

УДК: 616.381-002-089

Кашафеева А.А., Гаймоленко С.Г.

ДИНАМИКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПЕРЕКИСНОГО СТРЕССА И МОРФОЛОГИИ БРЮШИНЫ ПРИ ПЕРИТОНИТЕ У КРЫС

*Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Читинская государственная медицинская академия»
Министерства здравоохранения Российской Федерации*

Цель исследования. Изучить в эксперименте локальный перекисный статус и морфологию брюшины при воспалении.

Материалы и методы. У крыс изучены биохимические и морфометрические параметры брюшины после моделирования перитонита.

Результаты. Отмечено снижение показателей перекисного окисления липидов (ПОЛ) и ферментативного звена антиокислительной защиты (АОЗ) в динамике и относительно контроля, на фоне устойчивой тенденции к повышению общей антиокислительной активности. При морфологическом изучении кишечника обнаружена лейкоцитарно-лимфоцитарная инфильтрация тканей, участки некроза и кровоизлияния, слущивание клеток мезотелия с наложением нитей фибрина. Морфометрия показала утолщение брюшины за счет отека и фибриновых наложений.

Заключение. При перитоните у крыс выявлены минимальные изменения в системе «перекисное окисление липидов-антиоксиданты» брюшины. При этом морфологическая картина характерна для разлитого гнойного воспаления брюшины.

Ключевые слова: перитонит, брюшина, эксперимент, перекисный стресс.

Kashafeeva A.A., Gajmolenko S.G.

DYNAMICS OF INDICATORS OF PEROXIDATIVE STRESS AND MORPHOLOGY OF THE PERITONEUM IN RATS WITH PERITONITIS

Chita State Medical Academy, Chita, Russia

Objective. The aim is to study experimentally the local lipid peroxidation status and the morphology of the peritoneum in inflammation.

Material and methods. Biochemical and morphometric parameters of the peritoneum were studied in rats with simulated peritonitis.

Results. There was a decrease in indicators of lipid peroxidation (LPO) and the fermentative link of the antioxidant protection (AOP) in dynamics and in comparison with the control group, associated with a steady increase in total antioxidant activity. A morphological study of the intestine revealed leukocyte-lymphocytic infiltration of tissues, areas of necrosis and hemorrhage, desquamation of the cells of the mesothelium with fibrin formation. Morphometry showed thickening of the peritoneum due to edema and fibrinous overlays.

Conclusion. Insignificant changes in the system "lipid peroxidation-antioxidants" of the peritoneum were revealed in rats with peritonitis, with the morphological picture being characteristic for diffuse purulent inflammation of the peritoneum.

Key words: peritonitis, the peritoneum, the experiment, peroxide stress.

Вторичный перитонит, несмотря на массу исследований и схем лечения, остается проблемой хирургии [1, 2, 3]. В патогенезе заболевания немалую роль играет перекисный стресс. В литературе имеются данные об изучении показателей системы «перекисное окисление липидов-антиоксиданты» крови при различных заболеваниях, в том числе и перитоните, и практически отсутствуют сведения об исследовании их в воспаленной брюшине [4, 5, 6].

Цель работы: изучить показатели системы «ПОЛ-антиоксиданты» и морфологию воспаленной брюшины в эксперименте.

Материалы и методы. Эксперименты выполняли в соответствии с «Международными рекомендациями по проведению биомедицинских исследований с использованием животных», принятыми Международным Советом Медицинских Научных Обществ (CIOMS) в 1985 г. Лабораторных животных содержали в условиях вивария Читинской государственной медицинской академии при свободном доступе к воде и пище. После последнего отбора ма-

териала для исследования крыс безболезненно усыпляли эфиром. Исследование одобрено Локальным этическим комитетом при ГОУ ВПО ЧГМА, протокол № 2, от 6.11.2009 г.

