**Пасечник Игорь Николаевич. Окислительный стресс как компонент формирования критических состояний у хирургических больных : диссертация ... доктора медицинских наук : 14.00.37 / Пасечник Игорь Николаевич; [Место защиты: Ростовский государственный медицинский университет].- Ростов-на-Дону, 2004.- 206 с.: ил.**

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ УЧЕБНО-НАУЧНЫЙ ЦЕНТР МЕДИЦИНСКОГО ЦЕНТРА УПРАВЛЕНИЯ ДЕЛАМИ ПРЕЗИДЕНТА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

РОСТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

На правах рукописи

05.2.004 0 30 2 7 -

ПАСЕЧНИК Игорь Николаевич

ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС КАК КОМПОНЕНТ ФОРМИРОВАНИЯ КРИТИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЙ У ХИРУРГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ

14.00.37 - анестезиология и реаниматология

Диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук

Научный консультант доктор медицинских наук профессор В.М. Женило

Ростов-на-Дону 2004

Стр.

Список сокращений. 4-5

Введение. 6-12

Глава 1. Обзор литературы. Современные представления о роли активированных форм кислорода в норме и в генезе формирования критических состояний. 13-59

1. Критические состояния у хирургических больных. Патогенез развития полиорганной недостаточности. 13-27
2. Основные представления о путях генерации активированных форм кислорода, их нейтрализации и механизме

повреждающего действия. 27-45

1. Роль активированных форм кислорода в развитии патологических процессов у хирургических больных и формировании

критических состояний. Методы профилактики и коррекции. 45-59

Глава 2. Материалы и методы исследования. 60-79

1. Общая характеристика клинических наблюдений. 60-66
2. Методы исследования. 66-79 Глава 3. Показатели окислительного стресса у больных в

критических состояниях. 80-98

Глава 4. Роль окислительного стресса в патогенезе острого

респираторного дистресс-синдрома у хирургических больных

в критических состояниях. 99-118

Глава 5. Роль окислительного стресса в формировании

эндогенной интоксикации у больных разлитым гнойным

перитонитом и деструктивным панкреатитом. 119-128

Г лава 6. Влияние окислительного стресса на систему гемостаза. 129-140

Глава 7. Антиоксидантная терапия у больных в критических

состояниях. 141-155

Заключение. 156-173

Выводы. 174-175

Практические рекомендации. 176-176

Литература. 177-206

AJIT - аланинаминотрансфераза

AT-III - антитромбин III

ACT - аспартатаминотрансфераза

АО - антиоксиданты

АОА - антиоксидантная активность

АОС - антиоксидантная система

АТФ - аденозинтрифосфат

АФК - активированные формы кислорода

АЦ - ацетилцистеин

АЧТВ - активированное частичное тромбопластиновое время БАС - бронхоальвеолярный смыв ГБО - гипербарическая оксигенация ГК - глюкокортикоидные гормоны ГП - глутатионпероксидаза

ДВС - диссеминированное внутрисосудистое свертывание ИВЛ - искусственная вентиляция легких ИЛ - интерлейкин

КОД - коллоидно-онкотическое давление

КС - критические состояния

КТ - каталаза

ЛПС - липополисахарид

МДА - малоновый диальдегид

НЛА - нейролептаналгезия

ОИТ - отделение интенсивной терапии

ОМБ - окислительная модификация белков

ОНМК - острое нарушение мозгового кровообращения

ОРДС - острый респираторный дистресс-синдром

ОС - окислительный стресс ПОЛ - иерекисное окисление липидов ПОН - полиорганная недостаточность ПР - пероксидаза

РКФМ - растворимые комплексы фибрин-мономера СМ - средние молекулы СОД - супероксиддисмутаза

ССВР - синдром системной воспалительной реакции ФАК - фибринолитическая активность крови ФНО-а - фактор некроза опухоли-альфа ЦНС - центральная нервная система ЭИ - эндогенная интоксикация ЭТ - эндотоксин

GSH - восстановленный глутатион 02' - супероксидный анион-радикал N0 - оксид азота Н20г - пероксид водорода ОН - гидроксильный радикал RO2 - пероксильньш радикал 0N00" - пероксинитрит НСЮ - гипохлорная кислота SH - сульфгидрильные группы

Актуальность темы. Критические состояния (КС) у хирургических больных всегда сопровождаются развитием полиорганной недостаточности (ПОН), от успешного лечения которой зависит прогноз основного заболевания. Патогенез возникновения и течения ПОН крайне сложен и до конца не ясен. Общепризнанными этиологическими факторами полиорганной дисфункции являются: нарушения микроциркуляции, гипоксия, интоксикационные

