

Исследование токсичности препаратов антицитокинового и антигипоксантажного действия в смеси с гидроксиэтилкрахмалом и применение их в лечении острого панкреатита.

П.С. Неверов

Резюме

Статья посвящена исследованию острой и подострой токсичности пентоксифиллина и мексибела в смеси с гидроксиэтилкрахмалом. Отмечено отсутствие увеличения токсичности при совместном назначении препаратов. Указанные сочетания препаратов были применены при лечении острого панкреатита. Это привело к уменьшению количества гнойно – септических осложнений на 4,19% и снижению летальности на 4,54%, а также позволило сократить длительность пребывания больного в стационаре на $2,1 \pm 0,9$ койко-дня.

Ключевые слова: панкреатит, пентоксифиллин, мексибел, гидроксиэтилкрахмал, токсичность, применение.

Study of toxicity drugs with anticytokine and antihypoxic activity in mixture with hydroxyethylstarch and their usage in the treatment of acute pancreatitis.

Pavel S. Neverov. Belorussian State medical university, Minsk.

Summary.

The article deals with the research into acute and sub-acute toxicity of pentoxyphilline and mexibel mixed with Hydroxyethylstarch. The absence of increase of toxicity of these medicines has been observed when being prescribed together. The mentioned combinations of the remedies were used when treating acute pancreatitis. It resulted in decrease of the number of purulent septic complications by 4.19% and reduction of fatality by 4.54%. It also became possible to shorten the period of the patient's stay in hospital by 2.1 ± 0.9 days.

Key words: pancreatitis, pentoxyphilline, mexibel, hydroxyethylstarch, toxicity, usage.

Исследование токсичности препаратов антицитокинового и антигипоксанта действия в смеси с гидроксипентоксифиллином и применение их в лечении острого панкреатита.

П.С. Неверов, ассистент 1-й кафедры хирургических болезней УО «БГМУ»
Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»

Введение. Лечение острого панкреатита (ОП) до сих пор является сложной и до конца не решенной проблемой неотложной хирургии. Сохраняется актуальность разработки новых схем консервативного лечения, способных улучшить доставку лекарственных средств в ишемизированные участки тканей, более эффективно купировать развитие цитокинового каскада, а также повышать степень антиоксидантной защиты и предотвращать перекисное окисление липидов [2, 3, 4]. Однако сочетание различных новых препаратов теоретически способно привести к потенцированию их токсичности, что должно быть исследовано экспериментально. Эффективность клинического применения лечебных комплексов антицитокинового и антигипоксанта действия также требует дальнейшего изучения.

Цель исследования: изучить в эксперименте острую и подострую токсичность препаратов антицитокинового (пентоксифиллин, международное непатентованное название (МНН), государственная регистрация РБ № 11/02/866 от 22.02.2011, производитель ОАО «Борисовский завод медицинских препаратов», РБ) и антигипоксанта (мексидин, МНН – этилметилгидроксипиридина сукцинат, государственная регистрация РБ №08/12/1559 от 02.12.2008, производитель РУП «Белмедпрепараты», РБ) действия при сочетании их с макромолекулярными плазмозамещающими растворами, а также оценить результаты лечения больных острым панкреатитом с применением новых лекарственных смесей на основе гидроксипентоксифиллина (ГЭК, МНН, государственная регистрация РБ № 10/06/1629 от 15.06.2010, производитель ОАО «Несвижский завод медицинских препаратов», РБ).

Материал и методы. Лекарственные средства антицитокинового (пентоксифиллин) и антигипоксанта (мексibel) действия растворялись в 6% ГЭК со средней молекулярной массой 200000 Да со степенью замещения 0,45 – 0,55. Смеси готовились *ex tempore* и инкубировались в термостате в течение 30 минут при $t\ 36^{\circ}\text{C}$. Острая и подострая токсичность изучалась при однократном внутривенном введении комбинации препаратов 192 беспородным половозрелым нелинейным белым мышам обоих полов массой 15 – 24 грамм и 192 беспородным половозрелым нелинейным белым крысам обоих полов массой 180 – 300 г. Доза препарата рассчитывалась по логарифмической шкале исходя из известной для чистой субстанции среднелетальной дозы и массы конкретной особи. Объем инфузии не превышал максимально допустимого значения для данного биологического вида (V_{max} для мыши массой 25 граммов – 0,5мл, V_{max} для крысы 250 гр – 5 мл). Животных фиксировали в станке, введение растворов производилось в боковую хвостовую вену животных с соблюдением принципов асептики и антисептики. По специальным параметрам (Таблица 1) оценивали общее состояние и вегетативный статус в течение первых 6 часов после введения (острая токсичность) и ежедневно в течение последующих двух недель после введения изучаемых смесей (подострая токсичность).