Исследование проводили на 65 беспородных половозрелых крысах обоего пола с массой 190-250 г; контрольная группа – 30 животных, группа перитонита – 35. В группе контроля под эфирным наркозом выполняли срединную лапаротомию, осматривали органы брюшной полости при помощи хирургических инструментов при включенной операционной лампе. Через 5 мин. у части животных забирали участок брюшины 1,5 см² в бессосудистой зоне брыжейки для биохимического исследования, фрагмент кишечника для морфологического изучения (исходный материал), рану ушивали наглухо. На 1, 3 и 7-й дни эксперимента проводили релапаротомию, у некоторых крыс забирали часть брюшины и кишечника для исследования. Детальное описание результатов исследования в контрольной группе предоставлены ранее [7].

Для моделирования перитонита использовали методику М.А. Магомедова [8, 9]. Отбор материала для исследования осуществляли идентично контрольной группе, дополнительно брали смыв с брюшины для посева на микрофлору. Супернатант, полученный при обработке образцов брюшины, использовали для изучения параметров системы «ПОЛ-антиоксиданты»: содержания субстратов и диеновых конъюгатов (ДК), кетодиенов и сопряженных триенов (КД и СТ), веществ, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) – ТБК-активных продуктов, оснований Шиффа (ОШ), а так же скорости супероксиддисмутазной (СОД), каталазной (Кат), глутатионпероксидазной (ГПО), глутатионредуктазной реакции (ГР) и общей антиокислительной активности (АОА) [7, 8, 9].

Микропрепараты изучали на морфометрическом комплексе «Olympus cover-015» с программным обеспечением «МЕКОС», делали 5 фотографий полей зрения каждого препарата и измеряли толщину брюшины (3 измерения в 1-м поле).

Статистическую обработку проводили с помощью непараметрических методов в виде Me (25-й; 75-й перцентиль), парного U-критерия Манна-Уитни и множественного H-критерия Крускала-Уоллиса с использованием программы «Biostat» S. Glantz (1999) [10]. Критический уровень значимости при проверке гипотез $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. В первые трое суток у крыс в группе перитонита изменялось поведение: снижалась двигательная активность, угнетался пищевой инстинкт на фоне повышенной потребности в воде. Летальность к 7 дню составила 42,9%, в группе контроля – 3,3%.

При перитоните в брюшине отмечалось снижение показателей ПОЛ, достигающие достоверных отличий к 7-м суткам, как в динамике, так и по сравнению с контролем, на фоне угнетения ферментативного звена антиокислительной защиты по отношению к контролю (табл. 1).

По критерию Крускала-Уоллиса в группе перитонита отмечалось статистически значимые отличия уровня субстратов ($p=0,019$) и начальных интермедиатов ПОЛ ($p=0,003$; $p=0,016$), ОШ ($p=0,001$), активности всех изучаемых ферментов ($p=0,001$) и АОА ($p=0,001$) (табл. 1).

У крыс с перитонитом в брюшной полости макроскопически на 1 и 3 сутки выявлены: гиперемия париетальной брюшины, небольшое количество мутного выпота с неприятным запахом, наложение фибрина на петлях тонкого кишечника, брыжейке, паренхиматозных органах, признаки пареза кишечника с увеличением диаметра кишки в 1,5 и более раз (в просвете жидкость, газ).

Таблица 1

Динамика показателей липопероксидации и антиоксидантной защиты брюшины животных Me (25-й; 75-й перцентиль, числитель-контроль; знаменатель-перитонит)

Показатель	1 сутки	3 сутки	7 сутки
	(n=11)	(n=14)	(n=7)
	(n=33)	(n=13)	(n=13)
$\Delta E_{220}/\text{мг липидов}$	0,95 (0,65; 1,15)	1,04 (0,69; 1,49)	0,70 (0,61; 0,72)

