

ХИТОЗАНОВЫЙ ЭНТЕРОДИАЛИЗ ПРИ ДЕСТРУКТИВНОЙ ФОРМЕ ПАНКРЕАТИТА

Большаков И.Н., Приходько Е.А.

ГОУ ВПО «Красноярская государственная медицинская академия»

Красноярск, Россия

Многоэтапная система контроля поддержания постоянства энтеральной среды дает сбой при критических состояниях, патологических процессах в желудочно-кишечном тракте, различного рода токсемиях, сопровождающихся нарушениями процессов секреции и всасывания. Возрастает нагрузка на другие органы детоксикации и метаболической коррекции: печень, легкие, почки, кожу. В свою очередь, нарушение функции этих органов и накопление в крови недоокисленных продуктов метаболизма ведет к повышению их выделения в просвет желудочно-кишечного тракта. Посредством такого взаимодействия органов и систем на фоне относительной функциональной специализации возможны перераспределение метаболической нагрузки и усиление роли желудочно-кишечного тракта в детоксикации, выведении продуктов обмена, включение кишки в дополнительные звенья регуляции гомеостаза. Эту способность можно усилить путем введения энтеросорбентов, связывающих агрессивные компоненты химуса. С начала серийного выпуска модифицированных сорбентов энтеросорбция привлекла внимание клиницистов простотой выполнения. В основе метода лежит возможность обратного извлечения токсических веществ из крови в кишку и дальнейшее их связывание на сорбентах.

Большой интерес представляют водорастворимые и водонерастворимые препараты хитозана, дающие вязкие растворы и гели. Хитозан имеет уникальную линейную поликатионную фибриллярную структуру и обеспечивает адгезионное сродство к компонентам клеточных мембран. Хитозан имеет два типа реакционноспособных групп, создающих возможность проведения более разнообразной их модификации, осуществление строго направленного синтеза производных по ОН- и NH₂-группам. Дополнительно протонированная аминогруппа (NH₃⁺) является высокоактивной. Хитозан является полисахаридом органического происхождения. Высокая биосовместимость, нетоксичность, даже в больших дозах, биodeградебельность, низкое раздражающее действие на слизистую оболочку кишки полимера хитозана и его химических производных открывают широкие возможности их использования при лечении синдрома эндогенной интоксикации. Необходимо отметить высокую адсорбционную активность хитозана при переходе его из растворимого в коллоидное состояние в двенадцатиперстной кишке, где среда постепенно изменяется от кислой до нейтральной и слабощелочной. Чем ниже молекулярная масса хитозана, тем меньше размер его полимерной молекулы, тем легче ему обнаружить точки взаимодействия с глобулой фермента, необходимые для образования межмолекулярного комплекса. При этом степень связывания аминогрупп с ферментом увеличивается и пропорционально возрастает активность биокатализатора. По мере увеличения молекулярной массы хитозана степень связывания фермента с полисахаридом уменьшается вследствие возникновения стерических препятствий при подходе более объемных молекул полимера к биокатализатору.

Известно, что мукоадгезивный эффект хитозана формирует эффект перфузии через эпителиальный слой клеток. Если контакт хитозана с эпителиальными клетками происходит непосредственно без прослойки компонента слизи, то эффект абсорбции веществ, включая и плохо растворимые субстанции, становится высоким. Слой слизи выполняет барьерную функцию. Степень замещения ацетильных групп на аминные и величина молекулярной массы полимера играют существенную роль в активности направленного транспорта веществ. Установлено с помощью ¹⁴C-маннитола и ¹⁴C-полиэтиленгликоля усиленное проникновение через монослой клеток кишечного эпителия этих веществ в сторону хитозана. Градиент проницаемости в сторону гидрохлорида хитозана возрастает в 34 раза, глутамата хитозана – в 25 раз, N-триметилхитозан хлорида – в 11 раз. При повышении