Таблица 1. Параметры оценки статуса мелких лабораторных животных при изучении острой токсичности.

Баллы	Степень активности	Описание активности
0	Нормальная	Интактное животное. Подвижно; активные движения - перемещение и «изыскание лучшего места в группе»; «настороженно-ожидательная» поза при незначительных болевых и тактильных раздражителях с избеганием, резкой голосовой и активно-оборонительными реакциями,

		царапающими и кусательными движениями. Хороший аппетит; частые «моющие» движения лапками.
1	Замедленная (субнормальная)	Положение – на четырех лапах, медленные активные движения – повороты туловища и небольшие передвижения по клетке, редкие глотательные движения. Реакция на болевые и тактильные раздражители – голосовая и «избегательно-оборонительная» с попытками укусов. При фиксации рукой за кожу в области спины - изворачивается с «уходом» от экспериментатора.
2	Пассивная	Животное заторможено, активно по клетке не передвигается, но при подталкивании перемещается на несколько шагов. Положение естественное – на четырех лапах; ощущается тонус мышц. «Избегательная» защитная реакция на раздражители, голосовая реакция слабая.
3	Слабая (минимальная)	В основном – боковое положение; непроизвольные слабые активные движения; мышцы расслаблены; вялая реакция на болевые и тактильные раздражители, голосовая – слабая.
4	Кома (отсутствие активности)	Боковое положение; обездвиженность; отсутствие активных движений; мышцы расслаблены; дыхание прерывисто; реакции на болевые и тактильные раздражители, в том числе и голосовые, практически отсутствуют.

После снятия с эксперимента определяли макроскопические изменения в органах и рассчитывали органно-массовые коэффициенты.

Далее определяли летальный эффект, выраженный в пробитах (от английского probability unit – вероятностная единица, Probit). Для расчета летального эффекта в зависимости от дозы препарата применен метод наименьших квадратов. Графики зависимости «доза – эффект» были построены и рассчитаны уравнения регрессии для них. Из этих уравнений были рассчитаны величины доз, характеризующих минимальный эффект гибели животных (пороговая доза – DL_{10}), вызывающих летальный эффект у большинства подопытных животных (DL_{90}), и минимальных абсолютно смертельных доз (DL_{99}). Далее рассчитывали среднелетальную дозу (критерий DL_{50}). Ширина летального эффекта представляет собой диапазон доз между пороговой смертельной дозой (DL_{10}) и минимальной абсолютной смертельной дозой (DL_{99}). Отношение DL_{99} / DL_{10} представляет собой индекс летальности (IL), характеризующий степень токсичности соединения.

Другим показателем, характеризующим токсичность соединения, является скорость нарастания токсических эффектов, представленная коэффициентом

наклона прямой «доза – эффект»:
$$S = \frac{DL_{84}/DL_{50} + DL_{50}/DL_{16}}{2}$$

После утверждения Министерством здравоохранения Республики Беларусь инструкции на метод лечения ОП с включением лечебных смесей на основе ГЭК, изученные лечебные комплексы применены в клинических условиях. Проанализированы результаты комплексного лечения 84 пациентов с ОП, получавших стационарное лечение в хирургических отделениях 10 ГКБ г. Минска. Поступающим больным назначали лечение согласно разработанной схеме (пентоксифиллин, эмоксипин или мексibel внутривенно в смеси с 6% раствором ГЭК) – основная группа, 41 пациент. В контрольной группе (43 пациента) консервативное лечение пациентов с острым панкреатитом проводилось по стандартной методике (инфузионная терапия, антиферментные

