

УДК 617-089-168.1+616.34-007.272+557.146.1

НОРМАЛІЗАЦІЯ АКТИВНОСТІ ГЛЮКОЗИДАЗ ПЕРИТОНЕАЛЬНОЇ РІДИНИ ЯК КРИТЕРІЙ ПРОТИСПАЙКОВОЇ ЕФЕКТИВНОСТІ ЕНДОГЕННИХ ПЕПТИДІВ ЗА УМОВ СПАЙКОВОЇ ХВОРОБИ

В.М. Демидов, С.М. Демидов

Одеський державний медичний університет

Реферат. Завдяки збільшенню кількості оперативних втручань в черевній порожнині хірурги додатково до основної мають зараз вирішувати іншу суттєву проблему – запобігання утворення післяопераційних спайок. Недостатня ефективність лікувально-профілактичних мироприємств за умов спайкової хвороби (СХ), ймовірно, обумовлена неповними та недостатніми уявленнями про патофізіологічні механізми захворювання. Мета роботи – визначення порівняльної ефективності сандостатина, даларгіна та дельтарана за умов експериментальної СХ, зважаючи на зміну активності ферментів, які приймають участь у процесі колагеноутворення. Матеріал та методи. Досліди було проведено за умов хронічного експерименту на щурах лінії Вістар, в яких СХ відтворювали скарифікацією очеревини. Для лікування СХ через 30 хв з моменту її моделювання впродовж 5 діб в/очер вводили сандостатин, даларгін та дельтаран. Через 1, 3, 6, 12, 24, 36 і 48 год з моменту відтворення патологічного стану в перитонеальній рідині (ПР) щурів визначали активність N-ацетил- β -глюкозамінідази, N-ацетил- β -галактозамінідази та β -глюкуронідази. Результати. Перебіг СХ в щурів характеризується суттєвим зростанням активності β -глюкозидаз ПР, причому в найбільшому ступені було відзначено зростання активності N-ацетил- β -глюкозамінідази. За експериментальних умов СХ виявлено протиспайкову активність сандостатину, даларгіну та дельтарану з акцентом на нормалізацію під їх впливом активності перитонеальних β -глюкозидаз. Більш виражену ефективність спричинили сандостатин та дельтаран, під впливом яких активність досліджуваних ферментів починала нормалізовуватися вже з 6 год після відтворення СХ. Протиспайкова активність даларгіну за цих умов відрізнялася лише 6-год “запізненням” дії. Висновки. Виражена протиспайкова ефективність нейропептидів за умов СХ у щурів є експериментальним підґрунтям доцільності тестування протиспайкової ефективності сандостатину, даларгіну та дельтарану в клінічних умовах при лікуванні або профілактиці розвитку вказаної патології.

Ключові слова: спайкова хвороба, сандостатин, даларгін, дельтаран, β -глюкозидази, перитонеальна рідина.

Завдяки збільшенню кількості оперативних втручань в черевній порожнині хірурги додатково до основної мають зараз вирішувати іншу суттєву проблему – запобігання утворення післяопераційних спайок [1, 5, 8]. За зниженням або стійкій втраті працездатності, функціональним порушенням, значним відсотком летальності при повторних оперативних втручаннях та зниженням якості життя спайкова хвороба (СХ) є небажаним ускладненням

оперативних втручань та однією з невирішених проблем абдомінальної хірургії, гінекології, ендоскопії та інших галузях медицини [1, 15]. Останніми роками збільшується кількість хворих з цією патологією, що обумовлено значною мірою збільшенням кількості хворих, оперованих на органах черевної порожнини, що зв'язано з розширенням показів до радикальних операцій, удосконаленням існуючих операцій та ін. [1, 2, 17]. Таке становище, саме, недостатня ефективність лікувально-профілактичних мироприємств за умов СХ, ймовірно, обумовлено неповними та недостатніми уявленнями про патофізіологічні механізми захворювання і через це – відсутністю специфічного лікування. Відомо, що СХ розвивається внаслідок розвитку гострого запального процесу в очеревині [2, 8]. Відомо також активація процесу колагеноутворення за умов зазначеної патології [15]. Показано також протизапальні ефекти ендогенних нейропептидів – сандостатина, даларгіна та похідного дельта-сон індукуючого пептида (ДСІП) – дельтарана – за умов гострих запальних процесів органів черевної порожнини [3, 4, 6, 12, 13].

