

## Роль гипоксического каскада в триггерных механизмах острого панкреатита

А.П. ВЛАСОВ<sup>1</sup>, С.Г. АНАСКИН, А.В. СУСЛОВ<sup>2</sup>, С.А. ТУРЫГИНА<sup>2</sup>, И.В. ПОТЯНОВА<sup>1</sup>

Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва, ул. Большевикская, д. 68, Саранск, 430005, Российская Федерация<sup>1</sup>

Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, ул. Островитянова, д. 1, Москва, 117997, Российская Федерация<sup>2</sup>

***Актуальность** Одним из недостаточно изученных механизмов патогенеза острого панкреатита остается вопрос значимости гипоксического каскада в триггерных механизмах развития заболевания.*

***Цель исследования** Установить значимость гипоксического каскада в триггерных механизмах острого панкреатита.*

***Материалы и методы** Работа проводилась на 20 взрослых беспородных половозрелых собаках обоего пола массой от 8,6 до 12,3 кг. Животным моделировали отечную форму острого панкреатита (ОП). В контрольные сроки исследования (1, 3 и 5-е сутки) производили релапаротомию, в ткани поджелудочной железы интраоперационно исследовали микроциркуляцию и показатели тканевого дыхания. Выполняли биопсию тканей органа с целью исследования свободно-радикальных процессов, определения качественного и количественного состава липидов. Для получения показателей в норме был изучен их уровень у 10 здоровых животных.*

***Результаты и их обсуждение** Проведенные исследования показали, что при развитии отечной формы острого панкреатита максимальное снижение микроциркуляции в тканях органа с повышением индекса шунтирования (на 230 %) развивается на третьи сутки. В условиях нарушенной микроциркуляции возникает дефицит кислорода, что вызывает разобщение процессов поэтапного переноса электронов в митохондриях и, как следствие, появление свободных радикалов кислорода, которые способны инициировать перекисное окисление липидов и активизировать фосфолипазные системы, обладающие мембранодеструктивным действием.*

***Выводы** Полученный фактический материал в обобщенном виде дает основание постулировать, что одним из важнейших триггерных патогенетических механизмов острого панкреатита является циркуляторная гипоксия, которая лежит в основе формирования гипоксического каскада, иницирующего «запуск» мембранодеструктивных процессов.*

***Ключевые слова** Острый панкреатит, патогенез, микроциркуляция, тканевое дыхание, оксидативный и фосфолипазный стресс, мембранодеструкция, гипоксический каскад*

## Role in Hypoxic Cascade Trigger Mechanisms of Acute Pancreatitis

A.P. VLASOV<sup>1</sup>, S.G. ANASKIN, A.V. SUSLOV<sup>2</sup>, S.A. TURYGINA<sup>2</sup>, I.V. POTIANOVA<sup>1</sup>

N.P. Ogarev Mordovia State University, 68 Bol'shevistskaia Str., Saransk, 430005, Russian Federation<sup>1</sup>

N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, 1 Ostrovitianova Str., Moscow, 117997, Russian Federation<sup>2</sup>

***Relevance** One understudied mechanisms of pathogenesis of acute pancreatitis (AP), the question remains significance hypoxic cascade trigger mechanisms of disease development.*

***The purpose of the study** Set the importance of hypoxic cascade trigger mechanisms of acute pancreatitis.*

***Materials and methods** Work carried out on 20 adult mongrel dogs of both sexes mature weight from 8.6 to 12.3 kg. Animals modeled edematous form OP. In terms of control studies (1, 3 and 5 th day) produced relaparotomii in pancreatic tissue examined intraoperatively microcirculation and tissue respiration indices. Body tissue biopsy was performed to investigate the free-radical processes, determine the qualitative and quantitative composition of lipids. For normal performance was studied their levels in 10 healthy animals.*

***Results and their discussion** Studies have shown that the development of the edematous form of acute pancreatitis maximum reduction in body tissue microcirculation with increased index of grafting (230%) developed on the third day. Under the conditions of disturbed microcirculation, there is a deficiency of oxygen, which causes the phase separation processes of electron transport in mitochondria and, as a consequence, the appearance of free oxygen radicals which can initiate lipid peroxidation and activate phospholipase systems with membranodestruktivnym action.*

***Conclusion** The resulting factual material in a generalized form gives reason to postulate that one of the most important trigger of the pathogenetic mechanisms of acute pancreatitis is the circulatory hypoxia, which underlies the formation of hypoxic cascade triggering "run" membranodestruktivnyh processes.*

***Key words** Acute pancreatitis, pathogenesis, microcirculation, tissue respiration, oxidative stress and phospholipase, membranodestruksiya, hypoxic cascade*

За последние десятилетия заболеваемость острым панкреатитом (ОП) последовательно увеличивается и составляет в России 20-80 случаев на 100000 населения [1]. На фоне роста общего числа больных ОП, увеличивается и удельный вес деструктивных форм, число которых за последние 20 лет возросло с 15 до 25% случаев [2]. Несмотря на широкий спектр современных диагностических алгоритмов и лечебных мероприятий, общая летальность при ОП составляет 4,5-15%, при деструктивных формах – от 18 до 60% [3,4].