препараты, нестероидные противовоспалительные препараты). Группы были относительно однородны по срокам и тяжести заболевания, возрасту и полу. Тяжесть панкреатита оценивалась критериями Рэнсона и по шкале Baltazar (при выполнении компьютерной томографии). На момент поступления учитывали возраст пациентов, количество лейкоцитов в периферической крови, содержание глюкозы, концентрация ЛДГ и АСТ. Через 48 ч после начала заболевания изучали гематокритное число, концентрацию азота мочевины крови, содержание Ca^{2+} в сыворотке крови. В сыворотке крови также определяли содержание амилазы, аланинаминотрансферазы, щелочной фосфатазы, в гемолизатах крови – уровень супероксиддисмутазы (СОД), малонового диальдегида (МДА), концентрацию гемоглобина, значение гематокрита.

Результаты и обсуждение. При однократном внутривенном введении комбинации мексibel+ГЭК нелинейным белым мышам летальность животных находилась в зависимости от применявшейся дозы препарата (таблица 2).

Таблица 2 – Летальный эффект мексibel+ГЭК при однократном внутривенном введении нелинейным белым мышам

Доза, мг/кг	Наблюдавшийся эффект, n погибших животных / n животных в группе	Летальный эффект	
		проценты	пробиты
Самцы и самки			
250	1/12	8,3	3,61
316	4/12	33,3	4,57
398	8/12	66,7	5,43
496	11/12	91,7	6,39
Самцы			
250	0/6	0 (1,0) ¹	(2,67) ¹
316	1/6	16,7	4,03
398	4/6	66,7	5,43
496	5/6	83,3	5,97

Самки			
250	1/6	16,7	4,03
316	3/6	50,0	5,00
398	4/6	66,7	5,43
496	6/6	100(96,5)	(6,81)

Примечание. ¹В скобках указан «исправленный» процент/пробит эффекта для доз, при которых летальный эффект составлял 0 % или 100 %.

На основании приведенных в таблице 2 рассчитаны уравнения регрессии.

Уравнение регрессии для нелинейных белых мышей (самцов и самок):

$$\text{Probit} = 9,264 \cdot \lg D - 18,6071 \quad (r = 0,996; p = 0,004), \quad (1)$$

для самцов нелинейных белых мышей:

$$\text{Probit} = 11,4078 \cdot \lg D - 24,5448 \quad (r = 0,966; p = 0,034) \quad (2)$$

и для самок нелинейных белых мышей:

$$\text{Probit} = 8,8142 \cdot \lg D - 17,1434 \quad (r = 0,986; p = 0,014), \quad (3)$$

где D – доза мексибела, мг/кг; Probit – летальный эффект, выраженный в пробитах.

Затем методом наименьших квадратов были построены графики зависимости «доза – эффект» (рис. 1).

