

На правах рукописи

ШИМУНОВ Герман Яковлевич

Особенности изменения метаболических процессов в крови, печени и миокарде на разных стадиях острого экспериментального панкреатита и их коррекция

03.00.04-биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата медицинских наук

Ростов-на-Дону
2006

Работа выполнена в Государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Ростовский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию»

Научный руководитель: Доктор биологических наук, профессор
Микашинович Зоя Ивановна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Внуков Валерий Валентинович

доктор медицинских наук, профессор
Терентьев Владимир Петрович

Ведущая организация: **Ростовский научно-исследовательский институт акушерства и педиатрии**

Защита состоится «03» 11 2006 г. В 12 час. на заседании диссертационного совета Д 208.082.01 при ГОУ ВПО Ростовском государственном медицинском университете (344022, г. Ростов-на-Дону, Нахичеванский пер., 29)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГОУ ВПО Ростовского государственного медицинского университета

Автореферат разослан «01» 10 2006 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета, профессор

Н.Я. Корганов



Общая характеристика работы.

Актуальность темы.

В последнее десятилетие отмечен неуклонный рост частоты заболеваний поджелудочной железы (ПЖ) во всех индустриально развитых странах. По данным статистики на 10000 населения Земли 1 человек страдает патологией ПЖ (Н.Б. Губергриц, Л.А. Штода, К.Ю. Линевская и др., 1999; Н.А. Яицкий, В.М. Седов, Р.А. Сопия, 2003).

Ведущая роль в структуре заболеваний ПЖ принадлежит панкреатитам. На протяжении жизни одного врачебного поколения острый панкреатит (ОП) из заболевания казуистически редкого стал едва ли не самой частой формой «острого живота», уступая лишь аппендициту и холециститу (В.М. Лащевкер, 1982). Хронический панкреатит по данным разных авторов занимает до 9% от всех заболеваний пищеварительной системы у человека.

В современной панкреатологии проблема диагностики острого панкреатита - одна из наиболее сложных и актуальных. Панкреанекроз, имевший в начале прошлого века славу одной из наиболее внушительных катастроф в брюшной полости, до настоящего времени остаётся заболеванием с непрогнозируемым исходом (С.А. Шалимов, М.Е. Нечитайло, А.И. Панков, 1992; В.С. Савельев, В.А. Кубышкин, 1993). В последнее время отмечается неуклонное возрастание частоты острого панкреатита в структуре хирургической патологии органов брюшной полости (В.И. Филин, А.Л. Костюченко, 1994; Н.Б. Губергриц, Т.Н. Христич, 2000). Благодаря современным методам диагностики, лечения и профилактики, летальность при ОП в последние годы снизилась до 6 - 21%, однако, при деструктивных формах ОП эта цифра стабильно составляет 50 - 85% (Б.И. Альперович и др., 1991; Б.С. Граков и др., 1992; И.Ф. Сырбу и др., 1993; В.И. Филин, А.Л. Костюченко, 1994; Н.Б. Губергриц, Т.Н. Христич, 2000). А если учесть, что по современным данным на долю деструктивных панкреатитов приходится примерно 20% от всех случаев ОП (С.З. Бурневич, Б.Р. Гельфанд, Б.Б. Орлов, Е.Ц. Цыденжапов, 2000), то эта цифра становится весьма ощутимой. Среди выживших больных у 73% возникает стойкая утрата трудоспособности, что придаёт данной проблеме неоспоримую социальную значимость, поскольку пик заболеваемости приходится на людей в возрасте 30 — 50 лет, то есть находящихся в активном трудоспособном возрасте (С.А. Шалимов, А.П. Радзиховский, М.Е. Нечитайло, 1990; Н.А. Яицкий, В.М. Седов, Р.А. Сопия, 2003).

Несмотря на существенные успехи в разработке факторов патогенеза ОП, многие вопросы остаются спорными, в том числе оценка роли биохимических механизмов развития данного заболевания. Известно, что в периоды обострения воспалительного процесса в поджелудочной железе происходит активация перекисного окисления липидов (ПОЛ), хотя до конца не ясна причина повышения интенсивности ПОЛ и его место в структуре факторов, повреждающих панкреатиты (А.А. Гольдберг, 1987; О.Б. Любичкий, Б.В. Давыдов, И.В. Ельцинский и др., 1998; Д.Б. Демин, 2000). Большинство учёных считает, что причиной интенсификации ПОЛ при данной патологии являются активированные фагоциты, продуцирующие активные формы кислорода (K. Kusterer, 1995; E. Folch, D. Closa, N. Prats et al., 1998; V. Poch, F. Gansauge, B. Rau et al., 1999). До настоящего времени уделялось мало внима-

ния влиянию NO' , вырабатываемого фагоцитами, на метаболизм в ткани ПЖ при панкреатитах. Учитывая широкий спектр биологических эффектов NO' , таких как регуляция сосудистого тонуса, адгезия и агрегация тромбоцитов, передача межнейронального сигнала, проапоптогенное и бактерицидное действие (И.Ю. Малышев, 1997; А.Ф. Ванин, 2000; К.Г. Гуревич, 2000; С.Я. Проскуряков, СИ. Бикетов, 2000) данные исследования могут оказаться полезными для понимания патогенеза изучаемого заболевания. Обсуждается роль протеолитических ферментов, липазы, фосфолипазы, а также ряда других факторов в активации ПОЛ (Л.А. Локшина, 1979; А.А. Андреев, 1999; А.В. Охлобыстин, 1999; Н.Б. Губергриц, Г.М. Лукашевич, Ю.А. Загоренко и др., 2000; В.С. Тарасенко и др. 2000; Э.В. Луцевич, 2001).