Не вызывает сомнения, что одной из причин невысокой эффективности терапии этой грозной патологии является недостаточная изученность патогенеза. Между тем, этому важнейшему вопросу современной панкреатологии посвящено множество исследований [5,6,7]. Безусловно, дальнейшие разработки этой проблемы должны быть в направлении комплексной оценки различных компонентов расстройств гомеостаза на локальном и организменном уровнях. Одним из недостаточно изученных остается вопрос значимости гипоксического каскада в триггерных механизмах острого панкреатита.

Цель исследования: установить значимость гипоксического каскада в триггерных механизмах острого панкреатита.

### Материалы и методы

В основу работы положены материалы экспериментальных исследований. Работа проводилась на 20 взрослых беспородных половозрелых собаках обоего пола массой от 8,6 до 12,3 кг. Животным моделировали отечную форму ОП, в послеоперационном периоде проводили инфузионную терапию (0,89% раствор хлорида натрия из расчета 50 мл/кг массы). В контрольные сроки исследования (1, 3 и 5-е сутки) производили релапаротомию, в ткани поджелудочной железы интраоперационно исследовали микроциркуляцию и показатели тканевого дыхания. Выполняли биопсию тканей органа с целью исследования свободно-радикальных процессов, определения качественного и количественного состава липидов. Для получения показателей в норме был изучен их уровень у 10 здоровых животных.

ОП моделировали по способу В.М. Буянова с соавт., (1989). Собакам выполняли срединную лапаротомию, пунктировали желчный пузырь, забирали желчь с последующим лигированием места пункции. Затем желчь вводили в паренхиму вертикальной части ПЖ по 0,6 мл в 5 точек. Экспериментальные исследования проводились под внутривенным наркозом, используя тиопентал натрия из расчета 0,04 г/кг массы тела животного. После проведения исследований животных выводили из эксперимента введением летальной дозы препарата. Исследования проводились в соответствии с нравственными требованиями к работе с экспериментальными животными («Правила проведения ра-

бот с использованием экспериментальных животных» (приказ МЗ СССР № 755 от 12.08.1987 г.), Федеральный закон «О защите животных от жестокого обращения» от 01.01.1997 г., приказ МЗ РФ от 19.06.2003 г. № 267 «Об утверждении правил лабораторной практики»), одобрены локальным этическим комитетом.

Для исследования функционирования микроциркуляторного русла проводили лазерную доплеровскую флоуметрию тканей поджелудочной железы с помощью анализатора ЛАКК-02 (ООО НПП «ЛАЗМА», Россия), полученные данные регистрировались и расшифровывались с помощью прилагаемого к анализатору программного обеспечения. Тканевое дыхание исследовали с помощью окислительно-восстановительного потенциала (ОВП) и коэффициента диффузии кислорода (КДК). Регистрацию ОВП осуществляли на универсальном ионметре ЭВ-74 по методике, изложенной в аннотации к прибору. КДК определяли на основе учета темпа падения диффузного тока восстановления по уравнению И.М.Эпштейна (Труфанов Л.А., 1991). Изменения гистогематической проницаемости ткани железы регистрировали по капиллярной фильтрации (F) и потере белка (K). Кровенаполнение тканей поджелудочной железы измеряли по оптической плотности проб гомогената ткани поджелудочной и гемолизата из вены, при длине волны 540 нм на фотоэлектродетекторе. Свободно-радикальные процессы изучали по содержанию продуктов перекисного окисления липидов и состоянию антиоксидантной системы защиты: диеновые и триеновые конъюгаты (ДК и ТК) определяли спектрофотометрическим методом, уровень малонового диальдегида (МДА) – спектрофотометрическим методом по реакции с тиобарбитуровой кислотой. Оценивали активность фосфолипазы А2 в среде содержащей 10 ммольтрис-НСL-буфер (pH 8,0), 150 ммоль тритон X-100, (1,2 ммоль), в качестве субстрата использовали фосфатидилхолины. Антиоксидантную систему защиты определяли по активности ферментов каталазы и супероксиддисмутазы (СОД). Липиды из ткани поджелудочной железы экстрагировали хлороформметаноловой смесью (Хиггинс Дж.А., 1990), затем их фракционировали, состав оценивали на хроматограммах денситометрическим методом. Использован денситометр Model GS-670 (BIO-RAD, США) с соответствующим программным обеспечением (PhosphorAnalyst/PS Software). В периферической крови изучали активность альфа-амилазы и выраженность эндогенной интоксикации по содержанию молекул средней массы (МСМ). Активность альфа-амилазы крови определяли методом ферментативного гидролиза крахмала, регистрируя данные на ФЭКе. Содержание МСМ определяли спектрофотометрическим методом на спектрофотометре СФ-46.