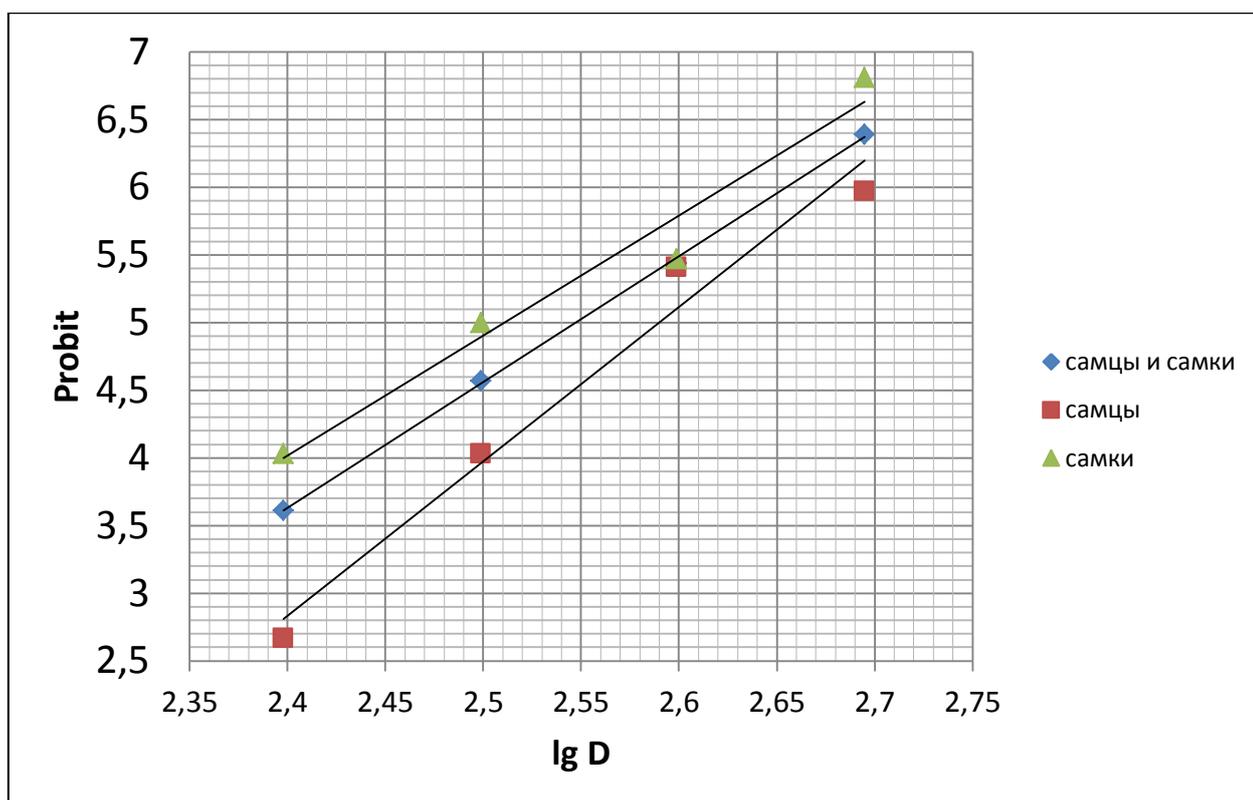


Рисунок 1 - Графики зависимости «доза – эффект (летальность)» в логарифмически – пробитных координатах для однократного внутривенного введения комбинации мексibel+ГЭК нелинейным белым мышам.

Из уравнений регрессии были рассчитаны среднелетальная доза DL_{50} для мексibела в растворе ГЭК, а также DL_{10} , DL_{90} и DL_{99} (таблица 3).

Таблица 3 – Показатели токсичности смеси мексibel+ГЭК для нелинейных белых мышей при его однократном внутривенном введении.

Показатель	Величина дозы, мг/кг, и ее доверительные границы с 95 %-ной вероятностью		
	Самцы	самки	самцы + самки
DL_{10}	300 (236 ÷ 381)	233 (173 ÷ 315)	257 (202 ÷ 326)
DL_{16}	318 (259 ÷ 391)	250 (193 ÷ 324)	276 (224 ÷ 339)
DL_{50}	389 (332 ÷ 455)	325 (274 ÷ 386)	353 (307 ÷ 406)
DL_{84}	475 (386 ÷ 584)	421 (325 ÷ 545)	452 (367 ÷ 556)

DL ₉₀	504 (397 ÷ 640)	454 (336 ÷ 613)	486 (383 ÷ 617)
DL ₉₉	622 (432 ÷ 896)	598 (369 ÷ 969)	631 (429 ÷ 928)

Статистически значимых различий в величинах среднелетальной дозы для самцов и самок нелинейных белых мышей не выявлено. Для мексисбел+ГЭК II оказался равен 2,46 (для самцов мышей – 2,07; для самок – 2,57). Коэффициент наклона S прямой «доза – эффект» составил для смеси мексисбел+ГЭК 1,22 (1,06 ÷ 1,40) у самцов мышей и 1,30 (1,07 ÷ 1,57) у самок мышей (общий показатель 1,28 (1,10 ÷ 1,49)).

Таким образом, по величине среднелетальной дозы при однократном внутривенном введении мексисбел+ГЭК нелинейным белым мышам препарат, согласно модифицированной классификации Организации экономического содействия и развития (OECD), приведенной в Техническом кодексе установившейся практики (ТКП) 125-2008 (02040) «Надлежащая лабораторная практика» [1], относится к V классу токсичности веществ и является «практически нетоксичным».