Особый интерес представляет функциональное состояние различных органов и систем при панкреатитах. Выявлена взаимосвязь патологии печени, почек, миокарда, лёгких и других органов с воспалением ПЖ (Г.П. Гидирим, 1980; В.И. Ковальчук, 1982; В.М. Лашевкер, 1990; С.А. Шалимов, А.П. Радзиховский, М.Е. Ничитайло, 1990; И.П. Верещагин, 1996; И.А. Криворучко, 1996; T. Arita, N. Matsunaga, K. Tanako et al., 1999; K.J. Morteale, P.J. Mergo, H.M Taylor, 2000). Во всех этих работах недостаточно внимания уделяется молекулярным аспектам и патогенетической взаимосвязи между патологией ПЖ и поражением других органов.

В связи с тем, что в последнее время начинают широко применять и рекламировать употребление препаратов цинка в больших дозировках при различных заболеваниях, мы поставили перед собой цель оценить влияние высоких терапевтических доз сульфата цинка на крыс с острым экспериментальным панкреатитом. Обмен цинка при панкреатитах и влияние цинксодержащих препаратов на течение данного заболевания остаётся малоизученным. Исходя из того, что цинк используется в биосинтезе инсулина, входит в состав карбоангидразы, тканевой коллагеназы, лейцинаминопептидазы, карбоксипептидаз, супероксиддисмутазы, а также участвует в синтезе гема, который входит в структуру гемоглобина, цитохромов, каталазы, миелопероксидазы, NO' -синтазы (Е.В. Печеникова, 1997; А.В. Кудрин, 1998; К.Г. Гуревич, 2002; Л.В. Авдеева, С.А. Воробьёва, 2003; Л.Е. Андрианова, С.Н. Силюянова, 2003; В.А. Голенченко 2003), исследования связанные с данным микроэлементом при воспалительном процессе в ПЖ представляются своевременными и необходимыми для повышения эффективности патогенетической терапии.

Наряду с медикаментозным лечением, нельзя игнорировать и физические методы терапии. Одним из прогрессивных и наиболее интересных в научном плане физиотерапевтических приборов на данный момент является СКЭНАР — самоконтролирующий энергонейроадаптивный регулятор, оказывающий импульсное электротерапевтическое воздействие на организм через нервные окончания кожных покровов. Нам представляется важным проверить эффективность СКЭНАР-терапии на модели острого экспериментального панкреатита (ОЭП), так как его действие направлено на нормализацию нарушенных функций и оптимизацию гомеостаза. При этом известно, что эффективность методов лечения зависит не только от патогенеза заболевания, но и индивидуальных особенностей организма.

Цель исследования:

На основании исследования основных биохимических параметров, характеризующих функциональное состояние клеток крови, печени и миокарда, выяснить степень их вовлечения в патологический процесс на разных стадиях ОЭП и определить возможность коррекции метаболических сдвигов цинк-содержащими препаратами, а также оценить эффективность СКЭНАР-терапии при ОП.

В соответствии с целью исследования были поставлены следующие **задачи**:

1. Отработать удобную и эффективную модель экспериментального острого панкреатита на крысах и определить выраженность деструктивных процессов в ПЖ по показателям активностей ферментов-маркёров цитолиза и морфологическим изменениям.
2. На основании исследования газотранспортной функции эритроцитов, направленности гликолитических процессов в эритроцитах и исследуемых органах оценить степень тканевой гипоксии.
3. Исследовать уровень активности ферментов антиоксидантной защиты в эритроцитах, печени и миокарде крыс при экспериментальном ОП.
4. Оценить метаболическую активность лейкоцитов по данным активности миелопероксидазы и продукции *NO*'.
5. Выяснить эффективность корректирующего влияния цинк-содержащих препаратов и СКЭНАРа на анализируемые метаболические сдвиги.

Научная новизна.

Установлена связь между ОП, функциональным состоянием клеток крови, печени и миокарда, показана роль продукции оксида азота лейкоцитами в патогенезе ОП. Впервые разработана схема коррекции выявленных метаболических нарушений с помощью СКЭНАРа и цинк-содержащих препаратов. Выявлены сроки вовлечения миокарда, печени и эритроцитов в патологический процесс у лабораторных животных. Показано изменение антиоксидантного спектра при ОП в эритроцитах, печени и миокарде. Установлено наличие тканевой гипоксии и компенсаторных процессов у лабораторных животных в динамике заболевания. Исследована активность КФК-МВ у экспериментальных животных с травматической моделью ОП.