Полученные цифровые данные обрабатывали методом вариационной статистики с использованием критерия t Стьюдента и критерия g. В каждой серии определяли достоверность различия по отношению к норме (p).

### Результаты и их обсуждение

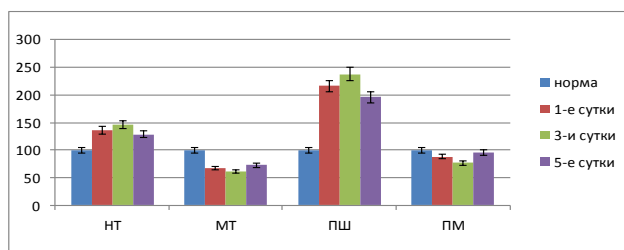
Модель острого панкреатита была вполне адекватной для достижения поставленной цели. Развивалась отечная форма ОП с максимальной степенью выраженности морфологических изменений в поджелудочной железе через трое суток после моделирования. Некротические процессы в тканях органа имелись только в зоне инъекций желчи и захватывали небольшие участки тканевых структур. В динамике ОП активность  $\alpha$ -амилазы плазмы крови превышала исходный уровень (норму) на 98,5–335,1% ( $p < 0,05$ ). Выявлено существенное повышение содержания в плазме крови гидрофильных токсических продуктов. Содержание молекул средней массы ( $\lambda = 254$  нм и 280 нм) в плазме крови было повышено на 59,2–174,2% ( $p < 0,05$ ).

Проведенные исследования показали, что при развитии отечной формы острого панкреатита максимальное снижение микроциркуляции в тканях органа с повышением индекса шунтирования (на 230 %) развивается на третьи сутки. На пятые сутки динамического наблюдения отмечена тенденция к восстановлению выявленных нарушений, однако исходных значений показателей микроциркуляции достигнуто не было (рис. 1).

При изучении электрогенеза экспериментально установлено, что при отечной форме острого панкреатита патологические процессы затрагивают тканевое дыхание. Так, ОВП ткани поджелудочной железы в первые этапы периода наблюдения снижался на 12,5–23,6% ( $p < 0,05$ ), КДК – на 14,7–31,8% ( $p < 0,05$ ).

Установлено, что при ОП резко увеличивается гистогематическая проницаемость ткани поджелудочной железы. Так, продукция капиллярного фильтрата и потеря белка увеличивались на 47,1–107,5% ( $p < 0,05$ ) и 83,5–246,9% ( $p < 0,05$ ), соответственно. Кровенаполнение тканей органа было выше нормы на 10,5–27,4% ( $p < 0,05$ ).

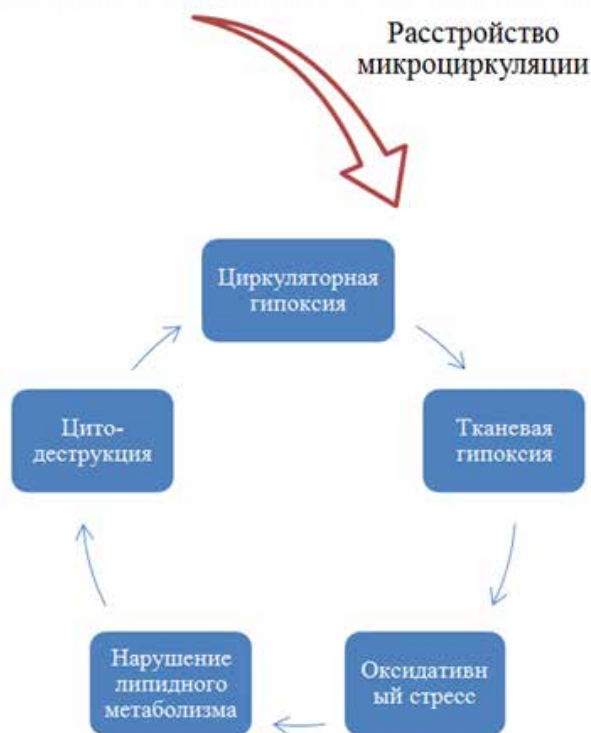
Исследование свободно-радикальных процессов в ткани ПЖ при ОП показало, что содержание диеновых и триеновых конъюгатов в ткани органа было повышено на всех этапах наблюдения на 195,8–236,2% и 114,7–277,1% ( $p < 0,05$ ) соответственно. Уровень малонового диальдегида был выше нормы на 132,4–396,4%