При однократном внутривенном введении комбинации мексисбел+ГЭК нелинейным белым крысам летальность животных также находилась в зависимости от применявшейся дозы препарата (таблица 4).

Таблица 4 – Летальный эффект смеси мексисбел+ГЭК при однократном внутривенном введении нелинейным белым крысам

Доза, мг/кг	Наблюдавшийся эффект, n погибших животных / n животных в группе	Летальный эффект	
		Проценты	Пробиты
Самцы и самки			
158	0/12	0(1,3) ¹	(2,77) ¹
200	2/12	16,7	4,03

250	4/12	33,3	4,57
316	8/12	66,7	5,43
398	10/12	83,3	5,97
Самцы			
158	0/6	0 (2,4)	(3,02)
200	1/6	16,7	4,03
250	3/6	50,0	5,00
316	4/6	66,7	5,43
398	5/6	83,3	5,97
Самки			
158	0/6	0(0,9)	(2,63)
200	1/6	16,7	4,03
250	1/6	16,7	4,03
316	4/6	66,7	5,43
398	5/6	83,3	5,97

Примечание. ¹В скобках указан «исправленный» процент/пробит эффекта для доз, при которых летальный эффект составлял 0 % или 100 %.

На основании приведенных в таблице 3 данных методом наименьших квадратов были построены графики зависимости «доза – эффект» (рис. 2) и рассчитаны уравнения регрессии для них.