концентрации полимера проницаемость веществ увеличивается. Выявлено, что процесс проницаемости заключается в открытии плотных межклеточных контактов слизистой оболочки, что существенно усиливает околоклеточный транспорт. Важными факторами является заряд и плотность полимера, структура хитозана и его производные. Эти физико-химические свойства определяют эффективность абсорбции. При повышении степени положительного заряда в полимере усиливается проницаемость гидрофильных макромолекул, таких как полипептиды и белки. Повышение степени деацетилирования хитина до 40-60% приводят к росту транспорта мембранопроникающей флуоресцентной метки. Усиление транспорта сопровождается переносом веществ, состоящих с пептидами в комплексе. Кроме того, усиление абсорбции гидрофильных веществ через эпителиальный слой кишки зависит от pH среды. При $pH < 7,0$ в присутствии гидрохлорида или глутамата хитозана активная трансэпителиальная абсорбция веществ происходит в верхних отделах тонкой кишки. При увеличении ионной силы среды ($pH > 7,0$) интенсивность абсорбции смещается в нижний отдел тонкой кишки и толстую кишку. Увеличение степени деацетилирования (СД) хитозана до 0,85-0,99 еще больше усиливает околоклеточный транспорт и эффект абсорбции веществ. В этих условиях высокая абсорбция сочетается с низкой токсичностью. Во всех случаях увеличение концентрации полимера в тонкой кишке приводит к повышению проницаемости эпителия. При этом обратный транспорт пептидов через эпителиальный покров слизистой оболочки кишки в сторону заряженного хитозана будет сопровождаться перераспределением и связыванием токсического материала. Кроме того, рост биодоступности пептидов в комплексе с хитозаном, например, активированных ферментов может проявляться по отношению к своим субстратам, а это будет приводить к падению уровня их активности, что весьма важно при состоянии функционального дуоденостаза, сопровождающего деструктивный панкреатит.

При тяжелых формах панкреатита и сеансах энтеросорбции события детоксикации первично происходят в двенадцатиперстной кишке. При этом ключевое значение имеет установление роли и места хитозана в патогенезе острого панкреатита и механизмов детоксикации. Использование хитозана в качестве сорбента обусловлено широкими возможностями модификации структуры полимера, получения его в виде растворов, гелей и других лекарственных форм, способных свободно мигрировать через различные энтеральные дренажи.

Цель исследования состояла в разработке в эксперименте и апробировании в клинической практике способа детоксикации при деструктивных формах панкреатита с помощью гелевой формы хитозана и его химических производных. **В задачи исследования** входили: принципиальное установление эффективности энтеросорбции продуктами хитозана в детоксикации при экспериментальном жировом панкреонекрозе, разработка режимов энтеросорбции гелевыми формами хитозана, демонстрация динамики морфофункциональных изменений поджелудочной железы в условиях энтеросорбции хитозаном, апробирование результатов экспериментальных разработок в клинической практике при лечении пациентов с деструктивной формой панкреатита.

В работе использована экспериментальная модель жирового панкреонекроза на 108 крысах популяции Wistar (А.С. № 1259328, 1984), на которой отработывались режимы энтеросорбции (введение хитозановых гелей в двенадцатиперстную кишку различных концентраций (1%, 2%, 5% и 7%), pH (4, 6, 7 и 8), молекулярной массы (10кD, 100кD и 200кD), степени деацетилирования (0,90-0,95), объема введения (по 0,5 мл/3 раза в день, по 2 мл/3 раза в день, по 2 мл/6 раз в день), длительности введения полимера (3, 10, 15 и 21 суток от момента моделирования заболевания), химического производного коллоидного хитозана (аскорбат, ацетат, глутамат), а также кинетика сорбции панкреатических ферментов (липаза, амилаза, трипсин) из тонкокишечного химуса больных животных с высоким уровнем этих ферментов. Перечисленные режимы сорбции устанавливались в период первых трех суток развития деструктивной картины панкреатита с привлечением контрольных групп животных (интактные, нелеченные, группы, получавшие контрольную матрицу сорбента – сефадекс G-

25). Контроль сорбции осуществлялся путем регистрации клинической картины заболевания, выживаемости животных, уровней в плазме крови фракций билирубина, мочевины, креатинина, общего белка, альбумина, расшифровки протеинограммы, активности щелочной фосфатазы, АЛАТ и АсАТ, ферментов амилазы, липазы, трипсина (биохимический анализатор Hitachi 912, Japan; автоанализатор Centrifichem 400, USA; автоанализатор FP 90 LM Lab.System, Finland). Микроскопический анализ ткани поджелудочной железы осуществлялся по гистологическим срезам, окрашенным гематоксилином и эозином и по Ван-Гизону.

