

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ КОМБИНИРОВАННОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПРЕПАРАТОВ МЕКСИКОР® И ГАЛАВИТ® ПРИ РАСПРОСТРАНЕННОМ ПЕРИТОНИТЕ

Артюшкова Е.Б.¹, Блинков Ю.Ю.¹, Фролова О.Г.¹, Артюшкова Е.В.¹,
Гладченко М.П.¹, Чмыхова А.Н.²

¹ГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России, Курск, e-mail: kurskmed@mail.ru;

²Областное бюджетное учреждение «Курская городская станция по борьбе с болезнями животных», Курск, e-mail: vetstankursk@yandex.ru

Цель исследования: изучение возможности коррекции системной воспалительной реакции при экспериментальном перитоните путем применения комбинации антиоксиданта Мексикор® и иммуномодулятора Галавит® в качестве дополнения к стандартной терапии. Экспериментальные животные были разделены на 5 групп: группа 1 (интактная) – без моделирования перитонита; группа 2 – (контроль) модель распространенного перитонита; группа 3 – модель распространенного перитонита + «Мексикор®» внутримышечно 1 раз в сутки в течение 10 суток; группа 4 – модель распространенного перитонита + «Галавит®» внутримышечно 1 раз в день в течение 10 суток; группа 5 – модель распространенного перитонита + «Мексикор®» + Галавит® внутримышечно 1 раз в день в течение 10 суток. Оценка состояния системной воспалительной реакции и свободнорадикальной системы оценивалась по динамике ряда биохимических показателей. Монотерапия препаратами Мексикор® и Галавит® не приводила к восстановлению исследуемых биохимических показателей к концу эксперимента. Введение комбинации Мексикор® 60 мг/кг + Галавит® 8,6 мг/кг при моделировании распространенного перитонита в эксперименте оказывает более выраженное корригирующее действие на показатели оксидантно-антиоксидантного статуса, провоспалительных цитокинов и NO-продуцирующую функцию эндотелия по сравнению с монотерапией.

Ключевые слова: распространенный перитонит, эндотелиальная дисфункция, свободнорадикальное окисление, Мексикор®, Галавит®.

EXPERIMENTAL BASIS FOR THE COMBINED USE OF MEXICOR® AND GALAVIT® IN THE DIFFUSED PERITONITIS

Artyushkova E.B.¹, Blinkov Yu.Yu.¹, Frolova O.G.¹, Artyushkova E.V.¹,
Gladchenko M.P.¹, Chmihova A.N.²

¹State Budgetary Educational Institution of the Higher Education “Kursk state medical university» of Public Health Ministry of the Russian Federation, Kursk, e-mail: kurskmed@mail.ru;

²The Regional budgetary institution “Kursk station of animal disease prevention”, Kursk, e-mail: vetstankursk@yandex.ru

Purpose of the research was to study the potential of correction of systemic inflammatory reaction in experimental peritonitis by the use of combination of antioxidant Mexicor® and immunomodulator Galavit® as an addition to the standard therapy. Experimental animals were divided into 5 groups: group 1 – intact animals without modeling of peritonitis; group 2 – controls with the model of diffused peritonitis; group 3 – model of diffused peritonitis with the use of Mexicor® administered intramuscularly 1 time a day during 10 days; group 4 – model of diffused peritonitis with the use of Galavit® administered intramuscularly 1 time a day during 10 days; group 5 – model of diffused peritonitis with the use of combination of Mexicor® and Galavit® administered intramuscularly 1 time a day during 10 days. The assessment of systemic inflammatory reaction and free-radical system was done by the dynamics of biochemical indicators. Monotherapy by Mexicor® and Galavit® did not lead to restoration of the studied biochemical indicators by the end of the experiment. Introduction of the combination of Mexicor® 60 mg/kg and Galavit® 8,6 mg/kg in modeling the diffused peritonitis in an experiment provides the more significant correction effect on indicators of oxidant-anti-oxidant status, proinflammatory cytokines and NO-producing function of endothelium in comparison with monotherapy.

Keywords: diffused peritonitis, endothelial dysfunction, free-radical oxidation, Mexicor®, Galavit®.

