

УДК 616.37-002:616.155.1

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ НАРУШЕНИЯ ЭРИТРОЦИТОВ И ИХ КОРРЕКЦИЯ У БОЛЬНЫХ С ЛЕГКИМ И ТЯЖЕЛЫМ ТЕЧЕНИЕМ ОСТРОГО ПАНКРЕАТИТА

© *Гаврилюк В.П., Назаренко П.М., Конопля А.И.*

Кафедра хирургических болезней № 2
Курского государственного медицинского университета

Выявлены нарушения белкового спектра мембран эритроцитов, их сорбционной способности и метаболической активности у больных острым панкреатитом в зависимости от тяжести течения заболевания. Определена эффективность применения фармакологических схем лечения, включающих деринат вместе с эспа-липоном и полиоксидоний с мексидолом в условиях легкого и тяжелого течения острого панкреатита в коррекции нарушенных показателей структурно-функциональных свойств эритроцитов.

Ключевые слова: острый панкреатит, структурно-функциональные свойства эритроцитов, фармакологическая коррекция.

STRUCTURALLY FUNCTIONAL DISTURBANCES OF ERYTHROCYTES AND THEIR CORRECTION IN PATIENTS WITH THE MILD AND SEVERE ACUTE PANCREATITIS

Gavrilyuk V.P., Nazarenko P.M., Konoplya A.I.

Department of Surgical Diseases № 2 of the Kursk State Medical University

We established the disturbances of proteins spectrum of erythrocytes membranes, and their sorptive abilities as well as metabolic activity in patients with acute pancreatitis depending on the severity of the disease. The correction efficiency of the disturbed parameters of the structurally functional properties of erythrocytes in the pharmacological ways of management including derinat with espa-lipon and polyoxidonium with mexidol in mild and severe acute pancreatitis was determined.

Key words: acute pancreatitis, structurally functional properties of erythrocytes, pharmacological correction.

Развитие такого сложного заболевания, как острый панкреатит (ОП), редко ограничивается изолированным поражением поджелудочной железы. Частота развития внеорганных осложнений колеблется в пределах 60,8-96,5%. Именно ранние осложнения, сопровождающиеся нарушением функций сердечно-сосудистой системы, легких, печени и почек, представляют наибольшую опасность и являются причиной высокой летальности [2].

В настоящее время уделяется большое внимание изучению структурно-метаболического и функционального статусов эритроцитов, являющихся своего рода «клеточным дозиметром» действия факультативных и облигатных экзо- и эндогенных факторов, выступающих причиной различных заболеваний [9, 11]. При этом большинство авторов исходят из позиции, что красные кровяные клетки, помимо осуществления присущей им специфической газотранспортной функции, принимают участие в обеспечении стабильности и регуляции кислотно-основного состояния и

водно-солевого обмена, определяют микрореологические свойства крови и функции иммунокомпетентных клеток и т.д., участвуя тем самым в процессах, связанных с поддержанием гомеостаза на уровне целого организма. При этом не исключена важная роль эритроцитов в поддержании иммунометаболического гомеостаза и в условиях острого панкреатита, тем более что в настоящее время лабораторная диагностика ОП не имеет строгой специфичности для верификации стадии заболевания. Как указывает М. Sashi: «Если в будущем кто-то предложит систему, способную по одному или нескольким лабораторным показателям различать отечную и некротическую формы острого панкреатита, это будет означать решение проблемы классификации» [7]. Таким образом, выявление новых показателей, отражающих напряженность гомеостаза и разработка эффективных способов их коррекции в условиях острого панкреатита являются актуальной и своевременной проблемой.

Поэтому целью работы явилось установление изменений физико-химических свойств эритроцитов у больных острым панкреатитом с легким и тяжелым течением и разработка эффективных способов фармакологической их коррекции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Под постоянным наблюдением на основании информированного согласия были 69 пациентов с острым панкреатитом различной степени тяжести, находившихся на стационарном лечении в хирургических отделениях НУЗ Отделенческая больница на ст. Курск ОАО РЖД и МУЗ ГБ № 4 г. Курска с 2002 по 2007 гг. В качестве контроля исследовали периферическую кровь 12 здоровых доноров добровольцев.

