

Т.И. Лелявина, Г.Ф. Жигаев, Е.Н. Цыбиков, М.П. Рябов

АКТИВНОСТЬ ПРОЦЕССОВ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ В ПИЩЕВОДЕ В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ ПАТОЛОГИЧЕСКОГО БИЛИАРНОГО РЕФЛЮКСА

НЦ РВХ ВСНЦ СО РАМН (Иркутск)
Бурятский филиал НЦ РВХ ВСНЦ СО РАМН (Улан-Удэ)
Бурятский государственный университет (Улан-Удэ)
Республиканская клиническая больница им. Н.А. Семашко (Улан-Удэ)

Авторами представлены данные экспериментов, которые дают право полагать, что при экспериментальной модели билиарного (щелочного) эзофагеального рефлюкса наступает реакция слизистой оболочки пищевода, изменения последней зависят от продолжительности активации ПОЛ.

Ключевые слова: экспериментальная модель билиарного эзофагеального рефлюкса, ПОЛ

ACTIVITY OF LIPID PEROXIDATION PROCESSES IN ESOPHAGUS IN CONDITION OF EXPERIMENTAL MODEL OF PATHOLOGIC BILIARY REFLUX

T.I. Leliavina, G.F. Zhigayev, E.N. Tsibikov, M.P. Ryabov

SC RRS ESSC SB RAMS, Irkutsk
Buryat Branch of SC RRS ESSC SB RAMS, Ulan-Ude
Buryat State University, Ulan-Ude
N.A. Semashko's Republican Clinical Hospital, Ulan-Ude

The authors presented the data of experiments which give the right to make a supposition that at experimental model of biliary (alkaline) esophageal reflux there is a reaction of esophageal mucosa. The change in the mucosa depends on duration of activation of lipid peroxidation processes.

Key words: experimental model of pathologic biliary reflux, lipid peroxidation

К настоящему времени не вызывает сомнения ведущая роль рефлюкса в формировании гастроэзофагеальной рефлюксной болезни (ГЭРБ), который обостряет симптомы последней и неблагоприятно влияет на прогноз заболевания [6, 13]. Если механизмы агрессивного воздействия кислоты на слизистую оболочку (СО) пищевода достаточно хорошо изучены, то проблема щелочного (билиарного) рефлюкса остается дискуссионной [1, 7, 9]. Дуоденогастроэзофагеальный рефлюкс повышает интрагастральное давление, нарушает защитные механизмы, стимулирует агрессивное воздействие желудочного сока, оказывает прямое повреждающее действие на слизистую оболочку пищевода, увеличивает частоту клеточных мутаций (неполярная форма желчных кислот) и тем самым способствует развитию ГЭРБ и ее осложнений [2, 3, 5, 11, 14]. Исследования авторов [8, 10, 12, 13] показали, что повреждение слизистой оболочки (СО) пищевода дуоденальным содержимым приводит к развитию не только «химического» эзофагита, но и «специализированной» кишечной метаплазии (пищевод Барретта) способной к диспластическому изменению и развитию инвазивной аденокарциномы. Учитывая эти данные, а также принимая во внимание полученные за последние годы сведения о роли ускорения свободнорадикального окисления липидов в развитии заболеваний желудоч-

но-кишечного тракта и гепатобилиарной системы, мы посчитали необходимым продолжить работу по оценке роли активации свободнорадикального окисления липидов в механизмах повреждения пищевода при рефлюкс-эзофагите на фоне патологического дуоденогастроэзофагеального рефлюкса в эксперименте. Процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) определяют состояние клеточных мембран и в связи с этим в значительной степени влияют на морфофункциональное состояние органов [4]. Поэтому, изучение активности ПОЛ в стенке пищевода при воспалительном повреждении может прояснить морфофункциональные изменения органов гепатобилиарной зоны.

Цель работы: показать роль ПОЛ в патологии пищевода в условиях экспериментальной модели дуоденогастроэзофагеального рефлюкса.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальное исследование проведено на 25 беспородных собаках обоего пола в возрасте 2–3 года, с исходной массой около 10–15 кг. Его алгоритм полностью соответствовал законодательным актам РФ о научных разработках с использованием лабораторных животных. Животные содержались в одинаковых условиях на стационарном виварном режиме, на рационе питания, соответствующего нормативам ГОСТа