**Рис. 1.** Микроциркуляция в тканях поджелудочной железы при остром отечном панкреатите: ПМ – показатель микроциркуляции, ПШ – показатель шунтирования, НТ – влияние нейrogenного компонента тонуса, МТ – влияние миогенного компонента тонуса. / **Fig. 1.** Microcirculation in tissues pancreas with acute edematous pancreatitis: PM - index of microcirculation, PN - an indicator bypass NT - influence of neurogenic component tone, MT - influence myogenic tone component.

( $p < 0,05$ ). В ходе исследований было выявлено, что активность ФЛА2 в ткани поджелудочной железы была резко повышена на всех этапах наблюдения на 644,3–875,2% ( $p < 0,05$ ), причем максимальное увеличение данного показателя отмечено на третьи сутки. Активность супероксиддисмутазы тканевых структур органа снижалась на 48,1–61,2% ( $p < 0,05$ ). В тканевых структурах ПЖ при ОП возникали выраженные изменения липидного спектра. Установлено повышение уровня моноацилглицеролов на 37,8–187,2%, диацилглицеролов – в 2,1–10,6 раз, триацилглицеролов – на 48,3 %, свободных жирных кислот – на 70,2–167,7%, лизоформ фосфолипидов – в 5,3–12,4 раза, сфингомелина – на 33,6–74,8%, фосфатидилхолина – на 23,8–43,2%, фосфатидилинозита – на 8,3–16,2%; снижение концентрации суммарных фосфолипидов на 19,91–40,6%, холестерина – на 23,4–50,1%, эфиров холестерина – на 15,0–50,7%, фосфатидилсерина – на 48,8–52,7%, фосфатидилэтаноламина – на 16,3–29,8% ( $p < 0,05$ ). Выявлено, что максимального развития липидные модификации в органе достигали к третьим суткам, когда выраженность воспалительного процесса в ПЖ достигала апогея.

Анализируя экспериментальные данные, полученные в динамике на ранних стадиях ОП, выделим, что медиаторы воспаления, образующиеся при этой патологии, обладают выраженными вазоактивными свойствами, приводящими к нарушению органной микроциркуляции. В условиях нарушенной микроциркуляции возникает дефицит кислорода, что вызывает разобщение процессов поэтапного переноса



**Рис. 2.** «Порочный круг» гипоксического каскада при остром панкреатите. / **Fig. 2.** "Vicious circle" of hypoxic cascade in acute pancreatitis.

ление свободных радикалов кислорода, которые способны инициировать перекисное окисление липидов и активизировать фосфолипазные системы, обладающие мембранодеструктивным действием (повреждают внутриклеточные органеллы, клеточные мембраны).

### Выводы

1. Полученный фактический материал в обобщенном виде дает основание постулировать то, что одним из важнейших триггерных патогенетических механизмов ОП является циркуляторная гипоксия, которая лежит в основе формирования гипоксического каскада, инициирующего «запуск» мембранодеструктивных процессов (рис. 2).

### Список литературы

1. Скutoва В.А., Касумьян С.А., Абросимов С.Ю., Чайковский Ю.Я. Диагностическая тактика при остром деструктивном панкреатите. Вестник экспериментальной и клинической хирургии, 2013; VI: 1: 74-79.
2. Гусейнов А.З., Карапыш Д.В. Острый панкреатит как медико-социальная проблема в структуре urgentной абдоминальной хирургической патологии. Вестник новых медицинских технологий, 2010; XVII: 3: 198-200.
3. Назыров Ф.Г. Острый панкреатит. Вестник экстренной медицины, 2010; 4: 8-14.
4. Недашковский Э.В. Острый панкреатит: руководство для врачей. Москва: GEOTAR-Медиа, 2009; 272.
5. Фирсова В.Г., Паршиков В.В. Деструктивный панкреатит: механизмы гибели клетки и их возможное клиническое значение. Вестник экспериментальной и клинической хирургии, 2013; VI: 1: 100-106.
6. Кубышкин В.А. Острый панкреатит. Тихоокеанский медицинский журнал, 2009; 2: 48-52.
7. Hackert T., Pfeil D., Hartwig W., Fritz S. Platelet function in acute experimental pancreatitis. *Gastrointest Surg.*, 2007; 4: 439-444.