	0,76 (0,68; 1,08)	0,80 (0,75; 0,90)	0,60 (0,53; 0,76) p=0,03 p ₁ =0,014
ДК ΔE ₂₃₂ /мг липидов	0,87 (0,63; 1,18)	0,77 (0,64; 1,31)	0,68 (0,57; 0,72)
	0,75 (0,63; 0,88)	0,73 (0,64; 0,84)	0,50 (0,44; 0,66) p=0,003 p ₁ =0,016
КД и СТ ΔE ₂₇₈ /мг липидов	0,59 (0,39; 0,75)	0,59 (0,52; 0,90)	0,44 (0,36; 0,48)
	0,55 (0,42; 0,62)	0,53 (0,48; 0,57)	0,36 (0,30; 0,47) p=0,007 p ₁ =0,007
ΔE _{232/220}	1,03 (0,94; 1,07)	0,85 (0,75; 0,93)	0,97 (0,94; 0,97)
	0,99 (0,88; 1,05)	0,91 (0,74; 1,02)	0,88 (0,76; 0,94)* p=0,045
О. Шиффа (УЕ/мг липидов)	1,97 (1,43; 2,22)	1,56 (1,18; 1,84)	1,78 (1,26; 1,97)
	1,72 (1,51; 1,98)	1,52 (1,09; 1,72)	1,24 (1,09; 1,52)* p=0,016
СОД (% активности)	28,5 (21,5; 31,4)	31,8 (26,2; 33,6)	29,4 (27,8; 46,7)
	25,2 (21,3; 27,1)	25,3 (23,1; 28,7)*	24,6 (20,4; 30,6)*
Каталаза (нмоль/с мг белка)	2,73 (2,27; 3,38)	4,58 (1,90; 13,16)	6,02 (4,77; 17,8)
	3,35 (1,90; 3,74)	5,7 (1,43; 12,76)	4,35 (2,97; 16,1)*
ГПО (мкмоль/с мг белка)	17,2 (13,5; 33,1)	46,3 (22,3; 59,4)	42,3 (28,4; 63,5)
	41,6 (32,1; 53,6)*	42,3 (34,9; 51,5)	24,4 (17,9; 41,3)*
ГР (мкмоль/с мг белка)	22,0 (14,8; 29,1)	37,6 (27,5; 45,6)	38,0 (21,2; 61,4)
	21,0 (11,9; 30,3)	34,0 (23,2; 36,3)* p=0,032	28,9 (22,7; 43,6)* p=0,039
АОА (%)	9,15 (7,43; 10,1)	8,42 (8,16; 12,3)	9,49 (8,38; 12,2)
	9,37 (7,41; 10,8)	9,45 (7,61; 10,1)	11,30 (9,12; 13,1)

Примечание: * - статистически значимые различия по сравнению с контролем в соответствующие сутки; p – статистически значимые различия по отношению к 1 суткам соответствующей группы; p₁ – статистически значимые различия по отношению к 3 суткам соответствующей группы (U - критерий Манна-Уитни)

Во всех смывах с брюшины выделена кокковая флора и энтеробактерии.

При патоморфологическом исследовании в 1 сутки слизистая тонкой кишки с выраженными циркуляторными расстройствами в виде отека, полнокровия сосудов, единичными экстравазатами и диффузной лейкоцитарной инфильтрацией. Выявлены микроэрозии на вершине отдельных ворсинок, частично прикрытые фибрином. Мышечный слой инфильтрирован лимфоцитами и нейтрофилами, с мелкоочаговыми свежими кровоизлияниями. Серозная оболочка с диффузной лейкоцитарно-лимфоцитарной инфильтрацией, наложениями фибрина (рис. 1). Фрагменты брыжейки, попавшие в срезы, с резко полнокровными сосудами и фибринозно-лейкоцитарными наложениями на мезотелии. В стенке кишки отмечен единичный случай сегментарной гангрены с перифокальным флегмонозным воспалением.