«Содержание экспериментальных животных в питомниках НИИ» и в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей. По характеру выполненных операций животные были выделены в 3 группы: **1)** первая группа (n = 10), гастрэктомия с эзофагоэюностомией; **2)** вторая группа (n = 10), резекция желудка по Бильрот-2; **3)** контрольная группа (n = 5), желудочная фистула. Все операции выполняли под общей анестезией по общепринятой методике с соблюдением правил асептики и антисептики. Животных наблюдали от одной недели до 3 месяцев. Четыре собаки погибли на 4-е и 5-е сутки. На секции причиной гибели двух собак с 1 группы была несостоятельность эзофагоэюноанастомоза, у двух собак 2-й группы — некроз в области малой кривизны. Для выяснения влияния дуоденоэзофагеального рефлюкса на процессы липопероксидации в слизистой оболочке пищевода у экспериментальных животных в остром опыте во время операции и послеоперационном периоде производили биопсию из 4–5 точек в дистальном отделе пищевода. Из биопсийного материала готовили гомогенаты, определяли содержание продуктов ПОЛ в СО пищевода, активность аминотрансфераз, щелочной фосфатазы и содержание сульфгидрильных групп в крови через 1, 2 и 4 часа после эксперимента, а также через 10, 20 и 30 дней после операции.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В большей степени процессы перекисного окисления липидов усиливались в первой группе по сравнению со второй (табл. 1).

Содержание диеновых конъюгатов (ДК) и малонового диальдегида (МДА) через час после операции превышало исходный уровень в СО пищевода соответственно на 45 и 26 %, в крови на 21 и 11 %. Через 2 часа после тотальной гастрэктомии и эзофагоэюностомии содержание продуктов ПОЛ

продолжало повышаться, достигая максимального уровня к третьему сроку наблюдения, то есть через 4 часа после окончания операции. Так, ДК в гомогенатах СО дистального отдела пищевода и крови составляли в среднем $0,91 \pm 0,04$ и $72,14 \pm 2,9$ мкмоль/л, что выше контрольных величин, соответственно в 2,1 и 1,9 раза. Содержание МДА в этих биосубстратах повышалось с $45,81 \pm 6,9$ до $98,18 \pm 5,1$ нмоль/г (в 2,1 раза) и $5,73 \pm 0,8$ до $8,90 \pm 0,83$ мкмоль/л (в 1,5 раза). Через 10 дней интенсивность процессов ПОЛ у экспериментальных животных 1 и 2 групп начинала снижаться лишь на 20 день после операции. Содержание ДК в СО пищевода и в крови составляли $0,853 \pm 0,04$ и $58,92 \pm 4,3$ мкмоль/л, что соответственно в 2 и 1,6 раза выше контрольных величин, а уровень МДА $80,40 \pm 7,2$ и $7,02 \pm 1,0$ мкмоль/л, соответственно в 1,7 и 1,2 раза.

Через 20 суток уровень ДК и МДА превышал исходный фон в СО пищевода на 40 и 35 %, а в крови — на 34 и 20 %. Как показали результаты нашего исследования, у экспериментальных животных второй группы изменялась интенсивность перекисного окисления ненасыщенных жирных кислот клеточных мембран. Об этом свидетельствовало увеличение содержания диеновых конъюгатов и малонового диальдегида в гомогенатах СО дистального отдела пищевода и в крови экспериментальных животных (табл. 2).

Через 1 час после резекции желудка отмечалась тенденция к увеличению уровня МДА и статистически достоверное повышение ДК в СО пищевода (в среднем от $0,38 \pm 0,03$ до $0,54 \pm 0,02$ мкмоль в 1,4 раза). В то же время заметных изменений в уровне МДА в крови не отмечалось, а содержание ДК снижалось. Через 2 часа после резекции желудка содержание МДА в биоптатах СО пищевода увеличивалось до статистически значимых величин, в среднем до $57,69 \pm 5,16$ нмоль/г, что превышает контроль на 25,6 %. Уровень ДК продолжал повышаться. Содержание ДК в крови также возрастало (в сред-

Таблица 1
Содержание продуктов ПОЛ в крови и СО пищевода у экспериментальных животных первой и второй группы (M ± m)