В клинике произведена апробация метода энтеросорбции с использованием хитозановых гелевых сорбентов, в частности коллоидной формы хитозана с ММ 100 кД, СД 0,94 и рН 7,0 на базе реанимационного отделения, хирургических отделений ГКБ №7 г. Красноярска и содержит результаты применения предложенного метода у 5-ти больных с тотальным смешанным панкреонекрозом. Контрольную группу составили 10 больных со смешанной формой деструктивного панкреатита, у которых в послеоперационном периоде не использовалась энтеросорбция гелевыми формами хитозана.

Среди обследованных больных были лица обоего пола в возрасте от 35 до 65 лет, из них одна женщина и четыре мужчины. Сроки поступления в стационар колебались от 24 до 48 часов с момента начала заболевания. Этиологическим фактором начала заболевания в 3-х случаях было злоупотребление алкоголем, а в 2-х - желчнокаменная болезнь.

Диагноз острого деструктивного панкреатита был подтвержден клинико-лабораторными данными, результатами экстренного ультразвукового, а при наличии показаний, лапароскопического методов исследований и оперативного вмешательства.

Операции выполнялись в сроки от 24 до 48 часов с момента поступления больных в стационар. Объем операции состоял из верхне-срединной лапаротомии, абдоминализации поджелудочной железы, марсупиализации, дренирования сальниковой сумки и свободной брюшной полости.

На 3-4 сутки после операции и снятия ороинтестинальной интубации проводили в течение 5-ти суток сорбцию хитозановым гелевым сорбентом из расчета 4 мл/кг массы тела в комплексе с общепринятой схемой лечения.

Для контроля за эффективностью проводимого комплексного лечения использовались те же методики, что и в экспериментальном фрагменте работы.

С целью исследования влияния хитозанового лаважа на состояние дуоденостаза при панкреонекрозе (приоритет по заявке на изобретение от 21.04.03 за № 2003111584/14) гель хитозана (2%) со степенью дезацетилирования 0,75 и молекулярной массой 180-200 кД был использован у 12 пациентов. Клинический диагноз - тотальный смешанный панкреонекроз. Разлитой ферментативный перитонит - 8 больных, тотальный геморрагический панкреонекроз - 2 больных, очаговый жировой панкреонекроз - 2 больных. Продукт вводился и при отечной форме панкреатита - 24 больных. Хитозан вводился по кишечному зонду по 20 мл через 6 - 8 часов 2 - 3 раза в сутки в течение 3-5 суток в послеоперационном периоде. У больных с отечной формой панкреатита без оперативного вмешательства введение полимера - по желудочному зонду. Наряду с введением хитозана больные получали традиционную терапию (антибиотики, ингибиторы ферментов, средства, улучшающие реологические свойства крови, гипербарическая оксигенация, детоксикационные препараты - препараты для гемодилюции).

Результаты экспериментальных исследований установили, что наиболее эффективными гелевыми формами хитозана являются коллоидная форма, хитозан - аскорбат и хитозан - ацетат с ММ 10 кД, а также коллоидная форма хитозана, хитозан - глутамат и хитозан - ацетат с ММ 100 -120 кД. Эффективность заключалась в коррекции нарушенных уровней ингредиентов крови из 14 контролируемых в следующем порядке: коллоидный хитозан – 4 ингредиента, хитозан аскорбат – 7, хитозан глутамат – 8, хитозан ацетат – 10. При этом последние 2 формы хитозана способны восстанавливать уровни амилазы, щелочной фосфатазы, АЛАТ, общего белка и числа клеток белой крови с большой степенью

вероятности ($p < 0,01$). При использовании любого производного хитозана с ММ 100-120 кД из 14 ингредиентов крови коррекция затрагивает 5–8, что указывает на эффективность детоксикации (патент РФ № 2196587).