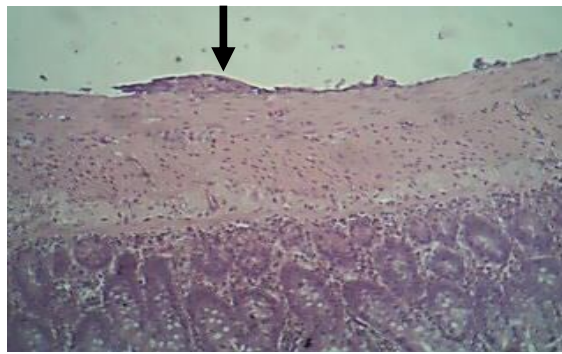


Рис. 1. Срез тонкого кишечника крысы при перитоните на 1 сутки (препарат 12-10).
Окраска: гематоксилин и эозин. Увеличение $\times 100$. Стрелкой указан фибрин

На третьи сутки слизистая оболочка тонкой кишки резко отечна, с очаговыми кровоизлияниями как свежими, так и давностью до 3-х суток, множественными микроэрозиями, прикрытыми фибрином; с массивными участками некроза, густой воспалительной инфильтрацией, которая распространяется до мышечного слоя. Серозная оболочка с выраженной диффузной лейкоцитарно-лимфоцитарной инфильтрацией (рис. 2), полнокровием сосудов, местами с образованием стазов, сладжей и тромбов.

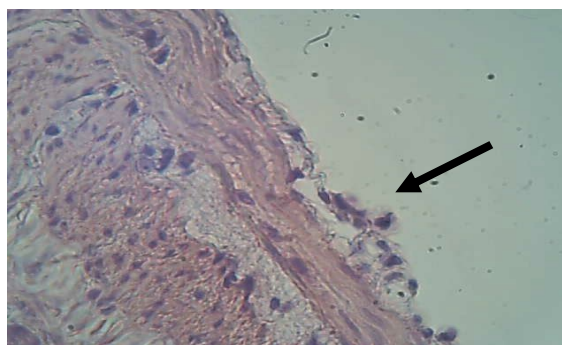


Рис. 2. Срез тонкого кишечника крысы при перитоните на 3 сутки (препарат 12-1). Мезентериолит.
Окраска: гематоксилин и эозин. Увеличение $\times 400$. Стрелкой указано слущивание мезотелия.

На 7 день течения перитонита слизистая тонкой кишки отечна, с очаговой десквамацией покровного эпителия, набуханием эпителиоцитов, вакуолизацией цитоплазмы и диффузной лейкоцитарно-лимфоцитарной инфильтрацией, серозная оболочка с наложениями фибринозно-лейкоцитарных масс (рис. 3).

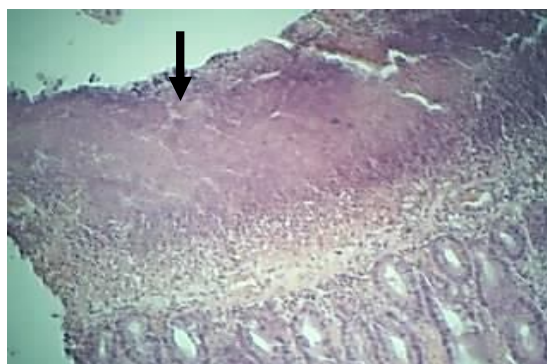


Рис. 3. Срез тонкого кишечника крысы при перитоните на 7 сутки (препарат 12-5). Окраска: гематоксилин и эозин. Увеличение $\times 100$. Стрелкой указано наложение фибрина с его организацией.

Одно из осложнений перитонита – спаечная болезнь [1, 2], в основе развития которой лежит нарушение элиминации фибриновых отложений. В связи с этим у исследуемых животных проведено морфометрическое исследование участков брюшины с наложениями фибрина.

В ходе исследования отмечено нарастание числа полей зрения брюшины с фибрином с 25% в 1 сутки до 50% на 7-е. При этом толщина брюшины увеличивалась в 2,5–1,9 раза по отношению к 1 дню исследования (табл. 2).