Постановку диагноза осуществляли на основании жалоб, анамнеза заболевания, объективного и лабораторного обследования, инструментальных данных: УЗИ, ФГДС и рентгенографии. Тяжесть состояния больных ОП оценивали по прогностической таблице оценки тяжести состояния больных острым панкреатитом, разработанной кафедрой хирургических болезней № 2 Курского государственного медицинского университета [6].

Оказалось, что с прогнозируемым легким течением (с суммой диагностических коэффициентов больше нуля) заболевания было 36 пациентов (52%) и тяжелым (сумма диагностических коэффициентов меньше нуля) – 33 пациента (48%).

Больным проводились различные по объему и характеру оперативные вмешательства, при этом предпочтение отдавали миниинвазивным технологиям и только при их неэффективности прибегали к открытым хирургическим вмешательствам. Больным с билиарным панкреатитом выполнялись хирургические вмешательства, направленные на скорейшую ликвидацию патологии, обусловленной желчнокаменной болезнью, то есть проводили активную хирургическую тактику. У больных с небилиарным панкреатитом достаточно частым осложнением был ферментативный перитонит, в связи с чем выполняли лапароскопическую санацию и дренирование брюшной полости.

У некоторых больных вынуждены были прибегнуть к лапаротомии. Показаниями явились: невозможность выполнения малоинвазивных вмешательств из-за лапаротомного доступа в анамнезе – у одного больного с легким течением острого панкреатита, и вскрывшаяся в брюшную полость нагноившаяся киста – у 1 пациента с тяжелым течением заболевания.

Все обследованные больные были разделены на 3 рандомизированные по полу, возрасту, тяжести заболевания и проводимому фармакологическому лечению группы: 1-я группа – 24 пациента (13 – с легким и 11 – с тяжелым течением заболевания) получали традиционное лечение (инфузионная терапия со спазмолитиками и анальгетиками; антиферментные препараты – гордокс, контрикал; антибактериальная терапия, с учетом чувствительности микрофлоры, антисекреторная терапия); 2-я группа включала 11 больных с легким и 11 – с тяжелым течением заболевания, дополнительно получавших к традиционной терапии деринат (5,0 мл 1,5% р-ра в/м через 24 часа 10 дней) и эспа-липон (600 мг в/в через 24 часа 10 дней); 3-я группа включала 23 больных, из которых с легким течением заболевания – 12, а с тяжелым – 11 пациентов, дополнительно получавших к традиционной терапии полиоксидоний (6 мг в/м через 24 часа 10 дней) и мексидол (100 мг через 8 часов 10-14 дней). Дозы, способы и схемы введения препаратов соответствовали рекомендациям, приведенным в пособии по фармакотерапии М.Д. Машковского "Лекарственные средства" и аннотациях к использованию препаратов [8].

Эритроциты получали из 5 мл гепаринизированной крови по методу E. Beutler [14]. Определяли сорбционную способность эритроцитов (ССЭ) по отношению к витальным красителям [13] и сорбционную емкость их гликокаликса (СЕГ) для альцианового синего, который является катионным красителем фталоцианиновой группы [12]. О функциональном состоянии эритроцитов судили также по накоплению малонового диальдегида (МДА) [1].

Мембраны эритроцитов получали методом G.T. Dodge [15]. Электрофорез проводили в присутствии додецилсульфата натрия в вертикальных пластинах полиакриламидного

геля по методу U.K. Laemmli [17]. Белки окрашивали кумаси голубым R-250 по модифицированной методике G. Fairbanks [16]. Количественное содержание белковых фракций рассчитывали через площадь и известную концентрацию яичного альбумина, выступающего как маркерный белок. Полученные значения пересчитывали на 1 мг общего белка в исследуемом образце сухих мембран эритроцитов.