Все исследованные разновидности гелевых хитозановых сорбентов оказывали положительное терапевтическое действие, которое проявлялось в поведенческом статусе животных и существенном снижении летальности.

Исследование поведенческого статуса животных при энтеросорбции разными гелевыми формами солей хитозана показало, что уже в первые сутки отмечено благоприятное течение острого панкреатита. Большая часть животных активнее передвигалась по клетке, охотнее принимала пищу и воду, у них был меньше выражен цианоз. По сравнению с контрольной группой, в которой к 3 – 4 суткам летальность составила 100 %, у животных, получающих 2 % солевые производные органических кислот гелевых форм хитозана с ММ 100–120 кД и ММ 180–200 кД, летальность в эти сроки составила 5 %.

При энтеросорбции 2 % солевыми производными органических кислот гелевых форм хитозана с ММ 10 кД животные уже через сутки после операции активно передвигались по клетке, принимали пищу и воду, отсутствовал цианоз носа, ушных раковин, лапок. Животные в течение 3-х суток были активны, с хорошим аппетитом и выживаемость составила 100 %.

При энтеросорбции контрольным сорбентом сефадексом- 25 летальность в течение 3 суток составила 80 %. При вскрытии брюшной полости у всех погибших животных отмечены жировые некрозы в междольковой жировой ткани, располагающиеся в головке или хвосте, реже диффузно во всех отделах. Отмечалось большое количество бляшек жирового некроза на париетальной брюшине, поверхности желудка, петель тонкой и толстой кишки и сальников, выпот светло- желтого цвета в брюшную и плевральную полости до 2 мл.

Каждый из перечисленных выше разновидностей хитозанов с ММ 10 кД заслуживает внимания своей способностью влиять на состав крови. Коллоидная форма хитозана с ММ 10 кД снижает уровень ферментемии на 38%, хитозан аскорбат, хитозан ацетат и хитозан глутамат - на 66%, 26% и 14%, соответственно. При энтеросорбции гелевыми сорбентами с ММ 100-120 кД наиболее перспективной формой для снижения симптомов эндогенной интоксикации является аскорбат хитозана, который достаточно эффективно позволяет купировать печеночную недостаточность, корректируя за короткий срок около 89% ингредиентов крови (АсАТ восстанавливается на 38%, АлАТ – на 48%). Другие виды сорбентов этой молекулярной массы оказываются на 22% менее эффективными.

Таким образом, полученные результаты биохимических и клеточных изменений в крови позволяют утверждать, что пероральное введение гелевых форм хитозановых сорбентов является неинвазивным эффективным эфферентным способом детоксикации при экспериментальном жировом панкреонекрозе. Снижение уровня амилаземии по сравнению с нелеченым жировым панкреонекрозом указывает на приостановление аутолиза в поджелудочной железе. Снижение уровня активности аминотрансфераз сыворотки крови говорит о приостановлении цитолитического процесса в гепато–билиарной системе и эффективности проводимых мероприятий. Суточный объем введения до 24 мл/кг массы обеспечивает коррекцию 70% нарушенных ингредиентов плазмы крови, из которых величина лейкоцитоза, фракции общего билирубина и мочевины восстанавливаются с высокой степенью вероятности (30%) ($p < 0,01$). Свидетельством этого служит 100% показатель выживаемости животных, быстрое снижение маркеров эндогенной интоксикации крови и признаки сохранения ацинарной ткани поджелудочной железы. Соли органических кислот, модифицирующих хитозан, улучшают сорбционные характеристики полимера. Увеличение эффективности детоксикации солей органических кислот хитозана объясняется тем, что в условиях $pH < 7,0$ начинают дополнительно протонироваться за счет избытка ионов водорода (H^+) аминогруппы полимера ($NH_2 \rightarrow NH_3^+$), что увеличивает суммарный заряд поликатиона. Такая модификация хитозана усиливает электростатические взаимодействия не

только с поверхностью слизистых оболочек желудочно–кишечного тракта, но и с отдельными молекулами и их комплексами (билирубином, креатинином, мочевиной). В результате обеспечивается не только дренирование из крови (перфузия и перераспределение) этих ингредиентов, но и химическое связывание их в кишечном химусе.