Научно-теоретическая и практическая значимость работы.

Полученные данные могут быть использованы в своевременной профилактике печёночных и, что особенно важно, сердечных осложнений. На основании выявленных молекулярных изменений в различных органах и крови уточнена патогенетическая картина формирования экспериментального панкреатита. Выявленные закономерности ранних метаболических сдвигов позволяют отобрать наиболее чувствительные параметры для своевременного прогнозирования тяжести процесса и формирования патогенетически обоснованной программы лечения.

Апробация работы и публикации.

Основные положения диссертации представлены на Четвёртой конференции гастроэнтерологов южного федерального округа (Кисловодск, 2004), IV Научной сессии РостГМУ (Ростов-на-Дону, 2004), Одиннадцатой российской гастроэнтерологической неделе (симпозиум РОЭПС) (Москва, 2005), конференции «Активные формы кислорода, оксид азота, антиоксиданты и здоровье человека» (Смоленск, 2005), доложены на 58-й Итоговой научной конференции студентов, молодых ученых и специалистов РостГМУ (2004), 59-й Итоговой научной конференции студентов, молодых ученых и специалистов РостГМУ (2005), Четвёртой межвузовской международной научно-практической конференции студентов, молодых учёных и специалистов «Обмен веществ при адаптации и повреждении» (Ростов-на-Дону, 2005), Пятой межвузовской международной научно-практической конференции студентов, молодых учёных и специалистов «Обмен веществ при адаптации и повреждении» (Ростов-на-Дону, 2006).

По теме диссертации опубликовано 12 работ, из них 2 в центральной печати. Оформлена заявка на изобретение «Способ моделирования острого некротического панкреатита» № 2005116418/14(018744). Получено решение о выдаче патента на изобретение (06. 05. 2006).

Основные положения, выносимые на защиту.

1. При ОЭП в 1 - 3 сутки наблюдаются депрессия биоантиоксидантных ферментов и снижение уровня восстановленного глутатиона в миокарде и эритроцитах крыс, достигающие наибольшей выраженности к месячному сроку.
2. В печени крыс с ОП выявлено достоверное увеличение активности каталазы, супероксиддисмутазы, глутатионредуктазы и концентрации восстановленного глутатиона, что указывает на активацию антиоксидантной защиты клетки.
3. Увеличение синтеза оксида азота фагоцитами и усиление миелопероксидазной активности плазмы в динамике ОЭП свидетельствует об активации антибактериальной функции лейкоцитов.
4. Дозировки сульфата цинка, превышающие физиологические концентрации, неблагоприятно влияют на антиоксидантный статус эритроцитов и функциональное состояние миокарда при ОЭП.
5. После воздействия аппаратом СКЭНАР регистрируется уменьшение выраженности тканевой гипоксии крыс с ОП, а также снижается выраженность деструктивных процессов в тканях миокарда и печени.

Объём и структура диссертации. Диссертация изложена на 148 страницах машинописного текста, иллюстрирована 32 таблицами и 28 рисунками. Диссертация состоит из введения, обзора литературы (глава № 1), общей характеристики материала и методов исследования (глава № 2), изложения полученных результатов (главы № 3, № 4, № 5, № 6, № 7), обсуждения полученных результатов, выводов, практических рекомендаций и библиографического списка, включающего 281 источник, в том числе 130 отечественных и 151 зарубежных.

Содержание работы.

Материалы и методы исследования.

Эксперимент проводили на белых беспородных крысах обоего пола с соблюдением правил, предусмотренных Европейской комиссией по надзору за проведением лабораторных и других опытов с участием экспериментальных животных разных видов. Крысы находились в стандартных условиях с естественной сменой освещения и соблюдением общевиарийного рациона. У всех животных был свободный доступ к пище и воде.

Для моделирования ОП животным экспериментальной группы под эфирным наркозом проводили срединную лапаротомию, выделяли ПЖ и вводили в её толщу 0,2 мл 1% раствора тритона-Х-100 по принципу метода, предложенного Э.С. Гульянц с соавторами (авторское свидетельство № 1327152 от 01. 04. 1987 г.; Ю.А. Калмыкова, 1991). Операционную рану затем зашивали послойно наглухо. Контрольная группа состояла из двух подгрупп: интактные и животные, которым была сделана только лапаротомия - ложно оперированные крысы (ЛО). Определение показателей проводили на первые, третьи, десятые сутки и через месяц.

Изменения в ткани ПЖ, трактуемые как ОП, подтверждены гистологическим исследованием, проведённым на базе морфологического центра Рост ГМУ. Для гистологического исследования кусочки ПЖ экспериментальных крыс фиксировались в 10% растворе нейтрального формалина. Парафиновые срезы окрашивались гематоксилином-эозином. Забор материала проводился через 3, 10 и 30 суток после введения тритона-Х-100 в ткань ПЖ.