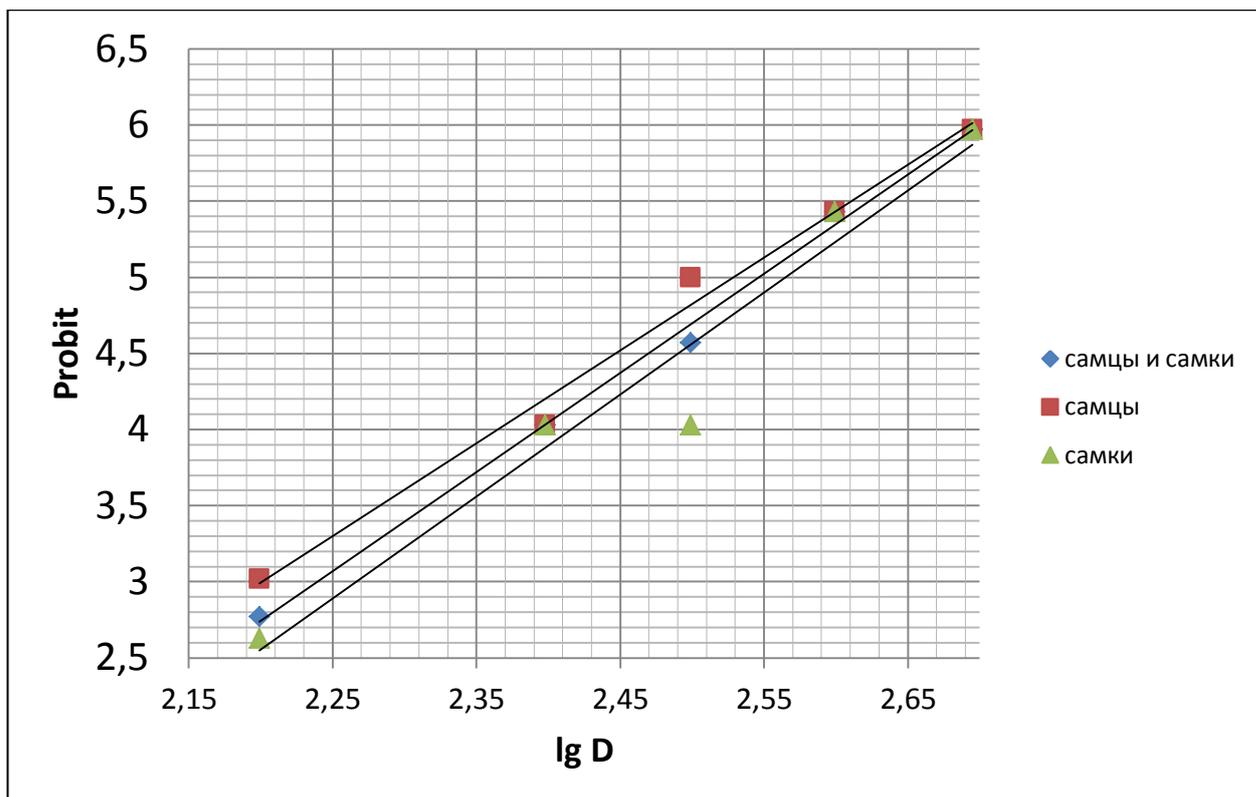


Рисунок 2 - Графики зависимости «доза – эффект (летальность)» в логарифмически – пробитных координатах для однократного внутривенного введения комбинации мексибел+ГЭК нелинейным белым крысам.

Уравнение регрессии для нелинейных белых крыс (самцов и самок):

$$\text{Probit} = 7,7961 \cdot \lg D - 14,1523 \quad (r = 0,964; p = 0,008), \quad (4)$$

для самцов нелинейных белых крыс:

$$\text{Probit} = 7,2889 \cdot \lg D - 12,7992 \quad (r = 0,952; p = 0,013) \quad (5)$$

и для самок нелинейных белых крыс:

$$\text{Probit} = 8,0846 \cdot \lg D - 14,9806 \quad (r = 0,959; p = 0,010), \quad (6)$$

где D – доза мексибел+ГЭК, мг/кг; Probit – летальный эффект, выраженный в пробитах.

Из этих уравнений были рассчитаны среднелетальная доза мексибела в растворе ГЭК для крыс, а также величины доз: характеризующей минимальный эффект гибели животных (пороговая доза – DL_{10}), вызывающей летальный

эффект у большинства подопытных животных (DL_{90}), и минимальной абсолютно смертельной дозы (DL_{99}) (таблица 4).

Таблица 4. – Показатели токсичности смеси мексибел+ГЭК для нелинейных белых крыс при его однократном внутривенном введении.

Показатель	Величина дозы, мг/кг, и ее доверительные границы с 95 %-ной вероятностью		
	Самцы	самки	самцы + самки
DL_{10}	185 (129 ÷ 265)	206 (154 ÷ 276)	196 (148 ÷ 259)
DL_{16}	202 (149 ÷ 274)	223 (172 ÷ 288)	213 (168 ÷ 271)
DL_{50}	277 (225 ÷ 341)	296 (247 ÷ 355)	286 (242 ÷ 337)
DL_{84}	378 (279 ÷ 512)	393 (304 ÷ 508)	383 (302 ÷ 486)
DL_{90}	415 (290 ÷ 593)	426 (318 ÷ 571)	418 (317 ÷ 552)
DL_{99}	578 (328 ÷ 1017)	575 (362 ÷ 914)	570 (370 ÷ 878)

Статистически значимых различий в величинах среднелетальной дозы для самцов и самок нелинейных белых крыс не выявлено. Индекс летальность смеси мексибел+ГЭК для нелинейных белых крыс оказался равен 2,91 (для самцов – 3,12; для самок – 2,79). Коэффициент наклона прямой «доза – эффект» для мексибел+ГЭК составил 1,37 (1,10 ÷ 1,71) для самцов крыс и 1,33 (1,11 ÷ 1,59) для самок (общий показатель 1,34 (1,13 ÷ 1,59)).

Таким образом, по величине среднелетальной дозы при однократном внутривенном введении мексибел+ГЭК нелинейным белым крысам препарат, согласно модифицированной классификацией Организации экономического содействия и развития (OECD), относится к IV классу токсичности веществ и является «малотоксичным».

Аналогичным образом проведено исследование токсичности смеси пентоксифиллина с ГЭК. Смесь также отнесена к IV классу токсичности веществ и является «малотоксичной».