Статистическую обработку результатов исследования проводили, используя непараметрические методы: критерии Вилкоксона-Манна и Уитни, Крускала-Уоллиса, Фридмана и непараметрический вариант критерия Ньюмена-Кейлса, а также коэффициент ранговой корреляции Спирмена [5].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

У больных с легкой формой острого панкреатита при поступлении снижается количество β -спектрина и подфракции анкирина и повышается содержание белка полосы 4.1, 4.2, дематина и тропомиозина, повышается общая сорбционная способность эритроцитов

и концентрация малонового диальдегида (рис. 1).

У больных с тяжелой формой острого панкреатита дополнительно снижается количество α -спектрина, анионтранспортного белка, белка полосы 4.5, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (ГЗФД) и повышается количество актина, кроме этого снижается общая сорбционная способность эритроцитов и достоверно больше возрастает внутриклеточная концентрация малонового диальдегида (рис. 1).

Таким образом, исходя из функций интегральных и периферических белков мембраны эритроцитов, можно заключить, что выявленные изменения направлены на уменьшение прочности и деформируемости эритроцитарной мембраны, повышение общей сорбционной способности эритроцитов и их гликокаликса и снижение их метаболической активности, что ускоряет процессы старения красных клеток крови.

Инкубируя интактные эритроциты в течение 3 часов при температуре 37,0°C одноклассной по системе АВО и Rh с сывороткой больных мелкоочаговым панкреонекрозом,

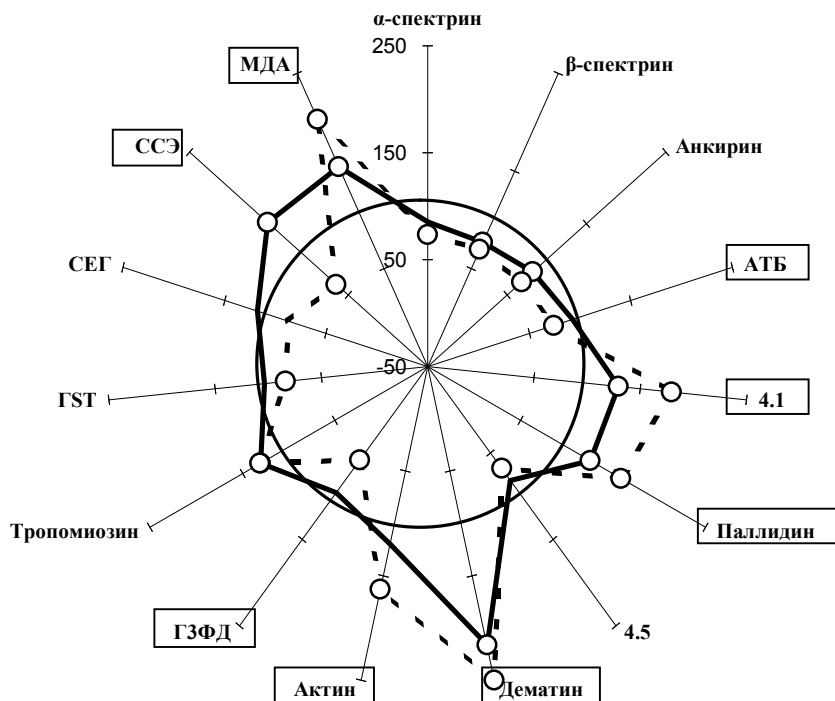


Рис. 1. Структурно-функциональные свойства эритроцитов у больных острым панкреатитом при поступлении в клинику в зависимости от тяжести течения.