расстройства и иммунный конфликт. В последнее время появились работы, свидетельствующие о важной роли окислительного стресса (ОС) в генезе возникновения целого ряда синдромов и заболеваний (Саприн А.Н., Калинина Е.В., 1999; Knight J.A., 1998; McCord J.M., 2000; Droge W. 2002; Motoyama T. et al., 2003). Для ОС характерна неконтролируемая генерация активированных форм кислорода (АФК), которые способны повреждать целостность клеточных структур (Betteridge D.J., 2000; Gutteridge J.M., Halliwell В., 2000; Roth Е. et al., 2004). При КС создаются предпосылки для возникновения ОС. В частности, происходит активация нейтрофильных лейкоцитов, макрофагов и других клеток, способных продуцировать АФК. Кроме того, важна постгипоксическая генерация АФК, возникающая при реперфузии ишемизированных тканей. АФК образуются и в нормальных условиях, они участвуют в различных физиологических процессах, например, в реакциях синтеза простагландинов и лейкотриенов, причем на это расходуется 1-2% от общего количества кислорода, потребляемого организмом. Однако в условиях ОС на образование АФК может расходоваться до 20-30% кислорода, поступающего в клетки, что само по себе усугубляет кислородное голодание тканей (Cumutte J.T. et al., 1974). Таким образом, ОС следует рассматривать как важный фактор развития ПОН.

Основу повреждающего действия АФК составляет их способность нарушать нормальное функционирование жизненно важных структур клетки.

Уровень такого воздействия и его функциональные последствия зависят от природы АФК и места приложения. Генерация АФК может происходить как внутри клетки, так и за ее пределами. В зависимости от места образования АФК повреждают внутриклеточные структуры (митохондрии, ДНК и т.д.) или мембраны клетки. При внутрисосудистом образовании АФК в первую очередь страдают все клетки крови, плазменные белки и эндотелий. Повреждение клеток из-за различной выраженности ОС может быть обратимым с нарушением функции клетки или необратимым, что ведет к гибели клетки. В зависимости от места расположения неполноценных клеток формируется тот или иной синдром КС: острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС), синдромы нарушения транспорта кислорода, расстройства системы гемостаза, почечной недостаточности, печеночной недостаточности, что в конечном итоге и приводит к ПОН.

Традиционно считалось, что основной мишенью для АФК являются липиды клеток, точнее, входящие в состав липидов полиненасыщенные жирные кислоты. В последнее время появились работы, свидетельствующие о том, что окислительной модификации подвергаются не только липиды, но и белки (Zwart L.L. et al., 1999). Внимание к изучению взаимодействия АФК и белков вполне понятно, поскольку хорошо известна исключительная роль белков в организме человека. В связи с этим достаточно напомнить, что все ферменты, обеспечивающие бесконечное многообразие метаболических и регуляторных процессов, являются белками. Кроме того, белки входят в структуру клеточных мембран, в значительной степени определяя их целостность (Dean R.T. et al., 1997; Zwart L.L., 1999).

Модификация аминокислотных остатков приводит к последующим глубоким изменениям белковой структуры, что проявляется агрегацией и фрагментацией белков, подвергшихся действию АФК. Такие «неполноценные» белковые молекулы легче подвергаются протеолизу с образованием различных пептидов, что может быть одним из компонентов эндогенной интоксикации (ЭИ).

Оценить степень продукции АФК прямыми методами в клинических условиях весьма сложно. Это связано с малой продолжительностью жизни основных АФК в связи с их высокой реакционной способностью. Поэтому о выраженности ОС традиционно судят по результатам взаимодействия АФК и липидов - продуктам перекисного окисления липидов (ПОЛ). Однако ряд авторов указывают, что при развитии ОС в первую очередь повреждаются белки в результате модификации аминокислотных остатков (Dean R.T. et al., 1997; Jackson M. J., 1999).

Следует подчеркнуть, что оценить уровень окислительной модификации белков (ОМБ) достаточно трудно, учитывая ограниченность методической базы и сложную структуру белка. В клинических условиях определение ОМБ, как правило, осуществляется в плазме крови в силу ее большей доступности для анализа. Вероятно, при измерении уровня ОМБ в крови мы определяем суммарный пул, состоящий из модифицированных белков крови и ОМБ клеток, попавших в циркуляцию при поражении различных органов. Оценка ОМБ различных систем и тканей затруднена и представляет собой трудноразрешимую задачу.