Мета роботи

Визначення порівняльної ефективності сандостатина, даларгіна та дельтарана за умов експериментальної СХ, зважаючи на зміну активності ферментів, які приймають участь у процесі колагеноутворення.

Матеріал та методи

Досліди було проведено за умов хронічного експерименту на щурах-самцях лінії Вістар, яких містили в індивідуальних боксах з природною 12-год зміною світла і темряви, вологістю повітря 60% та його температурою $22 \pm 1^\circ\text{C}$, з вільним доступом до води та їжі, відповідно до вимог, які містяться в «Основних методах изучения токсичности потенциальных фармакологических препаратов» (Фармкомітет України, Київ, 2000). Роботу з лабораторними тваринами проводили з урахуванням вимог, передбачених Європейською комісією з нагляду за проведенням лабораторних і інших дослідів за участю експериментальних тварин різних видів, а також етичних норм і правил,

затверджених комісією з етики проведення експериментальних досліджень Одеського державного медичного університету. Методи знеболення та позбавлення життя тварин за дослідних умов були такими, які узгоджуються з “Правилами виконання робіт з використанням експериментальних тварин”, затвердженими наказом МОЗ України.

СХ в щурів відтворювали скарифікацією парієтальної очеревини тварин. Для лікування через 30 хв з моменту її моделювання впродовж 5 днів внутрішньоочеревинно (в/очер) вводили сандостатин (50 мкг/кг) – 1 дослідна група (n=32), даларгін (50 мкг/кг) – 2 дослідна група (n=32) та дельтаран (100 мкг/кг) – 3 дослідна група (n=32). Була також група тварин із відтвореною СХ, яким в/очер вводили однакові об’єми фізіологічного розчину (n=12). Контрольними вважалися інтактні тварини, яким під анестезією лише розрізали шкіру, очеревину не чіпали, а потім зшивали (n=10).

Введення пептидів здійснювали в однаковий час, приблизно з 9,00 до 10,00 ранку. Зважаючи на показану максимальну вираженість біохімічних та патоморфологічних проявів СХ упродовж 48 год [7], визначення активності N-ацетил-β-глікозамінідази, N-ацетил-β-галактозамінідази та β-глюкуронідази в перитонеальній рідині (ПР) щурів проводили через 1, 3, 6, 12, 24, 36 і 48 год з моменту відтворення патологічного стану. Для цього в кожний із вказаних інтервалів часу з кожної групи тварин виводили з дослідження передозуванням етанолу натрію (100 мг/кг, в/очер) 4 щурів, розтинали черевну порожнину та вивчали вплив застосованого лікування на активність β-глюкозидаз ПР.

Активність β-глюкозидаз визначалася за допомогою р-нітрофеніл-β-глікозидів в якості субстрату за методикою [14]. Одну частину (100 мкл) ПР було інкубовано з 600 мкл розчину субстрату (3,5 мМ субстрату, 50 мМ цитратного буфера, рН=4,5) при 37°C упродовж 40 хв. Реакцію зупиняли додаванням 1,2 мл 0,4 М NaOH-гліцинового буфера (рН=10,5), а потім кількість звільненого р-нітрофенола вимірювали спектрофотометром при довжині хвилі 410 нм на приладі Hitachi (Японія). В якості субстратів для визначення N-ацетил-β-глікозамінідази, N-ацетил-β-галактозамінідази та β-глюкуронідази використовували розчини р-нітрофеніл-N-ацетил-β-глікозамінід, р-нітрофеніл-N-ацетил-β-галактозамінід і р-нітрофеніл-β-глюкоронід (“Sigma”, США), відповідно.

Отримані дані обраховували статистично із застосуванням непараметричного критерію

Крушккал-Валліса. $P < 0,05$ обирали критерієм вірогідності.