Условные обозначения: 1 – радиусом окружности отмечены показатели у здоровых доноров (1 группа); 2 – ——— – показатели у больных с легким течением ОП (2 группа); 3 – – показатели у больных с тяжелым ОП (3 группа); 4 – ○ – $p < 0,05$ между показателями 2 и 3 групп по отношению к 1 группе; 5 – □ – $p < 0,05$ между показателями 3 и 2 групп.

выявлены изменения структурно-функциональных свойств эритроцитов, аналогичные тем, что имеют место у больных ОП, проявляющиеся снижением количества в мембране эритроцитов анкирина, дематина и повышением внутриклеточной концентрации МДА.

Полученные результаты позволяют предположить, что пусковым механизмом в развитии нарушений физико-химических свойств эритроцитов являются ферментемия и развивающийся окислительный стресс, приводящие к окислительному модифицированию фосфолипидного слоя мембран эритроцитов, что нарушает белково-липидный баланс в эритроцитарной мембране, и изменению представительности белкового спектра, т.к. помимо интегральных белков в мембране имеются периферические белки или частично интегрированные, удерживаемые слабыми нековалентными связями, нарушаемыми процессами перекисного окисления липидов.

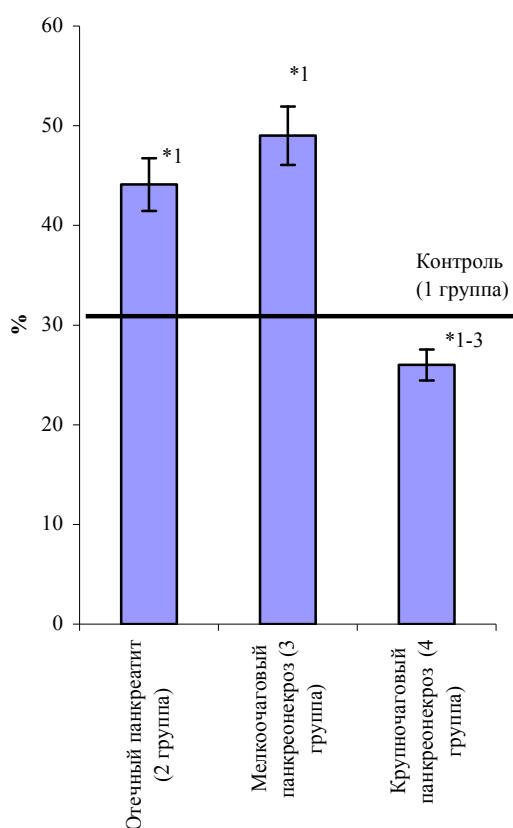
Интересным является факт различия в динамике ССЭ у больных ОП в зависимости от тяжести заболевания. Так, при легком тече-

нии ОП имеет место повышение сорбционной способности эритроцитов, тогда как при тяжелом течении острого панкреатита, наоборот, – ее снижение (рис. 1).

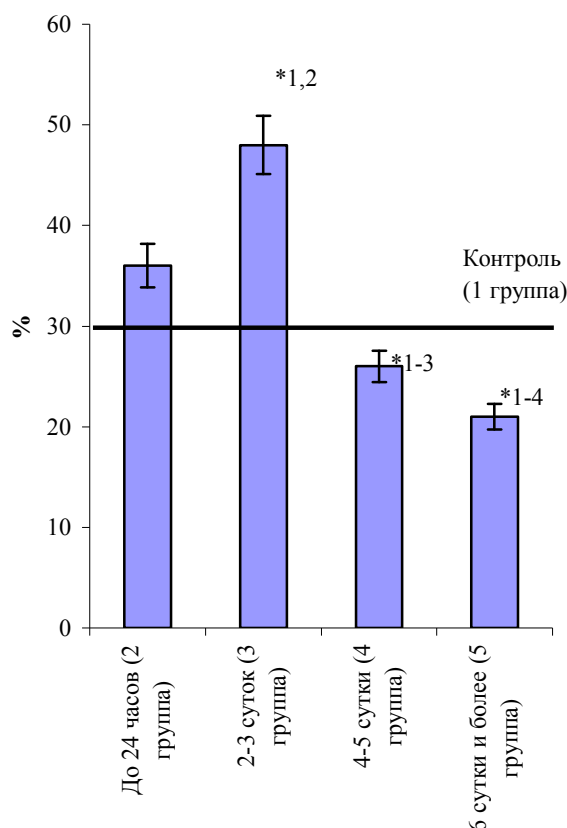
Детальный анализ динамики данного показателя у больных ОП выявил интересные особенности. Так, например, если группировать больных ОП по объему поражения поджелудочной железы, то у больных с отечной формой ОП и мелкоочаговым панкреонекрозом ССЭ повышается, при этом у последних данный показатель достоверно выше, тогда как при крупноочаговой форме панкреонекроза ССЭ, наоборот, достоверно ниже контрольных значений (рис. 2).