Поступила 15.05.2014

### Информация об авторах

1. Власов А.П. - д.м.н., проф., зав. кафедрой факультетской хирургии Мордовского государственного университета им. Н.П. Огарева. E-mail: vap.61@yandex.ru;
2. Анаскин С.Г. - к.м.н., зав. кафедрой хирургии Медицинского факультета Обнинского института атомной энергетики – филиал Национального исследовательского ядерного университета «МИФИ». E-mail: asg72@list.ru;
3. Потянова И.В. – к.м.н., асс. кафедры госпитальной терапии № 1 Российского государственного медицинского университета. E-mail: vap.61@yandex.ru;
4. Турыгина С.А. – к.б.н., доц. кафедры гистологии Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И. Пирогова;
5. Суслов А.В. – аспирант кафедры факультетской хирургии Мордовского государственного университета им. Н.П. Огарева. E-mail: dr.suslov@rambler.ru.

2. В целом, направленность и последовательность патогенетических событий на начальных этапах ОП представляется в следующем виде порочного круга: нарушение микроциркуляции → повышение сосудистой проницаемости (транскапиллярного обмена) → нарушение тканевого дыхания с формированием дефицита энергии → развитие оксидативного и фосфолипазного стресса → возникновение мембранодеструктивных явлений → нарушение морфофункциональной целостности внутриклеточных органелл, клеточных мембран поджелудочной железы → большее нарушение микроциркуляции.

Опубликована при финансовой поддержке Министерства Образования и Науки РФ в рамках СП-2094.2013.4

### References

1. Skutova V.A., Kasum'ian S.A., Abrosimov S.Iu., Chaikovskii Iu.Ia. Diagnostic tactics in acute destructive pancreatitis. *Vestnik eksperimental'noi i klinicheskoi khirurgii*, 2013; VI: 1: 74-79. – (In Russ.).
2. Guseinov A.Z., Karapysh D.V. Acute pancreatitis as a medical and social problem in the structure of urgent abdominal surgical pathology. *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologii*, 2010; XVII: 3: 198-200. – (In Russ.).
3. Nazyrov F.G. Acute pancreatitis. *Vestnik ekstretnoi meditsiny*, 2010; 4: 8-14. – (In Russ.).
4. Nedashkovskii E.V. *Ostryi pankreatit: rukovodstvo dlia vrachei* [Acute pancreatitis: a guide for physicians]. Moscow: GEOTAR Media, 2009; 272. – (In Russ.).
5. Firsova V.G., Parshikov V.V. Destructive pancreatitis: mechanisms of cell death and their potential clinical significance. *Vestnik eksperimental'noi i klinicheskoi khirurgii*, 2013; VI: 1: 100-106. – (In Russ.).
6. Kubyshekin V.A. Acute pancreatitis. *Tikhookeanskii meditsinskii zhurnal*, 2009; 2: 48-52. – (In Russ.).
7. Hackert T., Pfeil D., Hartwig W., Fritz S. Platelet function in acute experimental pancreatitis. *Gastrointest. Surg.*, 2007; 4: 439-444.

Recieved 15.05.2014

### Information about the Authors

1. Vlasov A. – MD, Prof., Head of Department of Surgery Medical School VPO "MSU. NP Ogareva ". E-mail: vap.61 @ yandex.ru;
2. Anaskin S. - MD, Head. Department of Surgery, Faculty of Medicine Obninsk Institute of Nuclear Energy - branch FGAOU Institution "National Research Nuclear University" MiFi ". E-mail: asg72@list.ru;
3. Potianova I. - MD, Department of Hospital Therapy №1 VPO "Russian State Medical University". E-mail: vap.61 @ yandex.ru;
4. Turygina S. - PhD, Associate Prof. of Histology Medical University " N.I. Pirogov Russian National Research Medical University";
5. Suslov A. - graduate student of Faculty Surgery VPO "Mordovia State University them. NP Ogareva". E-mail: dr.suslov@rambler.ru.