Результати та обговорення

Відносні показники активності досліджуваних β-глюкозидаз в ПР щурів через 1 год після відтворення СХ дорівнювали в середньому $2,74 \pm 0,32$ ум. од., $1,36 \pm 0,14$ ум. од. та $0,89 \pm 0,08$ ум. од. для N-ацетил-β-глікозамінідази, N-ацетил-β-галактозамінідази та β-глюкуронідази, відповідно. Слід відзначити, що отримані значення активності досліджуваних ферментів ПР у 8, 4 та у 3 рази перевищували відповідні значення, які були отримані в контрольних спостереженнях (рис. 1-3).

За таких умов сандостатин та дельтаран суттєво зменшили активність N-ацетил-β-глікозамінідази, починаючи з 6 год дослідження порівняно з відповідними показниками в ПР щурів, яким вводили лише фізіологічний розчин ($P < 0,05$). Через 12 год з моменту відтворення СХ активність N-ацетил-β-глікозамінідази в ПР щурів під впливом сандостатину, даларгіну та дельтарану становила в середньому $2,44 \pm 0,23$ ум. од., що було на 17% менше порівняно аналогічними показниками в ПР щурів із СХ, лікування яких не проводилося ($P < 0,05$). В подальшому, динаміка зменшення активності досліджуваного ферменту мала схожу спрямованість.

Аналогічну динаміку мали зміни активності інших досліджуваних ферментів – N-ацетил-β-галактозамінідази та β-глюкуронідази. Можна

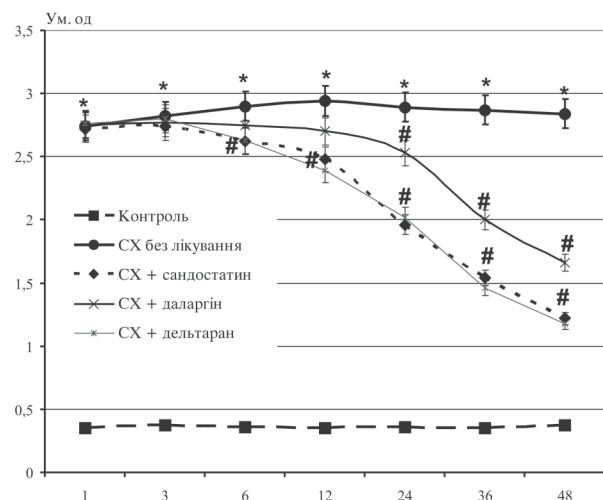


Рис. 1. Вплив сандостатина, даларгіна та дельтарану на динаміку активності N-ацетил-β-глікозамінідази в перитонеальній рідині щурів із спайковою хворобою. За вісью ординат – відносна активність N-ацетил-β-глікозамінідази, ум. од. За вісью абсцис – 1-48, год з моменту відтворення спайкової хвороби. Позначення: * – $P < 0,001$ – вірогідні розбіжності досліджуваного показника порівняно з відповідними даними у щурів контрольної групи; # – $P < 0,05$ – вірогідні розбіжності досліджуваного показника порівняно з відповідними даними у щурів із спайковою хворобою без лікування (тут і надалі застосовано статистичний критерій Крушккал-Валліса)