Колоректальный рак (КРР) остается по-прежнему одним из наиболее частых

заболеваний, занимая второе-третье место в структуре онкологической патологии [1]. Одним из наиболее частых осложнений при КРР является перфорация опухоли с развитием, в последующем, распространенного калового перитонита. По данным различных авторов частота перфораций может составлять от 2,3 до 22,3 % [2,3], а показатели летальности в среднем составляют около 20–30 %, при наиболее тяжёлых формах этот показатель может достигать до 80–90 % [4,5].

Учитывая имеющиеся литературные данные, ведущим механизмом патофизиологических нарушений при распространенном перитоните являются сочетание воспаления, гипоксии и дисбаланса свободнорадикальных механизмов. Развивающийся дисбаланс приводит к усилению выраженности деструктивных процессов в паренхиматозных органах, что в свою очередь реализуется в виде прогрессирования полиорганной недостаточности [5,6]. В связи с этим патогенетически обоснованным является применение в интенсивной терапии тяжелой абдоминальной инфекции препаратов, направленных на улучшение функционирования систем клетки связанных с транспортом кислорода и поддержку работоспособности антиоксидантных систем на достаточном уровне [7]. С этих позиций исследованы различные препараты: церуллоплазмин, цитофлавин, мексидол, Мексикор®.

В настоящее время опубликованы работы, свидетельствующие о том, что пациенты с колоректальным раком находятся в иммунодефицитном состоянии, которое усугубляется на фоне распространенного перитонита при осложненных формах данной патологии. В терминальной стадии (при развитии полиорганной недостаточности) этот дефицит наиболее выражен, и возможность коррекции иммунодефицитных состояний в значительной мере позволяет рассчитывать на успех их лечения [6].

Учитывая наличие при распространенном перитоните развивающейся эндотелиальной дисфункции, иммунодефицитное состояние, актуальным остается вопрос разработки эффективных и патогенетически обоснованных методов сочетанной антиоксидантной и иммунокорректирующей терапии.

В этой связи, по нашему мнению, интерес может представлять изучение применения комбинации антиоксиданта Мексикор® и иммуномодулятора Галавит® как дополнение к стандартной схеме лечения при распространенном перитоните, развившемся на фоне перфорации опухолей ободочной кишки.

Методы исследования

Исследование выполнено крысах-самцах линии «Wistar», половозрелого возраста, массой тела 200–250 г. Эксперимент проведен в соответствии с Национальным стандартом Российской Федерации ГОСТ Р 53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной

практики», Приказом Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении Правил лабораторной практики», «Руководством по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» под общей ред. чл.-корр. РАМН, профессора Р.У. Хабриева (2005). Все оперативные вмешательства и манипуляции с животными были выполнены с использованием общей анестезии; эвтаназия – путем передозировки наркоза. Животные выводились из эксперимента на 1–5 и 10 сутки.

Экспериментальные животные были разделены на 5 групп, по 60 животных в каждой группе (10 животных в каждой группе для каждой точки выведения 1–5 и 10 сутки):

1. Группа 1 (интактная) – без моделирования перитонита.
2. Группа 2– (контроль) модель распространенного перитонита.
3. Группа 3 – модель распространенного перитонита + «Мексикор®» внутримышечно 1 раз в день в течение 10 суток.
4. Группа 4 – модель распространенного перитонита + «Галавит®» внутримышечно 1 раз в день в течение 10 суток.
5. Группа 5 – модель распространенного перитонита + «Мексикор®»+ Галавит® внутримышечно 1 раз в день в течение 10 суток.

В качестве средства для наркоза использовали хлоралгидрат, который вводили внутривентрально в дозе 300 мг/кг массы животного. Животным интактной группы выполнялась лапаротомия, внутривентральное введение 2 мл физиологического раствора, с последующим послойным ушиванием раны отдельными узловыми швами. Во 2–5 экспериментальных группах поднаркозом в асептических условиях с предварительной обработкой операционного поля антисептиками выполнялась срединная лапаротомия, модель распространенного перитонита воспроизводили внутривентральным введением 10 % каловой взвеси крысы, приготовленную каловую взвесь вводили в разных направлениях в объеме 0,5 мл на 100 г массы животного [8]. Через 48 часов от начала эксперимента в указанных группах выполнялась ре-лапаротомия, санация брюшной полости 0,02 % раствором фурацилина, послойным ушиванием лапаротомной раны.