Одним из методов изучения воздействия АФК на белки является моделирование ОС *in vitro.* Такой подход был использован ранее для изучения влияния ОС на ключевые ферменты (Janero D.R., Yarwood С., 1995; Sok D.E., 1999). Известно, что основные факторы свертывающей системы крови имеют белковую природу. Важно также заметить, что для образования и лизиса тромба все необходимые компоненты присутствуют в кровеносном русле. Поэтому на образцах крови, полученных от здоровых доноров, возможно изучение влияния ОС на систему гемостаза в модельных системах *in vitro.* Кроме того, в экспериментальных системах на белках плазмы крови возможно изучение роли ОС в генезе формирования ЭИ.

Фармакологическая профилактика и коррекция ОС у больных в КС в полной мере не разработаны. Это в известной степени связано с крайне ограниченным набором препаратов с антиоксидантным действием. Принципы лечения не всегда обоснованы. В рекомендациях по фармакотерапии зачастую игнорируется прооксидантное действие препаратов и особенности их химического взаимодействия между собой (Halliwell В., 1996; McCall M.R., Frei

В., 1999). Серьезных систематических исследований в этой области не проводилось.

Эти обстоятельства послужили основанием для проведения настоящей работы.

Цель нашей работы: комплексное изучение параметров окислительного стресса у больных в критических состояниях параллельно с показателями, характеризующими функциональное состояние жизненно важных органов и систем, выяснение роли окислительного стресса в генезе формирования полиорганной недостаточности, эндогенной интоксикации и нарушений гемостаза, разработка методов оценки окислительного стресса, его профилактики и лечения.

Задачи исследования:

1. Оценить показатели ОС у больных в КС параллельно с

параметрами, характеризующими функциональное состояние жизненно важных органов и систем.

1. Разработать оптимальные тесты для характеристики степени выраженности ОС.
2. Выяснить роль ОС в генезе возникновения ПОН.
3. Изучить значение окислительной модификации белков в

развитии ЭИ у хирургических больных в КС.

1. Исследовать роль ОС в повреждении белков, участвующих в

гемостатическом процессе.

1. Изучить возможности профилактики и лечения нарушений, вызванных ОС.

Научная новизна. В представленной работе впервые в клинических условиях у хирургических больных в КС исследованы показатели ОС параллельно с параметрами, характеризующими функциональное состояние жизненно важных органов и систем. Установлено, что формирование КС происходит на фоне развития ОС. У хирургических больных в КС окислительная модификация белков и ПОЛ - неотъемлемые компоненты нарушений метаболизма. Окислительные повреждения белков и липидов являются важными факторами патогенеза ПОН у больных в КС. Выявлено, что в первую очередь регистрируется окислительное повреждение белков, а затем интенсифицируются процессы ПОЛ. Выраженное снижение содержания сульфгидрильных групп (SH-групп) в белках в 1-е сутки заболевания является неблагоприятным фактором в отношении прогноза основного заболевания. Тяжесть протекания ПОН коррелирует со степенью окислительного повреждения белковых структур организма больного.

Формирование ОРДС у больных с разлитым гнойным перитонитом и деструктивным панкреатитом происходит в условиях ОС. Окислительное повреждение белков является специфическим фактором возникновения ОРДС. Избыточная генерация АФК при КС приводит к накоплению модифицированных белков в тканях легких.

ОС приводит к окислительному повреждению белков организма больного. Модифицированные белки в условиях повышенной протеолитической активности, присущей КС, являются важным источником компонентов, входящих в состав средних молекул (СМ), и одним из субстратов формирования ЭИ у больных разлитым гнойным перитонитом и деструктивным панкреатитом.

ОС существенно влияет на формирование нарушений системы гемостаза у больных в КС. В модельных исследованиях, подтвержденных клиническими данными, установлено, что под воздействием АФК происходит повреждение тромбоцитарного звена гемостаза. Кроме того, под влиянием ОС происходят разнонаправленные изменения в системе гемостаза. С одной стороны, выявлены гипокоагуляционные изменения и нарушение формирования фибринового тромба, с другой стороны - угнетение противосвертывающих механизмов гемостаза.

У хирургических больных в КС эндогенная антиоксидантная система (АОС) организма не в состоянии предотвратить повреждающее действие ОС на биоструктуры. Назначение антиоксидантов (АО) (мексидол в комбинации с церулоплазмином) приводит к уменьшению выраженности ОС, улучшению общего состояния больных и снижению ЭИ.