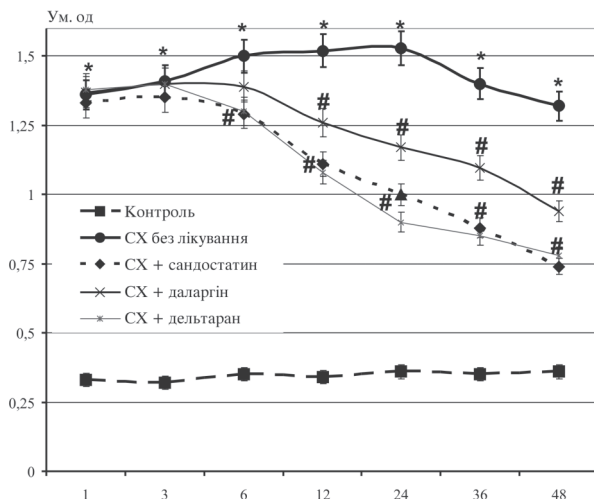


Рис. 2. Вплив сандостатина, даларгіна та дельтарана на динаміку активності N-ацетил- β -галактозамінази в перитонеальній рідині щурів із спайковою хворобою. За віссю ординат – відносна активність N-ацетил- β -галактозамінази, ум. од. За віссю абсцис – 1-48, год з моменту відтворення спайкової хвороби. Позначення: * – $P < 0,001$ – вірогідні розбіжності досліджуваного показника порівняно з відповідними даними у щурів контрольної групи; # – $P < 0,05$ – вірогідні розбіжності досліджуваного показника порівняно з відповідними даними у щурів із спайковою хворобою без лікування.

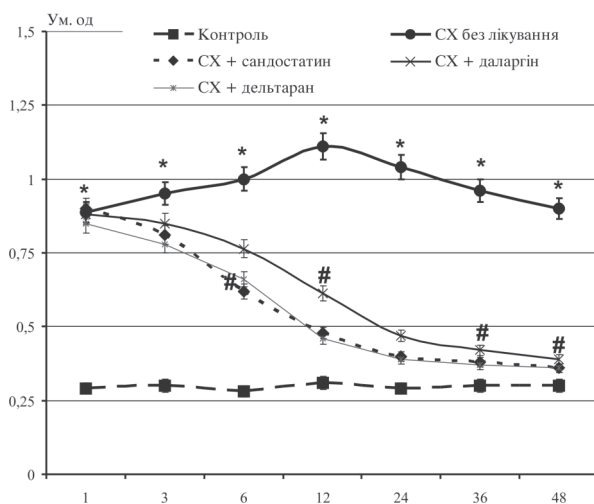


Рис. 3. Вплив сандостатина, даларгіна та дельтарана на динаміку активності β -глюкуронідази в перитонеальній рідині щурів із спайковою хворобою. За віссю ординат – відносна активність β -глюкуронідази, ум. од. За віссю абсцис – 1-48, год з моменту відтворення спайкової хвороби. Позначення: * – $P < 0,001$ – вірогідні розбіжності досліджуваного показника порівняно з відповідними даними у щурів контрольної групи; # – $P < 0,05$ – вірогідні розбіжності досліджуваного показника порівняно з відповідними даними у щурів із спайковою хворобою без лікування.

простежити, що активність зазначених ферментів ПР щурів із СХ під впливом сандостатину та дельтарану через 6 год була вже суттєво меншою при порівнянні з такими даними у щурів із СХ, лікування яким не проводили ($P < 0,05$). А починаючи з 12 год після відтворення патологічного стану досліджувані показники вже мали вірогідні розбіжності пвд лікувальним впливом

всіх нейропептидів ($P < 0,05$).

Таким чином, проведені дослідження та отримані дані можна розглядати з точки зору трьох напрямків. По-перше, виявлено, що перебіг СХ в щурів характеризується суттєвим зростанням активності β -глюкозидаз ПР, причому в найбільшому ступені було відзначено зростання активності N-ацетил- β -глюкозамінази. Ймовірно, що активність саме цього ферменту, який приймає участь в обміні гіалуронові кислоти та синтезі колагену, можна розглядати в якості специфічного маркера запалення очеревини упродовж процесу надлишкового спайкоутворення. Причина зростання активності β -глюкозидаз полягає, за нашою думкою, у активації за умов загального запального процесу очеревини синтезу колагену, а також у зростанні за даних умов проникності мембран її парієтального шару. Останнє постає зрозумілим, якщо нагадати, що за умов травматизації очеревини знижується або змінюється фібринолітична активність клітин мезотелію з проліферацією деяких типів клітин. Стимулюється також виділення гістаміну, що сприяє збільшенню проникності кровоносних судин, підсиленню кровопостачання до очеревини та зростанню вмісту посередників запалення. Підвищена проникність судин і ексудація сприяють випаданню фібрину з подальшим склеюванням серозних поверхонь сусідніх органів на тлі парезу кишківника, що виникає в ранньому післяопераційному періоді [15]. І вже на 3-ю добу починається інфільтрація фібрину фібробластами, які продукують колагенові волокна.