Для определения влияния сульфата цинка на метаболические процессы в крови крыс ежедневно с момента моделирования ОП поили водным раствором сульфата цинка; сульфат цинка очень легко растворим в воде, после приёма внутрь цинк хорошо абсорбируется в тонкой кишке (до 60% всасывается в 12-перстной кишке и около 20% - в тощей и подвздошной) (М.Д. Машковский, 2002; «Лекарственные препараты в России: Справочник Видаль», 2003). Каждая крыса из группы коррекции получала 1 мг препарата в сутки, что в перерасчёте на человека массой 70 кг составляет 300 мг.

С целью исследования влияния СКЭНАР-терапии на метаболические сдвиги у лабораторных животных с ОП сконструирована специальная клетка (профессор, д.м.н. А.В. Тараканов), благодаря которой можно воздействовать импульсными токами данного аппарата (ОКБ «Ритм» СКЭНАР 97.4 PDS) на внутреннюю поверхность лапок крыс, подбирая необходимую энергию воздействия, не вызывающую болевого шока у животных при частоте 60 Гц. СКЭНАР-терапия проводилась ежедневно (однократно - 15 минут) на протяжении 10 дней, начиная с 1-го дня после введения тритона-Х-100 в ПЖ крыс.

В указанные сроки после моделирования ОП производили декапитацию лабораторных животных с целью получения крови. Гепаринизированную кровь разделяли на плазму, эритроциты и лейкоциты.

Для исследования биохимических показателей в органах экспериментальных животных сразу после декапитации производили вскрытие брюшной полости и грудной клетки, извлекали печень и миокард для приготовления гомогенатов,

предварительно отмыв органы физиологическим раствором от крови. Перед гомогенизированием органы крыс сразу же помещались на лёд и стандартизовались по весу. Гомогенаты тканей готовили с холодным физиологическим раствором в соотношении 1:10, после чего производилось центрифугирование (5 минут со скоростью 1500 оборотов в минуту) для осаждения грубых частиц тканей и получения рабочих супернатантов. Для решения планируемых задач исследования использованы следующие методы:

1. Оценка состояния газотранспортной функции эритроцитов и выраженности гипоксии:
 - определение 2,3-дифосфоглицерата (2,3-ДФГ) по методу Dyse, Vessman в модификации И.С. Лугановой, М.Н. Блинова, 1975 г.;
 - определение молочной кислоты по методу Баркер и Саммерсон в описании МИ. Прохоровой и З.Н. Тупиковой, 1965 г.
2. Определение активности ферментов антиоксидантной защиты:
 - супероксиддисмутазы (СОД) по методу Н.Р. Mistra и J. Fridovich, 1972 г. в модификации, проведенной на кафедре общей и клинической биохимии № 1 РостГМУ;
 - каталазы по методу Королюк и др., 1988 г.;
 - глутатионпероксидазы (ГПО) по методу В.М. Моина, 1986 г.;
 - глутатионредуктазы (ГР) по методу Л.Б. Юсуповой, 1989 г.;
 - определение концентрации восстановленного глутатиона (Г-SH) методом G.L. Ellman, 1959 г.
3. Определение активности маркёров цитолиза:
 - α -амилазы в плазме крови лабораторных животных амилотестическим методом со стойким крахмальным субстратом по Каравею с использованием стандартного набора реактивов «КлиниТест-Альфа-амилаза».
 - активности МВ-фракции креатинфосфокиназы (КФК-МВ) в плазме крови энзиматическим кинетическим иммунологическим методом с использованием стандартного набора реактивов «Ольвекс Диагностикум».
4. Анализ молекулярных механизмов фагоцитоза:
 - активность миелопероксидазы по методу Klebanoff, описанному М.Г. Шафран, С.Н. Лызловой, 1975 г.;
 - продукции NO-радикала (NO') мононуклеарными клетками крови методом Ю.В. Шебзухова и соавт., 1998 г.

Статистическая обработка результатов исследования проводилась согласно общепринятым методам с определением средней арифметической, ошибки средней. Статистическую обработку данных проводили методом вариационной статистики на компьютере IBM, совместимом с использованием специального программного обеспечения (диалоговая статистическая система STADIA 6.0) (А.П. Кулайчев, 1996). Достоверность различий между исследуемыми группами определяли с помощью t-критерия Стьюдента после проверки распределения на нормальность. Статистически достоверными считали отличия, соответствующие величине ошибки достоверности $p \leq 0,05$.

Результаты и их обсуждение.

Метаболические изменения в миокарде при остром панкреатите

Клинические наблюдения и лабораторные данные говорят о том, что при ОП нарушается сердечная деятельность. Но поражения происходят на различном уровне - у одних больных всё ограничивается функциональной недостаточностью с изменениями только на ЭКГ, у других же пациентов в процессе ОП на поздних этапах его течения возникают осложнения в виде тяжёлых органических поражений миокарда. Вопрос о причинах нарушения сердечной деятельности и способах её предотвращения при ОП остаётся открытым. Важными на наш взгляд являются вопросы профилактики органических поражений миокарда у больных с ОП на ранних этапах заболевания.