Клиническая часть. Женщин было 23 (27,4%), мужчин 61. Средний возраст составил $48,5 \pm 13,9$ лет. Давность от начала заболевания до госпитализации от 7 до 24 часов у 33,8% пациентов, 21,3% поступили в первые 6 часов после появления болевого приступа. По 3 критерия Рэнсона было у 57 пациентов, 4-5 критериев – у 22, 6 – у пяти. КТ выполнялось не всем пациентам в связи с ограниченными диагностическими возможностями. При тяжелом течении панкреатита у пациентов имелось 7-9 баллов по шкале Baltazar. Пациенты с признаками тяжелого острого панкреатита госпитализировались в ОИТАР, остальные – в общехирургическое отделение. На фоне лечения лекарственными смесями на основе ГЭК нами отмечено быстрое и более значительное снижение уровня амилазы в крови уже к третьим суткам лечения ($p=0,032$), в контрольной группе достоверных изменений не выявлено ($p>0,05$). Также отмечено достоверное снижение маркера цитолиза – аланинаминотрансферазы – к третьим суткам в основной группе ($p=0,018$). В контрольной группе достоверное снижение этого показателя произошло к седьмым суткам лечения ($p<0,05$). В основной группе явления гемоконцентрации к третьим суткам были купированы ($p=0,027$), а к 7 суткам удалось достичь гемодилюции до $Ht < 0,35$ ($p=0,041$).

В основной группе уже к 3 суткам отмечено повышение уровня антиоксидантной защиты. Содержание в плазме крови СОД достоверно превысило нормальный уровень ($p=0,044$) и оставалось высоким до 7 суток. Концентрация МДА к 7 суткам также не отличалась от нормы ($p>0,05$). Кроме того, на 3 сутки выявлено повышение активности каталазы ($p<0,05$), которая не снижалась до 7 суток и по-прежнему была достоверно выше нормальной ($1,78 \pm 0,84$ и $5,068 \pm 1,7$ мкмоль/(мл*мин); $p<0,001$). Оперативное вмешательство потребовалось выполнить у 15 больных (лапароскопия, дренирование брюшной полости и сальниковой сумки – 10, РХПГ + ПСТ – 3, диагностическая лапароскопия – 2). Гнойно-септические осложнения развились у 4 (9,76%) пациентов основной группы, в контрольной группе у 6 (13,95%) пациентов, что

потребовало выполнения открытых вмешательств – вскрытие сальниковой сумки, некрсеквестрэктомия, дренирование брюшной полости. Все гнойно – септические осложнения развились у пациентов с поздними сроками обращения в стационар. В контрольной группе умерло 3 пациента (летальность 6,97%), в основной – один (летальность 2,43%). Применение разработанной схемы лечения позволило сократить длительность пребывания больного в стационаре на $2,1 \pm 0,9$ койко-дней.

Выводы:

1. Введение мексибела и пентоксифиллина в растворе гидроксиэтилкрахмала не увеличивают токсичность по сравнению с чистой субстанцией, указанные смеси относятся к IV и V классу токсичности веществ и являются «малотоксичными» и «практически нетоксичными».
2. Применение антицитокиновых и антиоксидантных средств в смеси с растворами ГЭЖ улучшает результаты лечения острого панкреатита за счет потенцирования антицитокинового и антиоксидантного эффекта и устранения гемоконцентрационных расстройств, а также приводит к уменьшению количества гнойно – септических осложнений на 4,19% и снижению летальности на 4,54%.

ЛИТЕРАТУРА

1. ТКП 12-2008 (02040) «Надлежащая лабораторная практика»: приложение к постановлению Министерства здравоохранения Республики Беларусь, 28.03.2008 г., № 56.
2. Cuthbertson CM, Christophi C. Disturbances of the microcirculation in acute pancreatitis // Br J Surg. – 2006. – №93(5). – P. 518–530.
3. Granger J, Remick D. Acute pancreatitis: models, markers, and mediators // Shock. – 2005. – №24(1). – P. 45–51.

4. Papachristou GI, Papachristou DJ, Avula H. Obesity increases the severity of acute pancreatitis: performance of APACHE-O score and correlation with the inflammatory response // Pancreatology. – 2006. – №6(4). – P. 279–285.

Автор:

Павел Сергеевич Неверов, ассистент 1-й кафедрой хирургических болезней
БГМУ

Neverov P.S.

Г. Дзержинск, ул. Первомайская, д.28, индекс 222720

e-mail: pavelmedic@yandex.ru

тел. +375296627582; +375297700071