Группируя больных ОП по длительности анамнеза заболевания, можно заключить, что у пациентов с анамнезом до 3 суток ССЭ повышена, тогда как у больных с длительностью анамнеза более 4 суток данный показатель снижается (рис. 2).

Таким образом, повышенные значения общей сорбционной способности эритроцитов характерны для острого отечного пан-



А



Б

Рис. 2. Сорбционная способность эритроцитов у больных с острым панкреатитом в зависимости от объема поражения поджелудочной железы (а) и сроков поступления в стационар (б).

креатита и мелкоочагового панкреонекроза, особенно в первые сутки от начала заболевания, тогда как сниженные значения – для крупноочагового панкреонекроза, особенно на пятые и более сутки от начала заболевания. Поэтому данный показатель необходимо апробировать в более широких клинических исследованиях и использовать для косвенной оценки тяжести течения острого панкреатита.

Традиционное комплексное лечение, включающее оперативное лечение по показаниям и инфузионную терапию, у больных с легким течением острого панкреатита нормализует представительство в мембране эритроцитов подфракции 2.1 анкирина и белка полосы 4.1 и корригирует количество α -спектрина, общую сорбционную способность эритроцитов и концентрацию в них малонового диальдегида, а у пациентов с тяжелым течением острого панкреатита – корригирует количество 2.1 и 2.2 подфракции анкирина и концентрацию малонового диальдегида.

На мембране эритроцитов сорбируются и транспортируются многие биоорганические соединения, что обеспечивает доставку в лимфоидные органы антигенов или их фрагментов, а также эндогенных биорегуляторов, обладающих иммуномодулирующей активностью. Возможно также прямое взаимодействие структур мембраны эритроцитов с рецепторами иммунокомпетентных клеток, сопровождающееся изменением их функциональной активности [4, 10]. Кроме этого, в настоящее время множество работ посвящено установлению выраженности и роли иммунных нарушений при остром панкреатите, клинически апробированы достаточно эффективные иммунокорригирующие фармакологические схемы в коррекции нарушений иммунного гомеостаза у больных с острым панкреатитом, включающие иммуномодулирующие препараты в комплексе с антиоксидантами, антигипоксантами, стабилизаторами клеточных мембран и другими [3, 6].

Таким образом, нельзя исключить важную роль эритроцитов в поддержании иммунного гомеостаза в условиях острого панкреатита, кроме этого, в реализации иммуотропных эффектов фармакологических схем иммунореабилитации у таких больных.

Поэтому далее изучена эффективность применения сочетания полиоксидония с мексидолом и дерината с эспа-липоном в коррекции выявленных нарушений показателей структурно-функциональных свойств эритроцитов у больных с легким и тяжелым течением, так как именно эти фармакологические схемы, по данным ранее проведенных исследований, обладают выраженными иммуномодулирующими эффектами именно в условиях ОП [3, 6].

Сочетание дерината с эспа-липоном, в отличие от традиционной фармакотерапии, у больных с легким течением ОП снижает представительство в эритроцитарной мембране дематина, но не до уровня здоровых доноров, а сочетание полиоксидония с мексидолом – снижает количество дематина, белка полосы 4.1 и уменьшает ССЭ (рис. 3).