Срок исследования	Кол-во животных	Кровь		Биоптаты СО дистального отдела пищевода	
		ДК, мкмоль/л	МДА, мкмоль/л	ДК, мкмоль/г	МДА, нмоль/г
Контроль	5	$36,56 \pm 1,46$	$5,73 \pm 0,8$	$0,426 \pm 0,1$	$45,81 \pm 6,9$
1 час	10	$44,50 \pm 1,2$	$6,41 \pm 0,5$	$0,618 \pm 0,02^*$	$58,05 \pm 2,7^*$
2 часа	10	$59,05 \pm 4,7^*$	$7,04 \pm 1,0^*$	$0,805 \pm 0,03^*$	$71,55 \pm 4,1^*$
4 часа	10	$72,14 \pm 2,9^*$	$8,90 \pm 0,8^*$	$0,912 \pm 0,04^*$	$98,18 \pm 5,1^*$
10 суток	8	$71,75 \pm 4,7^*$	$8,75 \pm 0,9^*$	$0,892 \pm 0,06^*$	$96,10 \pm 4,1$
20 суток	8	$58,92 \pm 4,3^*$	$7,02 \pm 1,0^*$	$0,853 \pm 0,04^*$	$80,40 \pm 7,2^*$
30 суток	8	$49,02 \pm 2,1^*$	$6,04 \pm 0,6^*$	$0,602 \pm 0,08^*$	$62,30 \pm 3,0^*$

Примечание: * – результат статистически достоверен.

нем с $36,36 \pm 2,93$ до $48,42 \pm 3,66$ мкмоль/л, или в 1,3 раз). К этому периоду содержанием МДА на 11 % превышало исходный уровень.

Через 4 часа после резекции желудка накопление продуктов липопероксидации было максимальным, о чем свидетельствует повышение содержания ДК и МДА в СО пищевода с $0,38 \pm 0,02$ до $0,61 \pm 0,03$ нмоль/г и с $45,93 \pm 5,16$ до $71,55 \pm 4,14$ нмоль/г или соответственно на 40 и 55 % и в крови с $36,36 \pm 2,93$ до $49,82 \pm 6,61$ мкмоль/л и с $5,44 \pm 0,41$ до $7,04 \pm 0,61$ мкмоль/л, соответственно на 37 и 29 %.

На 10 день у экспериментальных животных второй группы содержание ДК и МДА в СО пищевода снижалось, однако оставалось повышенным в СО на 38 и 19 %, в крови на 16 и 10 %. Этот показатель ПОЛ приближался к контрольным величинам у 5 через 20, а у 3 животных — через 30 дней. Таким образом, после резекции желудка процесс перекисного окисления липидов в СО пищевода, так и в крови, усиливается, особенно в первые 4 часа после операции.

После резекции желудка и воспроизведения билиарного эзофагиального рефлюкса в пище-

вод у экспериментальных животных возникали изменения и со стороны показателей количества сульфгидрильных (SH-) и дисульфидных групп белковых и низкомолекулярных веществ крови и СО пищевода. Определение S-H-групп проводили по методу Ю.М. Торчинского (1977). В частности, отмечалось уменьшение содержания сульфгидрильных групп и увеличение дисульфидных связей, особенно через 2 часа после операции (табл. 3). Так, содержание S-H-групп в крови и СО пищевода снижалось с $118,23 \pm 0,40$ до $13,99 \pm 0,44$ ммоль/л ($p < 0,05$) и с $17,80 \pm 0,48$ до $15,35 \pm 0,54$ мкмоль/г ($p < 0,01$; $p < 0,05$).

Через 4 часа после резекции желудка уменьшение количества S-H-групп в СО пищевода экспериментальных животных второй группы незначительно увеличивалось содержание тиоловых соединений в крови. Количество S-S групп оставалось повышенным в обоих биосубстратах, дефицит сульфгидрильных групп в крови и биоптатах дистального отдела пищевода составлял соответственно 12 и 14 % при незначительном увеличении количества дисульфидных групп. Через 20 дней — происходило выравнивание по-

Таблица 2

Влияние дуодено-эзофагеального (билиарного) рефлюкса на содержание продуктов перекисного окисления липидов в крови и слизистой оболочке пищевода экспериментальных животных второй группы (M ± m)

Срок исследования	Кол-во животных	Кровь		Биоптаты СО дистального отдела пищевода	
		ДК, мкмоль/л	МДА, мкмоль/л	ДК, мкмоль/л	МДА, нмоль/г
Контроль	5	$36,36 \pm 2,9$	$5,44 \pm 0,41$	$0,382 \pm 0,0$	$45,93 \pm 5,0$
1 час	10	$32,30 \pm 2,7$	$5,87 \pm 0,93$	$0,545 \pm 0,0^*$	$48,08 \pm 7,0$
2 часа	10	$48,42 \pm 3,6^*$	$6,08 \pm 0,30^*$	$0,585 \pm 0,1^*$	$57,69 \pm 1,0^*$
4 часа	10	$49,82 \pm 6,6^*$	$7,04 \pm 1,03$	$0,613 \pm 0,03^*$	$71,55 \pm 4,1^*$
10 суток	8	$45,81 \pm 6,5$	$6,61 \pm 0,51^*$	$0,594 \pm 0,02^*$	$63,02 \pm 8,2$
20 суток	8	$42,29 \pm 2,1$	$5,97 \pm 0,60$	$0,530 \pm 0,01^*$	$54,70 \pm 3,7$
30 суток	8	$38,25 \pm 2,7$	$5,75 \pm 0,39$	$0,404 \pm 0,02$	$47,89 \pm 4,4$

