/л) на 31 % (табл. 1).

Данные показатели свидетельствовали о незначительном влиянии инфузий физиологического раствора натрия хлорида на коррекцию процессов свободнорадикального окисления после декомпрессии общего желчного протока.

В ответ на проведение озонотерапии уровень общего билирубина снижался в 19 раз (p<0,001).

Динамика активности каталазы указывала на восстановление дефицита ферментов антиоксидантной защиты. Ее содержание достигало к седьмым суткам эксперимента 3,74±0,18 мккат/л, что превышало показатели в серии с терапией изотоническим раствором натрия хлорида на 31 %. В то же время концентрация МДА в плазме крови

прогрессивно снижалась с 13,29±1,56 мкмоль/л при в/в введении 0,9 % натрия хлорида до 7,86±0,45 мкмоль/л после инфузий ОФР.

Положительная динамика восстановления баланса между процессами СРО и системой антиоксидантной защиты подтверждалась изучением хемилюминесценции плазмы. Показатель I_{тах} снижался в 1,7 раза относительно третьих суток эксперимента, составляя к окончанию лечения 2,51±0,17 усл. ед. Показатель светосуммы (S) уменьшаясь с 52,5±2,39 на третьи сутки до 31,4±2,9 усл. ед. к окончанию исследования, превышал исходный уровень в 2 раза.

Изучение динамики свободнорадикальных процессов в гомогенате ткани поджелудочной железы, подтверждало способность ОФР снижать органную интенсивность реакций перекисного окисления. Уровень МДА уменьшался в 2,4 раза относительно 3 суток обтурации холедоха (с 24,53±0,81 мкмоль/л до 10,07±0,51 мкмоль/л). I_{тах}, на фоне внутривенной озонотерапии уменьшалась в 2 раза, составив на 7 сутки исследования 3,08±0,22 усл. ед.

Активность антиоксидантной системы поджелудочной железы к завершению эксперимента увеличивалась, что характеризовалось повышением уровня каталазы на 29 %, а также снижением светосуммы хемилюминесценции на 86 % относительно 3 суток наблюдения (табл. 2).

Обсуждение

Несмотря на оптимизацию хирургического лечения обтурационного холестаза, летальность при данной патологии остается высокой, в связи с развитием острой печеночной недостаточности [2] вследствие повреждения гепатоцитов как продуктами эндотоксикоза, так и повышенным уровнем свободных радикалов, вызывающих состояние окислительного стресса. Поэтому основным мероприятием по снижению осложнений и летальности при лечении МЖ является предупреждение развития острой печеночной недостаточности путем использования патогенетических методов лечения острого повреждения печени [3]. В последнее время

ведется активное изучение гепатопротекторных свойств озона при лечении заболеваний печени (5).

На фоне коррекции обтурационного холестаза внутривенными инфузиями 0,9 % раствора натрия хлорида после декомпрессии холедоха сохранялся дисбаланс между процессами ПОЛ и системой антиоксидантной защиты. Уровень МДА и I_{тах} в системном кровотоке превышал к окончанию исследования исходное содержание в 3,5 и 2,6 раза, а содержание каталазы было снижено в 1,3 раза. Светосумма хемилюминесценции была повышена в 2,5 раза (p<0,001), свидетельствуя о дефиците антиоксидантных ферментов.

Таблица 2.

Динамика показателей свободнорадикального окисления гомогенатов поджелудочной железы при введении ОФР на фоне декомпрессии холедоха

Примечание:

p — достоверность отличий величин относительно исходных данных.