Расчет дозы исследуемых препаратов в опытных группах производился с учетом средней терапевтической дозы для человека и коэффициента пересчета в соответствии с «Руководством по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ». Эффективность антиоксидантного препарата Мексикор® производства ООО «ЭкоФармИнвест», произведено ФГУП «Государственный завод медицинских препаратов», Россия исследовалась при внутримышечном введении в дозе 60 мг/кг/сут. Иммуномодулятор Галавит® производства ЗАО «Центр современной медицины

«МЕДИКОР» (Россия) вводился животным внутримышечно в дозе 8,6 мг/кг/сут, основываясь на данных о средней терапевтической суточной дозе (100 мг) для человека массой 70 кг. Исследуемые препараты вводились внутримышечно в течение 10 суток эксперимента. При комбинированном лечении исследуемые препараты вводились в аналогичных дозах, что и при монотерапии.

На каждом сроке экспериментального исследования в качестве критериев эффективности проводимого лечения использовалась оценка биохимических показателей в крови экспериментальных животных: малонового диальдегида (МДА), общей антиокислительной активности (ОАА). Концентрацию МДА в плазме определяли после экстракции бутанолом спектрофотометрически с помощью наборов «ТБК-Агат». Результаты выражали в мкмоль/л. ОАА определяли методом, основанным на степени ингибирования аскорбат- и ферроиндуцированного окисления Твин-80 до МДА. Определение стабильных конечных метаболитов оксида азота проводили спектрофотометрически при длине волны 540 нм с реактивом Грисса [9].

Содержание интерлейкина 6 (ИЛ-6), фактора некроза опухолей альфа (ФНО- α) определяли в количественном выражении с помощью ИФА наборов для крыс фирмы «eBioscience» (Австрия). Указанный метод основан на «сэндвич»-варианте твердофазного иммуноферментного анализа с применением биотин-конъюгированных поликлональных антител против крысиных ФНО- α и ИЛ-6.

При статистической обработке результатов определяли среднюю арифметическую (М), ошибки средней арифметической ($\pm m$) и оценки достоверности различий сравниваемых параметров между группами с использованием t-test для групп с разными дисперсиями. Достоверными считались различия сравниваемых параметров при $p < 0,05$.

Результаты исследования

При моделировании распространенного перитонита в эксперименте подтверждена одна из ведущих ролей, принадлежащая развивающемуся окислительному стрессу с прогрессирующей генерацией активных форм кислорода, в частности, оксида азота (NO). Повышение продукции оксида азота на фоне эндотоксинов при распространенном перитоните приводит к развитию эндотелиальной дисфункции.

Выявленные изменения концентрации конечных стабильных метаболитов оксида азота (NO) в контрольной группе подтверждает нарушение NO-продуцирующей функции эндотелия. На всех сутках проводимого исследования в контрольной группе животных отмечалась высокая концентрация стабильных конечных метаболитов NO по сравнению с интактной группой животных и группами животных с фармакологической коррекцией (таблица 1).

Таблица 1

Концентрация стабильных конечных продуктов метаболитов NO (мкмоль/л) в крови при экспериментальном перитоните, (M±m), n=10 в каждой группе для каждой точки выведения - сутки эксперимента

Группы животных	Сутки эксперимента					
	1	2	3	4	5	10
Интактные	2,19±0,10 ^x	2,90±0,09 ^x	3,10±0,08 ^x	3,63±0,14 ^x	3,88±0,09 ^x	3,00±0,08 ^x
Контроль	10,83±0,17 ^y	12,32±0,14 ^y	13,58±0,13 ^y	13,25±0,10 ^y	11,37±0,12 ^y	7,04±0,10 ^y
Монотерапия Мексикор®	9,2± 0,14 ^{xy}	8,46 ±0,09 ^{xy}	7,30 ±0,07 ^{xy}	6,9 ±0,21 ^{xy}	5,60 ±0,15 ^{xy}	4,10± 0,12 ^x
Монотерапия Галавит®	10,25±0,24 ^y	11,60±0,31 ^y	11,43±0,43 ^{xy}	11,27±0,47 ^{xy}	10,36±0,51 ^y	6,17±0,08 ^y
Комбинированная терапия Мексикор® + Галавит®	8,80±0,14 ^{xy}	7,71±0,11 ^{xy}	6,95±0,09 ^{xy}	5,83±0,28 ^{xy}	4,20±0,14 ^y	3,80±0,11 ^y