Таблица 2

Морфометрические изменения брюшины при перитоните
Ме (25-й; 75-й перцентиль)

Перитонит	Толщина брюшины без фибрина (мкм)	Толщина брюшины с фибрином (мкм)
1 сутки	7,10 (3,60; 16,70) n=45	52,20 (40,90; 54,00) n=15
3 сутки	17,90 (7,90; 22,40) n=51 p=0,0001	129,30 (87,80; 307,80) n=24 p=0,0001
7 сутки	3,90 (3,35; 5,45) n=15 p ₁ =0,001	98,00 (82,90; 112,40) n=15 p=0,002
p ₂	p ₂ =0,0001	p ₂ =0,0001

Примечание: p – уровень значимости различий по сравнению с 1 сутками; p₁ – уровень значимости различий по сравнению с 3 сутками (U-критерий Манна-Уитни); p₂ – достоверные различия между сутками (H-критерий Крускала-Уоллиса)

Развитие перитонита у белых крыс не сопровождалось яркими признаками локального оксидативного стресса – все изученные показатели на протяжении всего эксперимента находились на уровне, а некоторые из них ниже контроля. При этом неблагоприятным фактором является истощение ферментативного звена антиоксидантной защиты: начиная с 3 суток происходит ингибирование основных энзимов, а к 7 – подавляются все исследуемые ферменты. В то же время общая АОА находится выше значений контроля, однако, её пул в этом случае поддерживается за счет низкомолекулярных соединений, большинство из которых являются экзогенными и достаточно быстро элиминируются в организме, что может способствовать хронизации патологического процесса и извращать нормальное течение репарации [2].

При этом интраоперационное введение каловой взвеси сопровождалось комплексом морфо-функциональных изменений, удовлетворяющих критериям разлитого калового перитонита – развитием типовых воспалительных изменений в висцеральной и париетальной мезотелиальных оболочках, наличием нейтрофильного инфильтрата в стенке кишечной трубки, формированием очагов некроза, накоплением фибринозно-гнойного, инфицированного экссудата, формированием множественных висцеро-висцеральных и висцеро-париетальных спаек, основой которых служат массивные отложения фибрина.

Выводы.

1. При экспериментальном перитоните у белых крыс бактериологические посеы и данные морфологии свидетельствуют о наличии гнойного перитонита.
2. В системе «ПОЛ-антиоксиданты» отмечаются умеренные однонаправленные изменения с преобладанием ингибирования основных ферментов.

Литература:

1. Магомедов М.А. Местная клеточная регуляция в образовании послеоперационных спаек при перитоните. Хирургия. 2004. 6. 9-11.

2. Суковатых Б.С., Жуковский В.А., Липатов В.А., Блинков Ю.Ю. Современные технологии профилактики послеоперационного спайкообразования. Вестник хирургии. 2014. 173 (5). 98-104.
3. Gołembiewska E., Safranow K., Kabat-Koperska J., Ciechanowski K., Romanowski M. Solute transport at the start of peritoneal dialysis and the risk of peritonitis. *Adv. Clin. Exp. Med.* 2013. 22 (1). 77-83.
4. Тиханов В.И. Сопоставление результатов перекисного (свободнорадикального) окисления липидов печени на фоне введения гексаметония и 3-часового охлаждения животных с результатами индуцированного перекисного окисления липидов микросом печени в присутствии гексаметония *in vitro*. Дальневосточный медицинский журнал. 2016. 1. 82-86.
5. Luca L., Rogobete A.F., Bedreag O.H. Oxidative Stress and Antioxidant Therapy in Critically ill Polytrauma Patients with Severe Head Injury. *Journal of Critical Care Med.* 2015. 1(3). 83-91.
6. Tsao C.M., Jhang J.G., Chen S.J. Adjuvant potential of selegiline in attenuating organ dysfunction in septic rats with peritonitis // *PLoS One.* 2014. 30,9 (9):e108455. doi: 10.1371/journal.pone.0108455. eCollection 2014.
7. Кашафеева А.А., Гаймоленко С.Г., Намоконов Е.В., Дамдинов Р.И. Влияние операционной травмы на брюшину (экспериментальное исследование). [Электронный ресурс]. Забайкальский медицинский вестник. 2017. 4. 156-163. Режим доступа: <http://zabmedvestnik.ru/journal/2017/4/24.pdf>.
8. Кашафеева А.А., Гаймоленко С.Г., Хышиктуев Б.С., Гончаров А.Г. Состояние перекисного статуса брюшины при экспериментальном перитоните у крыс. Дальневосточный медицинский журнал. 2009. 3. 89-92.
9. Кашафеева А.А., Хышиктуев Б.С., Гаймоленко С.Г., Смекалов В.П., Гранин А.Г., Баранчугова Л.М., Терешков П.П. Морфометрические параметры брюшины у крыс при воспалении и после местного воздействия на неё растворов гипохлорита натрия разной концентрации [Электронный ресурс]. Забайкальский медицинский вестник. 2011. 2. 116-124. Режим доступа: <http://chitgma.ru/zmv2/journal/2011-2/20.pdf>.
10. Гланц С. Медико-биологическая статистика: перев. с англ. М.: Практика, 1999. 459.