По результатам наших исследований уровень активности антиоксидантных ферментов в миокардиоцитах крыс с ОП достоверно снижается, начиная уже с 1 — 3-х суток после моделирования данного заболевания. И по мере увеличения сроков продолжает снижаться. Через месяц у крыс с ОП активность каталазы снижается на 82.14% ($p \leq 0.05$) по сравнению с ЛО животными. Активность СОД и ГР через месяц снижается на 78.31% ($p \leq 0.05$) и 67.77% ($p \leq 0.05$) соответственно. Наряду с этим, активность ГПО в миокардиоцитах возрастает. Такие изменения в системе глутатионовых ферментов приводят к уменьшению содержания восстановленного глутатиона в миокарде крыс с ОП, уровень которого уже через сутки после моделирования ЭОП падает на 16.38% ($p \leq 0.05$) по отношению к ЛО и остаётся пониженным до месячного срока. Учитывая современные представления о вкладе восстановленного глутатиона в детоксикационную функцию организма и роль эндогенной интоксикации в патогенезе острого панкреатита, данные изменения могут привести к серьёзным последствиям и нарушению функции миокарда при данной патологии. Важно отметить, что снижение Г-SH может привести к угнетению активности КФК-MB, поскольку активность КФК зависит от присутствия свободных сульфгидрильных групп (Дж. Уилкинсон, 1968).

Метаболические изменения в печени при остром панкреатите

По сравнению с миокардиоцитами гепатоциты находятся в более выгодном положении - они имеют наиболее развитую систему детоксикации и антиоксидантной защиты. Но, с другой стороны, кровь от ПЖ оттекает в систему воротной вены и, таким образом, через печень проходят огромные количества токсинов и поражающих агентов при ОП. Активные ферменты ПЖ и образующиеся токсины в процессе ОП проходят через печень, попадая в ней через портальную и лимфатическую системы, а также через жёлчные пути, оказывая влияние на микроструктуру и функцию этого органа.

Изменения активности каталазы и СОД у крыс опытной группы по отношению к ЛО односторонне направлены вплоть до месячного срока. Активность СОД к 3-м суткам достоверно повышается на 46.72% ($p \leq 0.05$), а активность каталазы достоверно стимулируется уже к 1-м суткам на 45.41% ($p \leq 0.05$) и к 3-м суткам на 78.17% ($p \leq 0.05$). К 10-м суткам активность этих ферментов приближается к показателям у интактных крыс. К месячному же сроку активность каталазы

остаётся практически такой же, а активность СОД достоверно падает ниже уровня данного фермента у интактных животных на 18.76% ($p \leq 0.05$).

Наиболее выраженные сдвиги в системе глутатионовых ферментов и содержании восстановленного глутатиона в печени крыс происходят на ранних сроках развития ОП, особенно на 3-й сутки после моделирования ОП. Содержание Г-SH к данному сроку возрастает на 33.06% ($p \leq 0.05$) по отношению к ЛО крысам. Активность ГР возрастает к 3-им суткам на 23.03% ($p \leq 0.05$). Активность ГПО печени экспериментальных крыс с ОП по отношению к ЛО остаётся достоверно сниженным вплоть до 10-х суток: на 48.30% ($p \leq 0.05$) к 1-м суткам, на 53.59% ($p \leq 0.05$) к третьим суткам и на 35.37% ($p \leq 0.05$) к 10-тидневному сроку. Через месяц после моделирования ОП все вышеперечисленные показатели возвращаются к исходным величинам, получаемым у контрольной группы.

Метаболические изменения в крови при остром панкреатите

Особенностью гликолиза в эритроцитах является наличие шунта, приводящего к образованию 2,3-ДФГ - аллостерического регулятора сродства гемоглобина к кислороду.

Содержание 2,3-ДФГ и молочной кислоты в эритроцитах ЛО крыс по сравнению с интактными крысами достоверно не различается. Уровень 2,3-ДФГ в эритроцитах крыс с ОП остаётся повышенным на протяжении всего эксперимента с максимумом на 3-й сутки: в 1-е сутки содержание 2,3-ДФГ достоверно возрастает на 26.35% ($p \leq 0.05$), к 3-м суткам - на 96.55% ($p \leq 0.05$), к 10-м и 30-м суткам - соответственно на 59.09% ($p \leq 0.05$) и 43.74% ($p \leq 0.05$). При этом содержание лактата на ранних сроках эксперимента у крыс с ОП остаётся приближенным к показателям контрольной группы и, начиная с 10-х суток, достоверно возрастает: через 10 дней на 54.74% ($p \leq 0.05$) и через месяц на 94.56% ($p \leq 0.05$). Нужно отметить, что повышение содержания лактата в эритроцитах экспериментальных животных с ОП происходит на фоне снижения уровня 2,3-ДФГ, хотя его содержание остаётся достоверно повышенным по сравнению с ЛО животными.

Полученные данные показывают, что в ответ на развившуюся гипоксию возникает компенсаторная реакция со стороны клеток красной крови в виде повышения синтеза 2,3-ДФГ, играющего адаптационную роль, уменьшая сродство гемоглобина к кислороду, что облегчает переход кислорода в клетки тканей.

Таким образом, полученный материал свидетельствует о развитии компенсаторно-приспособительной реакции у крыс с экспериментальным ОП.