По-друге, наші дані показали лікувальну протиспайкову ефективність досліджуваних нейропептидів – сандостатину, даларгіну та дельтарану – з акцентом на нормалізацію під їх впливом активності перитонеальних β -глюкозидаз. При цьому більш виражену (кількісну та термінову – якісну) ефективність спричинили сандостатин та дельтаран, під впливом яких активність досліджуваних ферментів починала нормалізуватися вже з 6 год після відтворення СХ. Протиспайкова активність даларгіну за цих умов мала 6-годинний зсув, тобто відрізнялася лише “запізненням” дії.

По-третє, інтересними є показані протиспайкові ефекти дельтарану, що, за нашою думкою, є достатньо обнадійливим результатом в аспекті потенційної розробки нової схеми лікування або попередження спайкоутворення. Зважаючи на те, що цей пептид є похідним ДСП, важливо звернути увагу на те, що ДСП є безпосередньо ендogenous речовиною. Ймовірно, що за умов гострого запального процесу

в організмі, яким є СХ, дельтаран вільно надходить до ураженої ділянки очеревини та спричиняє протективну дію. Подібне пояснення протиспайкової дії стає зрозумілим, якщо взяти до уваги показані протистресорні, антиішемічні, репаративні та мембраностабілізуючі ефекти дельтарану та ДСПП [9, 10, 16].

Резюмуючи, слід висловити, що проведені дослідження, які виявили виражену протиспайкову ефективність нейропептидів за умов СХ у щурів, є експериментальним підґрунтям доцільності тестування протиспайкової ефективності сандостатину, даларгіну та дельтарану в клінічних умовах при лікуванні або профілактиці розвитку вказаної патології.

З а к л ю ч е н н я

1. Перебіг СХ у щурів характеризується суттєвим зростанням активності β -глюкозидаз ПР. В найбільшому ступені за дослідних умов було відзначено зростання активності N-ацетил- β -глюкозамінідази.

2. Сандостатин, даларгін та дельтаран виявили виражену протиспайкову ефективність стосовно нормалізації активності перитонеальних β -глюкозидаз. При цьому більш виражену ефективність спричинили сандостатин та дельтаран, під впливом яких активність досліджуваних ферментів починала нормалізовуватися вже з 6 год після відтворення СХ.

3. Виражена протиспайкова ефективність нейропептидів за умов СХ у щурів є експериментальним підґрунтям доцільності тестування протиспайкової ефективності сандостатину, даларгіну та дельтарану в клінічних умовах при лікуванні або профілактиці розвитку вказаної патології.

НОРМАЛИЗАЦІЯ АКТИВНОСТІ ГЛЮКОЗИДАЗ ПЕРИТОНЕАЛЬНОЇ ЖИДКОСТІ КАК КРИТЕРІЙ ПРОТИВОСПАЄЧНОЇ ЕФЕКТИВНОСТІ ЕНДОГЕННИХ ПЕПТИДОВ ПРИ СПАЄЧНОЇ БОЛЕЗНИ

В.М. Демидов, С.М. Демидов

Реферат. Вследствие увеличения количества оперативных вмешательств в брюшной полости хирурги дополнительно к основной вынуждены решать еще и дополнительную проблему – предупреждение образования послеоперационных спаек. Недостаточная эффективность лечебно-профилактических мероприятий при спаечной болезни (СБ), по всей видимости, обусловлена неполными и недостаточными представлениями о патофизиологических механизмах заболевания. Цель работы – определение сравнительной эффективности сандостатина, даларгина и дельтарана в условиях экспериментальной СБ с учетом изменения активности ферментов, принимающих участие в процессе коллагенообразования. Материал и методы. Опыты были проведены в условиях хронического эксперимента на крысах линии Вистар, СБ у которых воспроизводили скарификацией брюшины. Для её лече-