У больных с тяжелым течением ОП использование дерината вместе с эспа-липоном снижает представительство актина и нормализует количество глутатион-S-трансферазы (GST), повышает до уровня нормы количество ГЗФД (рис. 3). Применение полиоксидония с мексидолом нормализует представительство α -спектрина, белка полосы 4.5, ГЗФД и GST, повышает ССЭ и снижает количество дематина и актина (рис. 3).

Таким образом, использование дерината в сочетании с эспа-липоном корригирует нарушенные показатели физико-химических свойств эритроцитов у пациентов с острым панкреатитом, тогда как применение в комплексном лечении острого панкреатита полиоксидония с мексидолом нормализует и корригирует большее число нарушенных параметров, особенно у пациентов с легким течением острого панкреатита.

Для оценки влияния предложенных схем лечения на клиническую картину течения заболевания нами было выделено 6 наиболее значимых показателей субъективного и объективного статусов (болевого синдром, диспептический синдром, интоксикационный синдром, инфильтрат, определяемый пальпаторно, симптомы ферментативного перитонита, симптомы пареза кишечника) и 4 – данных УЗИ (отек поджелудочной железы, инфильтрация поджелудочной железы, наличие

железы, наличие жидкостных образований в поджелудочной железе, брюшной полости и забрюшинной клетчатке) по времени купирования.

При оценке динамики клинических показателей оказалось, что из двух использованных схем лечения менее эффективной была схема лечения, включавшая деринат и эспа-липон, так как при их использовании удалось быстрее по сравнению с традиционным лечением купировать только 7 показателей у больных с легким течением острого панкреатита и 4 показателя у больных с тяжелым течением, тогда как более эффективной оказалась схема лечения с использованием полиоксидония и мексидола, так как на ее фоне 9 симптомов выявлялись меньшее количество дней у больных с легким течением и 6 – у больных с тяжелым течением ОП.

Полученные результаты подтверждают предположения о важной роли эритроцитов и физико-химических свойств их мембран в поддержании как общего, так и иммунного, гомеостаза у больных ОП. Структурно-функциональные свойства эритроцитов входят в цепь приспособительных механизмов, поддерживающих постоянство внутренней среды как в норме, так и в условиях патологии. Развивающийся «окислительный взрыв» приводит к повышению процессов перекисного окисления липидов как внутри клетки, так и в ее мембране, что характеризуется повышением внутриклеточного количества МДА. Это приводит к «вымыванию» холестерина из фосфолипидного слоя эритроцитарной мембраны, уменьшению ее липидной части, некоторой потере периферических низкомолекулярных мембранных белков и относительному повышению количества гликопротеидов, что, по-видимому, и повышает ССЭ. Продолжающаяся уже системная воспалительная реакция приводит к продукции еще большего количества недоокисленных радикалов, что повышает перекисное окисление липидов. Поэтому при достижении некоторого критического уровня белково-липидного соотношения в эритроцитарной мембране происходит уже потеря частично интегрированных белков, что и приводит к снижению общей сорбционной способности эритроцитов, наблюдаемой у больных с тяжелой фор-

мой ОП.

Безусловно, происходящие изменения структурно-функциональных свойств эритроцитарной мембраны приводят к изменению их антигенной структуры, что влияет на механизмы регулирования иммунологических функций через макрофаги и тромбоциты [10].