Практическая значимость работы. Установлено, что ОС является неотъемлемым фактором развития ПОН у хирургических больных в КС. В связи с этим необходимо мониторирование показателей ОС в процессе лечения данной категории больных. Разработаны и предложены наиболее оптимальные тесты для контроля за выраженностью ОС. Определение ОМБ позволяет на ранних стадиях заболевания диагностировать окислительное повреждение биоструктур. Измерения содержания в белках SH-групп и карбонилов являются наиболее доступными и приемлемыми методами оценки ОМБ.

Установлено, что у больных ОРДС в тканях легких и образцах бронхоальвеолярных смывов (БАС) происходит накопление окисленных белков. Содержание модифицированных белков в образцах БАС превышает таковое в плазме. Повышение концентрации карбонилов в белках в образцах БАС является важным показателем развития ОРДС у больных в КС.

Увеличение БіОг до 40% у больных ОРДС является фактором риска токсического действия кислорода на белковые структуры.

При развитии ОС происходят нарушения в системе гемостаза и прогрессирование внутрисосудистого свертывания крови, требующие коррекции.

Введение мексидола и церулоплазмина позволяет оптимизировать повреждение биоструктур, вызванное ОС.

Внедрение результатов работы. Результаты настоящего исследования внедрены в повседневную практику кафедры анестезиологии и реаниматологии ФГУ УНЦ МЦ УД Президента РФ, а также отделения анестезиологии и реаниматологии клинической больницы № 51 г. Москвы. Материалы диссертации используются при чтении лекций по проблемам критических состояний слушателям курсов усовершенствования врачей МЦ УД Президента РФ и для проведения занятий с ординаторами и аспирантами кафедры анестезиологии и реаниматологии ФГУ УНЦ МЦ УД Президента РФ. Основные положения, выносимые на защиту:

а) формирование КС у хирургических больных происходит в условиях ОС;

б) ОС является неотъемлемым компонентом формирования ПОН у больных в КС;

в) модифицированные белки служат важным источником ЭИ у больных разлитым гнойным перитонитом и деструктивным панкреатитом;

г) нарушения в системе гемостаза связаны с окислительным повреждением компонентов свертывающей и противосвертывающей систем организма больного;

д) больные в КС хирургического профиля нуждаются в максимально ранних сроках начала антиоксидантной терапии.

выводы

1. Формирование критических состояний у хирургических больных сопровождается развитием окислительного стресса, приводящего к окислительной модификации липидов и белков.
2. Окислительный стресс вносит существенный вклад в нарушение метаболизма у хирургических больных.
3. Окислительный стресс является важным фактором патогенеза и течения полиорганной недостаточности у хирургических больных в критических состояниях.
4. При формировании критических состояний в первую очередь регистрируется окислительная модификация белков, а потом уже липидов. Мониторинг выраженности окислительного стресса целесообразно вести на основании содержания SH-групп и карбонилов в белках.
5. Выраженное снижение содержания SH-групп в белках плазмы на первые сутки развития критических состояний является неблагоприятным прогностическим фактором исхода заболевания.
6. Развитие острого респираторного дистресс-синдрома происходит на фоне окислительного стресса. Окислительное повреждение белков является специфическим фактором возникновения острого респираторного дистресс-синдрома, приводящим к накоплению модифицированных белков в тканях легких.
7. У больных разлитым перитонитом и деструктивным панкреатитом модифицированные белки являются важным компонентом формирования эндогенной интоксикации.
8. Окислительный стресс приводит к нарушениям тромбоцитарного и коагуляционного звеньев гемостаза. Эти изменения сочетаются с угнетением противосвертывающей системы крови.
9. У больных в критических состояниях эндогенная антиоксидантная система не в состоянии предотвратить повреждающее действие окислительного стресса, в связи с этим показано максимально раннее начало антиоксидантной терапии.
10. Введение антиоксидантов (мексидола и церулоплазмина) позволяет оптимизировать последствия воздействия окислительного стресса на биоструктуры и снизить уровень эндогенной интоксикации.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. У больных разлитым гнойным перитонитом и деструктивным панкреатитом окислительный стресс является важным фактором нарушений метаболизма. Это необходимо учитывать при лечении хирургических больных в критических состояниях.
2. Окислительное повреждение белков и липидов патогенетичиски значимо для развития полиорганной недостаточности, нарушений в системе гемостаза и возникновения эндогенной интоксикации.
3. Мониторинг выраженности окислительного стресса - необходимый компонент лабораторного контроля за состоянием хирургических больных в КС. Наиболее информативной является оценка содержания SH-групп и уровня карбонилов в белках.
4. Для уменьшения выраженности окислительного стресса и снижения эндогенной интоксикации у хирургических больных в критических состояниях необходимо внутривенно назначать мексидол в комбинации с церулоплазмином. Терапию антиоксидантами целесообразно начинать до операции и продолжать в послеоперационном периоде в течение 7-10 дней.