Примечание: * – результат статистически достоверен.

Таблица 3

Содержание S-S и S-H-групп в крови и слизистой оболочке пищевода экспериментальных животных второй группы (M ± m)

Срок исследования	Кол-во животных	Кровь		Биоптаты СО дистального отдела пищевода	
		S-H группы, ммоль/л	S-S группы, ммоль/л	S-H группы, мкмоль/г	S-S группы, мкмоль/г
Контроль	5	$18,23 \pm 0,40$	$2,10 \pm 0,06$	$18,8 \pm 0,48$	$1,93 \pm 0,11$
1 час	10	$17,98 \pm 0,90$	$2,56 \pm 0,11$	$16,50 \pm 0,3$	$2,24 \pm 0,1$
2 часа	10	$13,99 \pm 0,4^*$	$3,02 \pm 0,10^*$	$15,35 \pm 0,5^*$	$3,62 \pm 0,2^*$
4 часа	10	$14,29 \pm 1,0^*$	$3,26 \pm 0,09^*$	$15,19 \pm 0,35^*$	$3,79 \pm 0,41^*$
10 суток	8	$16,01 \pm 0,5^*$	$3,72 \pm 0,38^*$	$15,39 \pm 0,4^*$	$2,75 \pm 0,1$
20 суток	8	$17,50 \pm 0,6$	$2,51 \pm 0,12$	$16,20 \pm 0,5$	$2,20 \pm 0,1$
30 суток	8	$17,45 \pm 0,71$	$2,47 \pm 0,10$	$17,20 \pm 0,6$	$1,90 \pm 0,1$

Примечание: * – результат статистически достоверен.

Таблица 4

Активность аминотрансфераз и щелочной фосфатазы в сыворотке крови экспериментальных животных первой группы ($M \pm m$)

Срок исследования	Кол-во животных	Активность ферментов в ммоль/(г/л)		
		АлАт	АсАт	ЩФ
Контроль	5	1,32 ± 0,07	1,00 ± 0,06	11,80 ± 0,73
1 час	10	2,65 ± 0,17*	2,04 ± 0,16*	15,10 ± 1,65*
2 часа	10	4,06 ± 0,13*	2,98 ± 0,29*	21,60 ± 0,88*
4 часа	10	5,42 ± 0,19*	3,84 ± 0,44*	24,12 ± 1,26*
10 суток	8	4,73 ± 0,34*	3,22 ± 0,31*	23,64 ± 1,14*
20 суток	8	4,11 ± 0,32	2,24 ± 0,17*	20,02 ± 1,65*
30 суток	8	3,3 ± 0,63	2,07 ± 0,11*	16,90 ± 0,68*

Таблица 5

Содержание S-S и S-H-групп в крови и слизистой оболочке пищевода экспериментальных животных первой группы ($M \pm m$)

Срок исследования	Кол-во животных	Кровь		Биоптаты СО дистального отдела пищевода	
		S-H группы, ммоль/л	S-S группы, ммоль/л	S-H группы, мкмоль/г	S-S группы, мкмоль/г
Контроль	5	22,60 ± 0,9	2,29 ± 0,28	21,84 ± 0,5	2,56 ± 0,17
1 час	10	21,20 ± 0,9	3,06 ± 0,09	19,78 ± 0,9	3,68 ± 0,28
2 часа	10	20,50 ± 0,7	3,64 ± 0,28*	18,43 ± 0,7	4,97 ± 0,20*
4 часа	10	19,78 ± 1,2	4,11 ± 0,19*	16,44 ± 0,1*	6,31 ± 0,35*
10 суток	8	18,99 ± 1,1*	4,28 ± 0,20*	15,94 ± 0,7*	6,06 ± 0,24*
20 суток	8	19,86 ± 0,5	3,94 ± 0,26	17,35 ± 0,6	5,32 ± 0,28*
30 суток	8	20,66 ± 0,8	3,82 ± 0,23	18,29 ± 0,5	4,57 ± 0,23*

Примечание: * – результат статистически достоверен.