Интересно отметить, что в эритроцитах, для которых бескислородное окисление глюкозы - единственный способ получения энергии, активизируется анаэробный гликолиз, о чём можно судить по содержанию молочной кислоты в этих клетках. Если клетки начинают усиленно продуцировать лактат, это является свидетельством, что они испытывают кислородное голодание. Аналогичная же динамика лактата в случае с эритроцитами на наш взгляд отражает активацию гликолиза для усиленного синтеза 2,3-ДФГ, необходимого для снижения гипоксии, и активизации пентозофосфатного шун-

та с целью защиты собственной мембраны и гемового железа от активных форм кислорода. Таким образом, реакция эритроцитов на развитие ОП в виде усиленного образования лактата можно расценивать как интенсификацию метаболических процессов в этих клетках, а также как отражение генерализованной гипоксии в организме.

Антиоксидантная система эритроцитов крыс с ОП страдает, начиная уже с первых-третьих суток эксперимента. Наблюдается депрессия биоантиоксидантов - каталазы и СОД - на протяжении всего эксперимента с максимумом, приходящимся на 10 - 30-е сутки. Эритроциты содержат богатые запасы глутатиона, причём 95% приходится на восстановленную форму. В норме практически весь глутатион ассоциирован с форменными элементами крови, а в плазме отсутствует. Из клеток эритроидного ряда самый высокий уровень Г-SH отмечается в ретикулоцитах (М.В. Кения и соавт., 1993; Д.В. Черданцев, Ю.С. Винник, 2002). При ОЭП нарушается метаболизм глутатионовых ферментов и падает концентрация самого Г-SH. Активность эритроцитарной ГР остаётся достоверно сниженной по отношению к ЛО: на 21.88% ($p \leq 0.05$) к 1-м суткам, на 21.20% ($p \leq 0.05$) к 3-м суткам, на 19.29 ($p \leq 0.05$) через 10 дней и на 36.57% ($p \leq 0.05$) через месяц. Сродство к перекиси водорода у ГПО намного выше, чем у каталазы. Учитывая тот факт, что место действия ГПО — цитоплазма, в физиологических условиях основная масса перекиси водорода, образующейся в процессе жизнедеятельности эритроцитов, разрушается ГПО, а при патологическом возрастании концентрации перекиси водорода её начинает активно разрушать каталаза (Л.Ф. Панченко и соавт., 1981; К. Kothe et al., 1975). Активность эритроцитарной ГПО у экспериментальных крыс с ОП по сравнению с ЛО на протяжении всего эксперимента остаётся достоверно сниженной: на 7.98% ($p \leq 0.05$), 10.31% ($p \leq 0.05$), 11.11% ($p \leq 0.05$) и 8.45% ($p \leq 0.05$) соответственно через 1, 3, 10 и 30 суток. Причём наиболее выраженное снижение соответствует 10-м суткам.

Известно, что в периоды обострения воспалительного процесса в поджелудочной железе происходит активация ПОЛ, хотя до конца не ясна причина повышения интенсивности ПОЛ и его место в структуре факторов, повреждающих панкреатиты и другие клетки организма (А.А. Гольдберг, 1987; О.Б. Любичкий, Б.В. Давыдов, И.В. Ельшанский и др., 1998; Д.Б. Демин, 2000). Большинство учёных считает, что причиной интенсификации ПОЛ при данной патологии являются активированные фагоциты, продуцирующие активные формы кислорода (К. Kusterer, 1995; E. Folch, D. Closa, N. Prats et al., 1998; V. Poch, F. Gansauge, V. Rau et al., 1999). До настоящего времени уделялось мало внимания фагоцитарному NO' в патогенезе ОП. Острое воспаление ПЖ - это процесс, в который вовлекается практически весь организм. Известно, что цитокины и другие медиаторы воспаления стимулируют продукцию NO' макрофагами, моноцитами, гладкомышечными клетками.

Усиленная выработка NO' активными фагоцитирующими клетками у крыс с ОЭП наблюдалась на протяжении всего экспериментального периода с максимумом, приходящимся на 1 месяц: в 1-е сутки продукция NO' возрастает на 31.73% ($p \leq 0.05$), к 3-м суткам - на 23.91% ($p \leq 0.05$), через 10 дней - на 29.80% ($p \leq 0.05$) и через месяц - на 56.43% ($p \leq 0.05$). Образовавшийся NO' в

условиях оксидативного стресса, имеющего место при ОП, с наибольшей скоростью реагирует с супероксидным анионом и переходными металлами: гемовыми комплексами железа и меди, железосерными структурами. Реакция NO' с супероксидом протекает с большой скоростью, при этом образуется пероксинитрит - высокореакционное вещество. Учитывая повышенную активность фагоцитирующих клеток при ОЭП через 10 суток и 1 месяц после моделирования заболевания, а также депрессию основных антиоксидантных ферментов эритроцитов, можно предположить формирование всех вышеперечисленных факторов агрессии (взаимодействие NO' и супероксидного аниона с образованием пероксинитрита и вытекающими из этого последствиями, образование метгемоглобина).