ния через 30 мин в течение 5 дней в/бр вводили сандостатин, даларгин и дельтаран. Через 1, 3, 6, 12, 24, 36 и 48 час с момента воспроизведения патологического состояния в перитонеальной жидкости (ПЖ) крыс определяли активность N-ацетил- β -глюкозаминидазы, N-ацетил- β -галактозаминидазы и β -глюкуронидазы. Результаты. Течение СБ у крыс характеризуется значительным увеличением активности перитонеальных β -глюкозидаз, причем в наибольшей степени была увеличена активность N-ацетил- β -глюкозаминидазы. При экспериментальной СБ была показана противоспаечная активность сандостатина, даларгина и дельтарана с акцентом на нормализацию под их влиянием активности β -глюкозидаз ПЖ. Более выраженную эффективность оказывали сандостатин и дельтаран, под влиянием которых активность исследуемых ферментов начинала нормализовываться уже через 6 час после воспроизведения СБ. Противоспаечная активность даларгина в этих условиях отличалась лишь 6-час “запаздыванием” действия. Выводы. Выраженная противоспаечная эффективность нейропептидов в условиях СБ у крыс является экспериментальным обоснованием целесообразности тестирования противоспаечной эффективности сандостатина, даларгина и дельтарана в клинических условиях при лечении или профилактике развития данной патологии.

Ключевые слова: спаечная болезнь, сандостатин, даларгин, дельтаран, β -глюкозидазы, перитонеальная жидкость.

PERITONEAL GLUCOSIDASES ACTIVITY NORMALIZATION RESULTS DUE TO ENDOGENOUS NEUROPEPTIDES ANTIADHESIVE EFFICACY IN CONDITIONS OF ADHESIONS

V.M. Demidov, S.M. Demidov

Abstract. Peritoneal organs operative procedures increasing results in additional problem appearance due to which surgeons have to prevent the postoperative adhesions formation. Curing and prophylactic events insufficient efficacy seems to be as the result of adhesions pathophysiological mechanisms unclear estimation. The aim of the work – comparative evaluation of sandostatin, dalargin and deltaran efficacy in conditions of experimental adhesions taking into consideration changing of the enzymes activity that catalyzing collagen synthesis. Material and methods. The experiments were performed in chronic conditions using Wistar rats. Adhesions were modeled through peritoneum scarification. Sandostatin, dalargin and deltaran started to be administered 30 min after disease initiation. Peritoneal N-acetyl- β -glucosaminidase, N-acetyl- β -galactosaminidase and β -glucuronidase activities were determined 1, 3, 6, 12, 24, 36 and 48 hrs after adhesions modeling. Results. Adhesions manifestation characterised by peritoneal β -glucosidases activity significant increasing, besides, N-acetyl- β -glucosaminidase activity was increased maximally. Sandostatin, dalargin and deltaran revealed antiadhesive activity during the experimental adhesions accentuating on peritoneal β -glucosidases activity normalization under their influences. Sandostatin and deltaran activity was mostly expressed that characterises by the investigated enzymes activity normalization 6 hrs after the adhesions modeling. Dalargin protecting activity delayed for 6 hrs. Conclusions. Neuropeptides antiadhesive efficacy in conditions of experimental adhesions serves as experimental background of sandostatin, dalargin and deltaran antiadhesive activity testing in clinical conditions for adhesions treatment or prophylaxy.

Key words: adhesions, sandostatin, dalargin, deltaran, β -glucosidases, peritoneal liquid.