Использованные фармакологические препараты корректируют и нормализуют структурно-функциональные свойства эритроцитов, что, вероятно, и обуславливает описываемая в литературе их иммуномодулирующая эффективность. Так, мексидол и эспа-липон за счет антиоксидантного и антигипоксантажного эффектов, нивелируя оксидантный стресс, стабилизируют эритроцитарную мембрану. Деринат, возможно, за счет дезоксирибонуклеиновой кислоты оказывает стимулирующее влияние на гемопоэз, в первую очередь образование и выход в кровяное русло новых красных клеток крови, но для существенного сдвига соотношения «старых» и «молодых» эритроцитов требуется длительное время, поэтому использование дерината менее эффективно, чем использование полиоксидония, который, скорее всего, за счет прямого действия на фагоцитирующие клетки, являющиеся важными поставщиками недоокисленных радикалов, снижает выраженность окислительного стресса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Банкова В.В., Прищепова Н.Ф., Авратинский О.И. Способ оценки патологических изменений плазматической мембраны у детей при различных заболеваниях // Патол. физиология и эксперим. терапия. – 1987. – № 3. – С. 78–81.
2. Гостищев В.К., Федоровский Н.М., Глушко В.А. Деструктивный панкреатит (основные принципы комплексной терапии) // Анналы хирургии. – 1997. – № 4. – С. 60–65.
3. Конопля А.И., Локтионов А.Л., Назаренко Д.П., Пехов Д.А. Применение иммунокорректоров в комплексной терапии острого панкреатита // Вестник новых медицинских технологий. – 2007. – Т. XIV, № 2. – С. 56–59.
4. Лазарева Г.А., Бровкина И.Л., Лазарев А.И. и др. Иммунометаболические эффекты регуляторов энергетического обмена при нарушении гомеостаза. – Курск: КГМУ, 2006. – 329 с.
5. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высшая школа,

1980. – 243 с.
6. *Локтионов А.Л.* Функциональная активность нейтрофилов периферической крови у больных с деструктивными формами острого панкреатита // Успехи современного естествознания. – 2005. – № 10. – С. 64–65.
 7. *Лузганов Ю.В., Островская Н.Е., Шкиря К.С., Ягубова В.А.* Дифференциальная диагностика и принципы терапии различных форм панкреатита и панкреонекроза // Русский медицинский журнал. – 2005. – Т. 13, № 27. – С. 1842–1846.
 8. *Машковский М.Д.* Лекарственные средства: в 2-х т. – М.: ООО "Издательство Новая Волна", 2000. – 540 с.
 9. *Новицкий В.В., Рязанцева Н.В., Стеновая Е.А. и др.* Клинический патоморфоз эритроцита (атлас) / Томск: Изд-во Томского унта, 2003. – 208 с.
 10. *Прокопенко Л.Г., Бровкина И.Л., Быстрова Н.А. и др.* Эритроциты и регуляция иммунного гомеостаза (материалы открытия). – Курск: КГМУ, 2006. – 132 с.
 11. *Рязанцева Н.В., Новицкий В.В.* Типовые нарушения молекулярной организации мембраны эритроцита при соматической и психической патологии // Успехи физиологических наук. – 2004. – Т. 1, № 1. – С. 53–65.
 12. *Семко Г.А.* Структурно-функциональные изменения мембран и внешних примембранных слоев эритроцитов при гиперэпидермопозе // Украинский биохимический журнал. – 1998. – Т. 70, № 3. – С. 113–118.
 13. *Тогайбаев А.А., Кургузкин А.В., Рукун И.В.* Способ диагностики эндогенной интоксикации // Лаб. дело. – 1988. – № 9. – С. 22–24.
 14. *Beutler E.* How do red cell enzymes age a new perspective // Brit. J. Haemat. – 1985. – Vol. 61. – P. 377–384.
 15. *Dodge G.T., Mitchell C., Hanahan D.J.* The preparation and chemical characteristics of hemoglobin free ghosts of human erythrocytes // Arch. Biochem. Biophys. – 1963. – Vol. 100. – P. 119–130.
 16. *Fairbanks G., Steck T., Wallach D.* Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane // Biochemistry. – 1971. – Vol. 10. – P. 2606–2616.
 17. *Laemli U.K.* Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. – 1970. – Vol. 227. – P. 680.