Проведенный в динамике анализ биохимических ингредиентов крови крыс при экспериментальном жировом панкреонекрозе при условии постоянного кормления на 10, 15 и 21 сутки показал эффективное восстановление нарушенных функций при энтеросорбции продуктами хитозана, в частности гелевой формы “Амидан”. Чем длительнее совершаются сеансы энтеросорбции, тем больше ингредиентов крови приходит к норме. К 10 суткам эксперимента уровень активности амилазы снизился на 43%, к 21 суткам - на 68%; щелочной фосфатазы, соответственно, на 33,7% и осталось стабильным в течение 3–х недель наблюдения (35,7%). Полное восстановление АлАТ регистрируется к 15 суткам, АсАТ – к 21 суткам эксперимента. Общий белок восстанавливается в самые ранние сроки. Этот факт можно объяснить длительностью перфузии интерстициального пространства, при которой с течением времени происходит большее связывание патологических субстратов на хитозановом полимере в полости желудочно-кишечного тракта. При этом уменьшается поступление продуктов распада в кровь, снижается проникновение токсинов в брюшную полость и образование ферментативного перитонеального экссудата, который является одним из ведущих факторов прогрессирующего эндотоксикоза. При интестинальном лаваже хитозан одновременно воздействует на два основных звена патогенеза эндогенной интоксикации - панкреатогенную токсемию и ферментативный перитонит.

Кроме того, энтеролаваж хитозаном предупреждает развитие бактериальных осложнений, поскольку свойства полимера – это флокуляция и нарушение мембранных функций всех видов микрофлоры, связывание экзотоксинов грамотрицательных микробов.

Активное извлечение в стендовом эксперименте из дуоденального содержимого в условиях *in vitro* таких ферментов как амилаза, трипсин, липаза означает, что происходит инактивация протеолитических и липолитических ферментов с помощью хитозана посредством комплексообразования белков и аминок групп. Результатом такого взаимодействия становится активное удаление из химуса кишки активных белков.

Оценивая эффективность энтеросорбции больных с диагнозом тотальный смешанный панкреонекроз, разлитой ферментативный перитонит, можно констатировать, что через одни сутки после введения в ДПК сорбента отмечается тенденция к снижению уровня маркеров эндогенной интоксикации. Достоверное снижение относится только к количеству лейкоцитов (на 7,9 %).

Если через 1 сутки при общепринятой методике лечения панкреонекроза активность амилазы остается высокой и неизменной, то применение хитозана приводит к 10% ее снижению. Из 8 регистрируемых ингредиентов крови в контрольной группе больных через 5 суток энтеролаважа достоверной коррекции подвергаются 5 показателей (62,5%), из которых динамика амилазы по сравнению с долечebным периодом составляет 54,6%, АсАТ – 40%, общей фракции билирубина - 10,8%, числа лейкоцитов – 54,5%. В исследуемой группе пациентов хитозановый энтеролаваж через 5 суток лечения обеспечил коррекцию 7 исследуемых показателей крови (87,5%). Коэффициент коррекции по сравнению с долечebным периодом по амилазе составил 56,4%, по АсАТ – 40%, по билирубину – 71,8%, по мочеvine – 41,7%, по числу лейкоцитов – 65,4%. Кроме того, для хитозановой сорбции характерно полное восстановление общей фракции белка и альбумина. Таким образом, интегральная эффективность энтеросорбции на фоне интенсивной терапии деструктивной формы панкреатита составила 25 %.