References:

1. Magomedov M.A. Local cellular regulation in postoperative commissures formation in peritonitis. *Hirurgija.* 2004. 6. 9-11. in Russian.
2. Sukovatyh B.S., Zhukovskij V.A., Lipatov V.A., Blinkov Ju.Ju. Modern technologies for the prevention of postoperative adhesion. *Vestnik hirurgii.* 2014. 173,5. 98-104. in Russian.
3. Gołembiewska E., Safranow K., Kabat-Koperska J., Ciechanowski K., Romanowski M. Solute transport at the start of peritoneal dialysis and the risk of peritonitis. *Adv. Clin. Exp. Med.* 2013. 22 (1). 77-83.
4. Tihanov V.I. The comparison of the results of lipid peroxidation (free radical) of the liver associated with gexametoni introduction and 3-hour cooling animals with the results of induced lipid peroxidation of liver microsomes in the presence of gexametoni *in vitro*. *Dal'nevostochnyj medicinskij zhurnal.* 2016. 1. 82-86. in Russian.
5. Luca L., Rogobete A. F., Bedreag O. H. Oxidative Stress and Antioxidant Therapy in Critically ill Polytrauma Patients with Severe Head Injury. *Journal of Critical Care Med.* 2015. 1(3). 83-91.
6. Tsao C.M., Jhang J.G., Chen S.J. Adjuvant potential of selegiline in attenuating organ dysfunction in septic rats with peritonitis. *PLoS One.* 2014. 30,9 (9):e108455. doi: 10.1371/journal.pone.0108455. eCollection 2014.
7. Kashafeeva A.A., Gaimolenko S.G., Namokonov E.V., Damdinov R.I. Influence of surgical trauma on peritoneum. *Zabajkal'skij medicinskij vestnik.* 2017. 4. 156-163. Available on: <http://zabmedvestnik.ru/journal/2017/4/24.pdf>. in Russian.

8. Kashafeeva A.A., Gajmolenko S.G., Hyshiktuev B.S., Goncharov A.G. Peritoneum peroxidate ststus in experimental peritonitis in rats. Dal'nevostochnyj medicinskij zhurnal. 2009. 3. 89-92. in Russian.
9. Kashafeeva A.A., Hyshiktuev B.S., Gajmolenko S.G., Smekalov V.P., Granin A.G., Baranchugova L.M., Tereshkov P.P. Peritoneum morphometric parameters in rats in inflammation and after local influence by sodium hypochlorite solution of various concentration. Zabajkal'skij medicinskij vestnik. 2011. 2. 116-124. Available on: [http: // http://chitgma.ru/zmv2/journal/2011-2/20.pdf](http://chitgma.ru/zmv2/journal/2011-2/20.pdf). in Russian.
10. Glanc S. Biological and medical statistics: transl. from English. M.: Praktika, 1999. 459. in Russian.