ЛИТЕРАТУРА

1. Азизов Ю.М., Семавин И.Е., Казаков И.В. и др. Возможные пути формирования пула кислоторастворимой фракции плазмы крови у больных разлитым гнойным перитонитом. // Тер. архив. — 1990. - № 2. — С. 99-104.
2. Андреев А.А. Патогенетические факторы нарушения перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы и антиоксидантная терапия у пострадавших с сочетанной травмой. Дис. ... канд. мед. наук. — М., 1999.-147 с.
3. Багдатьев В.Е., Гологорский В.А., Гельфанд Б.Р. Респираторный дистресс-синдром взрослых. // Вест. инт. тер. - 1996. - № 4. - С. 9-14.
4. Баркаган З.С., Момот А.П. Основы диагностики нарушений гемостаза. - М.: Ньюдиамед-АО, 1999.-217 с.
5. Биленко М.В. Ишемические и реперфузионные повреждения органов. - М, Медицина. - 1989. - 368 с.
6. Валеева В.А. Влияние комбинированной общей анестезии на пероксидацию липидов у больных с абдоминальной хирургической патологией. Дис. ... канд. мед. наук. - Новосибирск, 1997. - 193 с.
7. Ванин А.Ф. Оксид азота в биомедицинских исследованиях. // Вестник РАМН. - 2000. - № 4. - С. 3-5.
8. Викторов И.В. Роль оксида азота и других свободных радикалов в ишемической патологии мозга. // Вестник РАМН. — 2000. - № 4. - С. 5 - 10.
9. Винницкий Л.И., Витвицкая И.М., Попов О.Ю. Иммунная терапия сепсиса - миф или реальность. // Анест. и реаниматол. - 1997. - № 3. - С. 89-97.
10. Власенко А.В., Неверин В.К. Современная стратегия респираторной поддержки у больных с острым повреждением легких. // Нов. науки и техники. Сер. Медицина. Вып. Реаниматология и интенсивная терапия. Анестезиология. / ВИНИТИ РАН НИИ ОР РАМН. - 2001. - № 4. - С. 1- 14.

П.Гаврилов В.Б.. Гаврилова А.Р., Мажуль J1.M. Анализ методов определения продуктов перекисного окисления липидов в сыворотке крови по тесту с тиобарбитуровой кислотой. // Вопр. мед. хим. - 1987. - № 1.-С. 118-122.

1. Галактионов С.Г., Цейтлин В.М., Леонова В.Н. Пептиды группы «средних молекул». // Биоорг. химия. - 1984. - № 1. - С. 5-17.
2. Гельфанд Б.Р., Бурневич С.З., Гиткович В.Е., Гайнулин Ш.М. Абдоминальный сепсис: современный взгляд на нестареющую проблему. // Вестн. интенсив, тер. - 1996. - № 4. - С. 29-35.

14-Гельфанд Е.Б., Гологорский В.А., Гельфанд Б.Р. Абдоминальный сепсис: интегральная оценка тяжести состояния больных и полиорганной дисфункции. // Анест. и реаниматол. - 2000. - № 3. — С. 29 - 33.

1. Герчиков А.Я., Гарифуллина Г.Г., Ахметшина Л.Н., Галеев Ф.С. Влияние некоторых средств, используемых в анестезиологии, на перекисное окисление липидов плазмы крови. // Хим.-фарм. жур. - 2000. - № 12. - С. 3-4.
2. Гончаренко В.Н. Метаболическая коррекция про- и антиоксидантных систем при гнойном перитоните. Дис. ... канд. мед. наук. - М., 1997. - 138 с.
3. Грашин Р.А. Состояние свободнорадикального окисления при тяжелой травме и его коррекция. Дис. ... канд. мед. наук. - СПб., 1997. - 132 с.
4. Долина О.А., Галеев Ф.С., Фархутдинов P.P. Влияние общей анестезии и ее компонентов на свободнорадикальные процессы. // Анест. и реаниматол. - 1987. - № 5. - С. 71-75.
5. Дубинина Е.Б., Шугалей И.В. Окислительная модификация белков. // Успехи совр. биол. - 1993. - Том. 113. - вып. 1. - С. 71-81.
6. Дубинина Е.Е., Бурмистров С.О., Ходов Д.А., Поротов И.Г. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод ее определения. // Вопр. мед. хим. - 1995. - № 1. — С. 24-26.