Примечание: ^x – p < 0,05 по сравнению с контрольной группой;

^y – p < 0,05 по сравнению с группой интактных животных.

Через сутки от начала эксперимента отмечается увеличение уровня оксида азота: в контрольной группе более чем в 5 раз; в группе с применением монотерапии препаратом Мексикор® в 4,2 раза; с применением препарата Галавит® в 4,6 раза. На последующих сроках исследования уровень концентрации стабильных конечных метаболитов NO в контрольной группе продолжает нарастать, несмотря на проведенную ре-лапаротомию и санацию брюшной полости через 48 часов от начала эксперимента. По нашему мнению, дальнейшее увеличение исследуемого показателя в контрольной группе до 4 суток эксперимента может быть обусловлено реперфузионным синдромом. Лишь с 5-х суток концентрация стабильных конечных метаболитов NO имеет тенденцию к уменьшению, не достигая исходного значения к окончанию эксперимента, оставаясь повышенной более чем в 2 раза. Монотерапия препаратами Мексикор® и Галавит® достоверно снижала уровень концентрации стабильных конечных метаболитов NO, начиная с первых суток эксперимента, однако, к окончанию эксперимента исследуемый показатель не достигал исходного значения. В отличие от монотерапии, комбинация препаратов Мексикор®+Галавит® продемонстрировала наиболее выраженный фармакологический эффект: уровень концентрации стабильных конечных метаболитов NO достигал своих исходных значений к 10-м суткам эксперимента.

В эксперименте была изучена динамика МДА, характеризующего состояние

свободнорадикального окисления липидов. В группе контроля отмечено прогрессирующее нарастание МДА на 1–5 сутках эксперимента, при отсутствии тенденции к снижению к 10-м суткам. В отличие от стабильно высокого, более чем в 2 раза, показателя концентрации МДА в группе не леченых животных, в группе с применением комбинации Мексикор®+ Галавит®, выявило значительное снижение концентрации МДА, начиная со 2-х суток эксперимента (таблица 2), достигая исходных значений к окончанию эксперимента. Статистически достоверные данные получены на всех сроках исследования.

Таблица 2

Показатели МДА и ОАА в эксперименте ($M \pm m$), $n=10$ в каждой группе для каждой точки выведения – сутки эксперимента

Серия	Сутки					
	1	2	3	4	5	10
Малоновый диальдегид (мкмоль/л), $M \pm m$						
Интактные	2,23±0,10 ^x	2,34±0,09 ^x	2,21±0,10 ^x	2,15±0,10 ^x	2,26±0,09 ^x	2,09±0,10 ^x
Контроль	5,45±0,28 ^y	5,36±0,22 ^y	5,72±0,26 ^y	5,37±0,23 ^y	5,07±0,26 ^y	4,65±0,17 ^y
Монотерапия Мексикор®	5,2±0,14 ^y	4,6±0,07 ^y	3,3±0,19 ^{x,y}	3,2±0,12 ^{x,y}	2,8±0,12 ^y	2,98±0,11 ^{x,y}
Монотерапия Галавит®	5,35±0,07 ^y	5,22±0,09 ^y	4,87±0,17 ^x	4,59±0,26 ^x	3,56±0,24 ^{x,y}	3,16±0,19 ^{x,y}
Комбинированная терапия Мексикор®+ Галавит®	4,78±0,16 ^y	3,97±0,17 ^{x,y}	3,81±0,09 ^{x,y}	2,88±0,12 ^{x,y}	2,56±0,11 ^{x,y}	2,48±0,16 ^{x,y}
Общая антиокислительная активность (%), $M \pm m$						
Интактные	35,4 ±0,51 ^x	32,5±0,55 ^x	31,6±0,87 ^x	34,8 ±0,73 ^x	34,6±0,62 ^x	36,0 ±0,54 ^x
Контроль	17,7 ±0,32 ^y	14,8 ±0,08 ^y	16,2 ±0,09 ^y	15,5±0,21 ^y	14,6 ±0,14 ^y	15,2±0,25 ^y
Монотерапия Мексикор®	15,9±0,19 ^{x,y}	22,4±0,31 ^{x,y}	23,5±0,13 ^{x,y}	25,6±0,17 ^{x,y}	31,6±0,24 ^{x,y}	34,9±0,44 ^x
Монотерапия Галавит®	16,62±1,00 ^y	15,36±0,28 ^y	14,84±0,61 ^y	14,02±0,28 ^y	15,86±0,34 ^y	19,22±0,28 ^y
Комбинированная терапия Мексикор®+ Галавит®	17,36±0,15 ^y	24,25±0,31 ^{x,y}	26,78±0,56 ^{x,y}	29,46±0,51 ^{x,y}	33,80±0,34 ^{x,y}	35,93±0,35 ^{x,y}