По нашим данным лейкоциты при ОЭП усиливают свою активность не только в отношении синтеза NO' (активация макрофагальной NO' -синтазы), но также и МПО, при участии которой катализируется реакция с образованием гипохлорит-ионов, обладающих бактерицидным действием. Исходя из того, что в нашем случае ОЭП был условно асептическим, повышение активности МПО у животных с ОП говорит в пользу мнения некоторых авторов, которые считают, что даже в случае асептического ОП возникает интоксикация условно-патогенной микрофлорой или продуктами их жизнедеятельности (В.С. Тарасенко, В.И. Никитенко, В.А. Кубышкин, 2000; L. Gianotti, M. Braga, J.W. Alexander, 1995). Активность МПО достоверно повышается на 10-е сутки в плазме животных с ОЭП по отношению к ЛО на 36.36% ($p \leq 0.05$) и через месяц на 70.56% ($p \leq 0.05$).

В плазме крови животных с ОЭП определяются такие маркеры цитолиза, как α -амилаза и КФК-МВ. Исследование на α -амилазу является стандартным и общепринятым при ОП. В наших исследованиях активность α -амилазы плазмы крови крыс с ОЭП по отношению к ЛО животными достоверно повышается на 47.68% ($p \leq 0.05$) к 1-м суткам, на 67.20 % ($p \leq 0.05$) к 3-им суткам и на 36.69% ($p \leq 0.05$) через 10 дней. К месячному сроку активность α -амилазы снижается, хотя остаётся повышенной по отношению к контрольной группе на 20.95% ($p > 0.05$), что свидетельствует об усилении повреждения ткани ПЖ и потери ею большого процента своей функциональной активности. Действительно, на снимках гистологических препаратов ПЖ крыс с ОП месячного срока видно замещение очагов некроза грануляционной тканью.

Определение активности КФК-МВ в плазме крови экспериментальных животных позволило составить нам более достоверную картину о состоянии миокарда при данной патологии. Активность данного фермента достоверно повышается на 10-е сутки после моделирования ОП на 46.67% ($p \leq 0.05$) по сравнению с ЛО животными. Максимальное повышение активности КФК-МВ в плазме крови крыс с ОП наблюдается к месячному сроку и составляет 106.25% ($p \leq 0.05$) по сравнению к ЛО крысам. На 1-е и 3-й сутки от начала эксперимента у крыс с ОП также наблюдается тенденция к повышению данного фермента в плазме крови по отношению к ЛО на 15.21% ($0.05 < p < 0.1$) и 16.39 ($p > 0.05$) соответственно. Полученные данные (в том числе и полученная информация об антиоксидантной обеспеченности миокардиоцитов на разных стадиях ОЭП), свидетельствуют о том, что миокард вовлекается в

патологический процесс, начиная уже с 1-х суток после моделирования ОП.

Влияние сульфата цинка на метаболические процессы в крови при остром панкреатите

В рамках данной работы проводилась коррекция ОЭП крыс сульфатом цинка и СКЭНАРОм. Исследования проводились на 10-е сутки после моделирования заболевания, поскольку на данном этапе эксперимента выявлены наиболее значимые изменения определяемых показателей у крыс с ОЭП по сравнению с ЛО животными.

Цинк (Zn) относится к группе незаменимых микроэлементов наряду с железом (Fe), йодом (I), медью (Cu), марганцем (Mn), кобальтом (Co), молибденом (Mo), селеном (Se), хромом (Cr) и фтором (F). Его регулярное поступление с пищей или водой в организм абсолютно необходимо для нормальной жизнедеятельности. По современным представлениям цинк входит в состав более 300 металлоферментов, витаминов, гормонов и других биологически активных веществ, что говорит о его участии практически во всех видах обмена веществ в организме млекопитающих. В дозировке до нескольких мг цинк входит во многие витаминные, минеральные и смешанные комплексы. В последнее время стали появляться лекарственные средства, представляющие собой монопрепараты цинка в виде его солей (чаще сульфат или окись) в высоких дозировках (в среднем 150 мг), которые рекомендуют принимать по 2-3 раза в день, в том числе и при патологии желудочно-кишечного тракта, включая патологию ПЖ. Такое количество цинка, несопоставимо с физиологической потребностью человеческого организма; в норме человеку требуется потреблять с пищей около 15 мг цинка в сутки, из которых примерно 10 мг выводится из организма) (М.Д. Машковский, 2002; Е.В. Печеникова, В.В. Вашкова, Е.А. Можаяев, 1997; К.Г. Гуревич, 2002; Е.В. Ших, 2004). В данной работе представлены результаты исследования влияния доз сульфата цинка, превышающих физиологические потребности, на метаболические процессы в крови у крыс с ОЭП.

У крыс с ОП, получавших сульфат цинка уровень 2,3-ДФГ возрос на 37.87% ($p > 0.05$) по сравнению с животными, не получавших данный препарат. Эти сдвиги происходят на фоне повышенного содержания молочной кислоты в эритроцитах: у крыс с ОП, получавших сульфат цинка содержание лактата практически не отличается от такового у крыс, не получавших препарат. Данные сдвиги говорят в пользу прогрессирующей гипоксии животных с ОЭП.