ЛІТЕРАТУРА

1. Абдуллаев Э. Г. Адгезиолизис под видеоконтролем в экстренной и плановой хирургии спаечной болезни органов брюшной полости / В. В. Феденко, А. И. Александров // Эндокопическая хирургия. – 2001. – № 3. – С. 13-15.
2. Демидов В. М. Спосіб профілактики утворення спайок після операцій на органах черевної порожнини / В. М. Демидов, М. Ю. Ничитайло, Б. С. Запорожченко, С. М. Демидов. – Метод. рекомендації : Одеса, 2002. – 14 с.
3. Демидов В. М. Внутрішньобурсальне введення розчинів нейропептидів при лапароскопічних операціях з приводу гострого деструктивного панкреатиту з лікувальною та профілактичною метою для запобігання розвитку післяопераційної спайкової хвороби / В. М. Демидов, С. М. Демидов, С. О. Куліш [та ін.] // Шпитальна хірургія. – 2003. – №2. – С. 61-64.
4. Демидов В. М. Підвищення ефективності лікування хворих на гострий панкреатит через внутрішньоартеріальне введення сандостатину / В. М. Демидов, А. М. Торбинський, С. М. Демидов // Вісник Української медичної стоматологічної академії: Актуальні проблеми сучасної медицини. – 2005. – Т.5, Вип.1(9). – С. 27-29.
5. Демидов В. М. Комплексное лечение острого панкреатита с акцентом на предотвращение развития послеоперационной спаечной болезни / В. М. Демидов, А. М. Торбинский, Д. В. Новиков, Е. В. Сафронова // Анналы хирургической гепатологии. – 2007. – Т.12, №3. – С. 180-181.
6. Демидов В. М. Экспериментальная разработка лечебно-профилактических мероприятий возможности развития спаечной болезни / В. М. Демидов, Д. В. Новиков // Анналы хирургической гепатологии. – 2008. – Т.13, №3. – С. 224.
7. Демидов В. М. Ефективність корекції процесу надлишкового спайкоутворення нейропептидами в експерименті за умов модуляції активності симпатичного та парасимпатичного відділів вегетативної нервової системи / В. М. Демидов, А. М. Торбинський, Д. В. Новиков, О. В. Сафронова // Университетская клиника. – 2008. – Т.4, №1. – С. 21-24.
8. Женчевский Р. А. Спаечная болезнь / Р. А. Женчевский. – М. : Медицина, 1989. – 192 с.
9. Конорова И. Л. Дельтатан предотвращает побочные эффекты эмоционального стресса при ишемии мозга у мало-резистентных животных / И. Л. Конорова, И. В. Ганнушкина, Е. В. Коплик, А. Л. Антелава // Бюлл. эксперим. биол. мед. – 2006. – Т.141, №5. – С. 564-566.
10. Михалева И. И. Взаимодействия дельта-сон индуцирующего пептида и его аналогов с клеточными мембранами: структурно-функциональный анализ / И. И. Михалева, Г. И. Рихирева, И. А. Прудченко, И. Н. Голубев // Биоорг. химия. – 2006. – Т.32, №2. – С. 176-182.
11. Побуцький О. О. Корекція панкреатогенної ендогенної інтоксикації шляхом ендолімфатичного введення нейропептидів / О. О. Побуцький // Галицький лікарський вісник. – 2001. – Т.8, №1. – С. 76-78.
12. Покидько М. І. Вивчення активності тканинного активатора плазміногену мезотелію очеревини в умовах моделювання злукового процесу / М. І. Покидько // Медична хімія. – Тернопіль. – Т.3. – 2001. – С. 32-36.
13. Demidov V. M. Efficacy of using noninvasive technique of dalargin and sandostatin in complex therapy of acute pancreatitis / V. M. Demidov, A. M. Torbinsky, S. M. Demidov, V. N. Gnatenko – Abstr. of the 15th EAES Intern. Congress. – Athens, 2007. – P. 189-190.
14. Dopitova R. Functional analysis of the aglycone-binding site of the maize beta-glucosidase Zm-p60.1 / R. Dopitova, P. Mazura, L. Janda. [et al.] // FEBS J. – 2008. – Vol.275 (24). – P. 6123-6135.
15. Hellebrekers B. Use of fibrinolytic agents in the prevention of post-operative adhesion formation / B. Hellebrekers, T. Trimbo-Kemper, J. Trimbo [et al.] // Fertil. Steril. – 2000. – Vol.74. – P. 203-209.
16. Kovalzon V. M. Delta sleep-inducing peptide (DSIP): a still unresolved riddle / V. M. Kovalzon, T. V. Strekalova / J. Neurochem. – 2006. – Vol.97, N2. – P. 303-309.
17. Menzies D. Peritoneal adhesions: incidence, cause and prevention / D. Menzies // Surg. Annu. – 1992. – Vol.24. – P. 27-45.