Примечание: ^x – $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой;
^y – $p < 0,05$ по сравнению с интактной группой.

В ходе эксперимента выполнена оценка общей антиокислительной активности (ОАА). Следует отметить, что уже на ранних сроках эксперимента система ОАА не может «противостоять» повреждающим факторам продуктов перекисного окисления липидов. Об угнетении свидетельствовало снижение исследуемого показателя относительно контрольной группы животных. Так, на 2-е сутки снижение ОАА составило 54,5 % в группе контроля, к

10-м суткам – 57,8 %. Обращает на себя внимание уровень ОАА в группе животных, получавших монотерапию препаратом «Мексикор®» в дозе 60 мг/кг: начиная с первых суток эксперимента исследуемый показатель имеет стойкую тенденцию к увеличению, достигая исходных цифр ОАА к концу эксперимента. Восстановление уровня ОАА при монотерапии препаратом Галавит® к 10-м суткам эксперимента не отмечено: исследуемый показатель в 2 раза меньше, чем в интактной группе, и составил 19,22±0,28. Подтверждена наибольшая эффективность использования комбинации Мексикор®+Галавит®: значения ОАА, начиная с 5-х суток эксперимента, практически аналогичны интактной группе.

Из провоспалительных цитокинов изучались интерлейкин 6 (ИЛ-6) и фактор некроза опухолей-альфа (ФНО-α) (таблица 3).

Таблица 3

Показатели ИЛ-6 и ФНО-α в эксперименте (M±m), n=10 в каждой группе для каждой точки выведения – сутки эксперимента

Серия	Сутки					
	1	2	3	4	5	10
ИЛ-6, пг/мл						
Интактные животные	4,26±0,20 ^x	4,33±0,08 ^x	4,30±0,17 ^x	3,86±0,04 ^x	4,12±0,05 ^x	4,25±0,23 ^x
Контроль	24,34±1,36 ^y	41,79±1,10 ^y	39,07±0,10 ^y	42,24±0,95 ^y	37,16±0,85 ^y	30,69±1,04 ^y
Монотерапия Мексикор®	23,54±0,38 ^y	40,09±0,19 ^y	38,03±1,12 ^y	35,94±0,65 ^{xy}	25,66±1,05 ^{xy}	12,79±1,54 ^{xy}
Монотерапия Галавит®	24,31±0,59 ^y	39,11±1,31 ^y	37,18±0,76 ^y	32,15±1,76 ^{xy}	19,88±0,88 ^{xy}	5,72±0,54 ^{xy}
Комбинированная терапия Мексикор® + Галавит®	23,33±0,94 ^y	38,68±1,20 ^{xy}	30,54±1,12 ^{xy}	18,79±0,39 ^{xy}	7,89±0,46 ^{xy}	4,66±0,18 ^x
ФНО- α, пг/мл						
Интактные животные	12,63±0,14 ^x	14,52±0,15 ^x	13,39±0,15 ^x	12,82±0,08 ^x	13,91±0,14 ^x	12,35±0,11 ^y
Контроль	137,16±4,02 ^y	135,52±2,95 ^y	124,76±2,16 ^y	106,84±1,80 ^y	91,16±1,94 ^y	52,74±0,94 ^y
Монотерапия Мексикор®	136,56±3,22 ^x	128,22±2,05 ^{xy}	119,66±1,86 ^{xy}	79,34±2,07 ^{xy}	59,16±2,74 ^{xy}	30,54±1,24 ^{xy}
Монотерапия Галавит®	139,56±0,81 ^y	134,52±0,70 ^y	120,11±0,51 ^{xy}	93,72±0,55 ^{xy}	66,38±0,43 ^{xy}	38,11±0,32 ^{xy}
Комбинированная терапия Мексикор® + Галавит®	132,60±0,83 ^y	118,10±0,35 ^{xy}	100,83±0,45 ^{xy}	58,09±0,45 ^{xy}	37,53±0,52 ^{xy}	12,49±0,55 ^x