Исследуемые показатели	Исходные показатели	3 сутки (n=4)	5 сутки (n=3)	7 сутки (n=3)
МДА мкмоль/л	6,12	24,53	16,73	10,07
	±0,33	±0,81	±1,02	±0,51
	—	<0,001	<0,001	<0,001
Каталаза мккат/л	4,71	3,35	4,12	4,31
	±0,21	±0,17	±0,21	±0,17
	—	<0,01	>0,05	>0,05
I _{max} усл. ед.	1,68	6,17	3,31	3,08
	±0,07	±0,12	±0,24	±0,22
	—	<0,001	<0,001	<0,01
S усл. ед.	21,4	73	41,3	39,2
	±0,97	±1,53	±2,05	±1,98
	—	<0,001	<0,001	<0,001
	—	—	<0,001	<0,001

Включение в комплекс лечебных мероприятий внутривенного введения озонированного 0,9 % раствора натрия хлорида при экспериментальном обтурационном холестаза сопровождалось положительной динамикой большинства исследуемых показателей.

Важным моментом, с точки зрения патогенетической коррекции обтурационного холестаза явилась положительная тенденция в восстановлении баланса между процессами перекисного окисления липидов и системой антиоксидантной защиты. При внутривенных инфузиях озона содержание МДА и максимальная интенсивность

хемилюминесценции снижались в 2,2 (p<0,001) и 1,7 (p<0,01) раза по сравнению с аналогичными показателями на третьи сутки эксперимента. Также происходило снижение показателя S на 68 % (p<0,01) и увеличение уровня каталазы на 58 % (p<0,01) в сравнении с данными после третьих суток обтурации холедоха.

При изучении хемилюминесценции гомогенатов поджелудочной железы было выявлено снижение показателя I_{max} в 2 раза, а светосуммы — в 1,9, указывая на корректирующее влияние озонотерапии не только на системном уровне (плазма крови), но, в большей степени на тканевом уровне.

Заключение

У животных развитие механической желтухи сопровождалось интенсификацией процессов перекисного окисления липидов с одновременным истощением ферментов антиоксидантной защиты. При изучении состояния ПОЛ на фоне декомпрессии холедоха и инфузий 0,9 % раствора натрия

хлорида выявлено, что дисбаланс между СРО и антиоксидантной защитой сохранялся до конца эксперимента (7 суток) Внутривенное введение ОФР приводило к значительному снижению интенсивности свободнорадикальных процессов на системном (плазма крови) и органном (тканевом) уровнях.

Литература

1. Walkowiak J. Normal levels of serum pancreatic enzymes in patients with progressive familial intrahepatic cholestasis type 2 // J. Walkowiak, I. Jankowska, A. Lisowska et al. // Act. Biochim. Pol. — 2010. — Vol.57(4). — P. 573–575.
2. Assimakopoulos S. F., Scopa C. D., Vagianos C. T. Pathophysiology of increased intestinal permeability in obstructive jaundice // World J. Gastroenterol. — 2007. — Vol. 13 (48). — P. 6458–6464.
3. Starosek V. N., Khil'ko S. S., Vlachov A. K. et al. Modern tendencies in surgical treatment of patients with obturation jaundice complicated by hepatic insufficiency // Klinicheskaya Khirurgiya. — 2009. — Vol. (4). — P. 15–18.
4. Орлов Ю. П., Долгих В. Т. Свободнорадикальное окисление и антиоксидантная терапия при критических состояниях // Вестник интенсивной терапии. — 2008. — № 1 — С. 73–77.
5. Беляев А. Н., Козлов С. А., Беляев С. А., Костин С. В. Функциональные и морфологические нарушения печени при остром обтурационном холестаза и их коррекция (экспериментальное исследование) // Анналы хирургической гепатологии. — 2014. — Т. 19. — № 4. — С. 64–70.
6. Беляев А. Н., Беляев С. А., Костин С. В. и соавт. Патогенетическая коррекция нарушений гемостаза при остром обтурационном холестаза // Медицинский альманах. — 2010. — № 1. — С. 136–140.
7. Беляев А. Н., Беляев С. А., Юдин А. А. и соавт. Гепатопротекторная активность озона при остром внепеченочном холестаза // Вестник физиотерапии и курортологии. — 2008. — № 5. — С. 107–109.