казателей содержания как сульфгидрильных, так и дисульфидных групп.

Таким образом, результаты исследований ПОЛ во второй группе указывают на значительное нарушение окислительно-восстановительных процессов в организме экспериментальных животных и превалирование окислительных процессов над реакциями восстановительного характера. В наибольшей степени это происходит в первые 4 часа после операции, когда значительно инициированы процессы ПОЛ. Проведенные исследования показали, что в группе экспериментальных животных, которым была выполнена тотальная гастрэктомия и эзофагоэюностомия происходила более выраженная активация ПОЛ, чем у животных, второй группы. Содержание ДК и МДА, повышенный уровень продуктов липопероксидации сохранялся более 20 суток, а во второй приближалось к контролю через 10 дней. Наряду с резким повышением содержания продуктов ПОЛ, в первый же час после операции у животных первой группы наблюдалось значительное увеличение активности аминотрансфераз в сыворотке крови (табл. 4).

Уровень АлАТ и АсАТ в этот период повышался соответственно с $1,32 \pm 0,07$ до

$2,65 \pm 0,17$ ммоль/(г/л) и с $1,00 \pm 0,06$ до $2,04 \pm 0,16$ ммоль/(г/л), что выше контрольных величин в 2 раза. В последующие часы активность этих ферментов продолжала увеличиваться и через 4 часа превышала исходный уровень в 4,1, а АсАТ в 3,8 раза, активность ферментов несколько снижалась, оставаясь выше контрольных значений в 2,5 и 2 раза. Характерной особенностью изменений активности аминотрансфераз является параллелизм с динамикой одного из первичных продуктов ПОЛ – ДК. Усиление ПОЛ, активности аминотрансфераз в сыворотке крови сопровождалось адекватным снижением содержания S-H и увеличением S-S – групп в обоих биосубстратах (табл. 5).

К 4 часам максимально возрастало содержание ДК, МДА и S-S групп, а уровень S-H групп снижался до минимальных величин. Указанные показатели достигали контрольного уровня лишь к концу 10 – 20 суток.

Таким образом, представленные данные экспериментов дают право полагать, что при экспериментальной модели билиарного (щелочного) эзофагеального рефлюкса наступает реакция слизистой оболочки пищевода, изменения последней зависят от продолжительности активации ПОЛ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бабак О.Я. Гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь / О.Я. Бабак, Г.Д. Фадеенко. — К.: Интерфарма, 2000. — 175 с.
2. Белова Е.В., Вахрушев Я.М. // Терапевтический архив. — 2002. — № 2. — С. 17–20.
3. Буеверов А.О., Лапина Т.Л. // Фарматека. — 2006. — № 1. — С. 1–5.
4. Гаврилова В.Б., Гаврилов А.Р., Хмара Н.Ф. / Лабораторное дело. — 1988. — № 2. — С. 60–64.
5. Гуца А.Л., Баулин С.С., Подъяблонская И.А. // Вестник хирургии. — 1993. — № 3–4. — С. 21–25.
6. Захарченко М.М. Диагностика и коррекция состояния микробиоценоза у больных язвенной болезнью ДПК неосложненного течения: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — СПб., 2003. — 19 с.
7. Фролькис А.В. Функциональные заболевания желудочно-кишечного тракта. — Л.: Медицина, 1991. — 221 с.
8. Cameron A.J., Carpenter H.A. // Am. J. Gastroenterol. — 1997. — Vol. 92. — P. 586–591.
9. Kauer W.K., Peters J.H., DeMeester T.R. // Ann. Surg. — 1995. — Vol. 222. — P. 525–533.
10. Oberg S., Ritter M.P., Crookes P.F. et al. // J. Gastrointest. Surg. — 1998. — Vol. 2. — P. 547–554.
11. Penagini R. Bile reflux and oesophagitis // Eur. J. Gastroenterol. Hepatol. — 2001. — Vol. 13, N 1. — P. 1–3.
12. Provenzale D., Kemp J.A., Arora S. et al. // Am. J. Gastroenterol. — 1994. — Vol. 89. — P. 670–680.
13. Sipponen P., Kekki M., Haapakoski J. et al. // Int. J. Cancer. — 1996. — Vol. 35. — P. 173–177.
14. Talley N.J., Sttanghai V., Heading R.C. et al. // Gut. — 1999. — Vol. 45. — P. 1137–1142.