Примечание: ^x – p < 0,05 по сравнению с контрольной группой;
^y – p < 0,05 по сравнению с интактной группой.

Монотерапия препаратами Галавит® и Мексикор® существенно не влияла на снижение уровня провоспалительных цитокинов на 1–4 сутках эксперимента. Начиная с 5-х

суток эксперимента мы наблюдали снижение ИЛ-6 и ФНО- α относительно контрольной группы животных, однако, к окончанию эксперимента только в группе с монотерапией препаратом Галавит® уровень ИЛ-6 приближался к исходным цифрам, составляя $5,72 \pm 0,54$ пг/мл. При комбинированной схеме лечения Мексикор®+Галавит® отмечалось более значимое снижение провоспалительных цитокинов относительно контрольной группы. К 10-м суткам показатели ИЛ-6 и ФНО- α достигали исходных значений.

Выводы

Анализ полученных результатов позволяет утверждать, что применение препарата Мексикор®, обладающего антиоксидантной, антигипоксической и антиишемической активностью в комбинации с иммуномодулятором Галавит®, уменьшает продукцию свободных радикалов, прогрессирование процессов ПОЛ, а также способствует коррекции иммунопатологических нарушений при экспериментальном перитоните.

Список литературы

1. Каприн А.Д. Злокачественные новообразования в России в 2015 году (заболеваемость и смертность) / А.Д. Каприн, В.В. Старинский, Г.В. Петрова. – М., 2015. – 250 с.
2. Сочетание осложненных форм рака толстой кишки: клиника, диагностика, хирургическая тактика / Ю.А. Шевченко, Ю.М. Стойко, А.Л. Левчук [и др.] // Вестн. эксперим. и клин. хирургии. – 2011. – Т. 4, № 1. – С.641-646.
3. Lefevre J.H. Acute peritonitis / J.H. Lefevre, Y. Parc // Rev. Prat. – 2010. – Vol. 60, no. 2. – P. 279-283.
4. Лечение распространенного гнойного перитонита / Б.С. Суковатых, Ю.Ю. Блинков, А.Е. Букреева [и др.] // Хирургия. – 2012. – № 9. – С. 42-47.
5. Савельев В.С. Перитонит и эндотоксиновая агрессия /В.С. Савельев, В.А. Петухов. – М., 2012. – 326 с.
6. Суковатых Б.С. Механизмы развития распространенного перитонита / Б.С. Суковатых, Ю.Ю. Блинков, О.Г. Фролова // Вестн. эксперим. и клин. хирургии. – 2012. – Т.5, № 2. – С. 469-477.
7. NO contributes to abnormal vascular calcium regulation and reactivity induced by peritonitis-associated septic shock in rats / S.J. Chen [et al.]. – Shock. – 2010. – Vol. 33, no. 5. – P. 473-478.
8. Лазаренко В.А. Экспериментальная модель распространенного калового перитонита / В.А. Лазаренко, В.А. Липатов, Ю.Ю. Блинков // Курск. науч.-практич. вестн. – 2008. – № 4. – С. 128-132.

9. Snyder S.H. Biological roles of nitricoxide/ S.H. Snyder, D.S. Bredt // Sci Am. – 1992. – Vol. 266. – P.68-71.