Цинк считается микроэлементом с антиоксидантными свойствами (входит в состав СОД, участвует в синтезе каталазы) (Е.В. Печеникова, 1997, Кудрин А.В., 1998; К.Г. Гуревич, 2002). Высокие терапевтические дозы цинка угнетают активность эритроцитарной СОД у крыс в наших исследованиях. Соответственно у пролеченных крыс отмечается возрастание активности каталазы - на 35.82% ($p \leq 0.05$) по сравнению с экспериментальными крысами, не получавшими препарат.

Содержание Г-SH, а также активность зависимых от него ферментов у крыс, получавших сульфат цинка, по сравнению с больными животными, не получавшими данный препарат, достоверно не изменялись, оставаясь сниженными.

Активность α -амилазы в плазме крови у крыс с ОП, получавших сульфат

цинка на 42.2 % ($p \leq 0.05$) превышает таковую у нелеченых крыс.

Активность КФК-МВ в плазме крови крыс с ОП повышается после приёма сульфата цинка на 34.26% ($p \leq 0.05$).

У крыс, пролеченных сульфатом цинка, активность МПО снижается на 55.36% ($p < 0.05$) по сравнению с экспериментальными животными, не получавшими этот препарат. Изменения в продукции NO' лейкоцитами крыс с ОП, получавших сульфат цинка, происходят аналогично МПО. У крыс, пролеченных сульфатом цинка, отмечается снижение синтеза NO' по отношению к крысам, не получавшим данный препарат, на 56.72% ($p \leq 0.05$).

Влияние СКЭНАРа на метаболические процессы в крови при остром панкреатите

СКЭНАР - аббревиатура способа воздействия на организм человека и название прибора (самоконтролируемая энергонеуроадаптивная регуляция; самоконтролирующий энергонеуроадаптивный регулятор). СКЭНАР осуществляет воздействие на участки кожи электрическим током и в этом смысле является методом электролечения. В 1991 г. комитет по новой медицинской технике Минздрава СССР рекомендовал прибор СКЭНАР и СКЭНАР-терапию к широкому применению в качестве нового уникального высокоэффективного метода импульсной электротерапии, нормализующего физиологические системы организма; восстанавливающего утраченные функции, активизирующего резервы организма, проводящего реставрационные работы в организме.

Содержание 2,3-ДФГ в эритроцитах крыс с ОП, подвергшихся воздействию СКЭНАРа на 10-е сутки после моделирования данного заболевания, достоверно снижается на 35.86% ($p \leq 0.05$) по сравнению с экспериментальными крысами, не пролеченными этим аппаратом.

Аналогичная тенденция наблюдается в изменении содержания эритроцитарного лактата, которое достоверно снижается на 33.99% ($p \leq 0.05$) у пролеченных крыс по сравнению с животными, не получавшими лечения СКЭНАРом. Полученные данные свидетельствуют в пользу уменьшения кислородного голодания экспериментальных животных с ОП.

После воздействия СКЭНАРом на крыс с ОП, у этих животных по отношению к не пролеченным экспериментальным крысам, активность СОД и каталазы повышалась на 34.10% ($p \leq 0.05$) и 45.42% ($p \leq 0.05$) соответственно, активность глутатионовых ферментов достоверно не изменялась и содержание Г-SH возрастало на 35.69% ($p \leq 0.05$), что свидетельствует о восстановлении активности антиоксидантных ферментов в эритроцитах экспериментальных крыс с ОП.

После воздействия на экспериментальных крыс с ОП СКЭНАРом активность α -амилазы в их плазме возросла на 23.02% ($p \leq 0.05$), активность КФК-МВ снизилась на 20.07% ($p \leq 0.05$) и активность МПО снизилась на 11.60% ($p > 0.05$). Воздействие СКЭНАРа на лабораторных животных с ОП не вызвало достоверных изменений в продукции NO' фагоцитами по сравнению с не пролеченными экспериментальными животными.

Выводы.

1. В сердечной мышце уже с 1-х суток ЭОП наблюдаются депрессия биоантиоксидантных ферментов и снижение уровня восстановленного глутатиона, достигающие наибольшей выраженности к месячному сроку.
2. Накопление в сердечной мышце молочной кислоты, начиная с десятых суток, а также увеличение активности КФК-МВ в плазме крови экспериментальных животных указывает на развитие тканевой гипоксии и синдрома цитолиза.
3. В печени крыс с ОП выявлено достоверное увеличение активности каталазы, супероксиддисмутазы, глутатионредуктазы и концентрации восстановленного глутатиона с первых суток эксперимента, что указывает на сдвиги метаболизма компенсаторной направленности.
4. В эритроцитах уже с первых-третьих суток развития ОЭП происходит депрессия всех исследуемых биоантиоксидантных ферментов и снижение содержания восстановленного глутатиона. Накопление в этот период эритроцитами 2,3-дифосфоглицериновой кислоты на фоне увеличивающегося содержания лактата в миокарде и печени отражает включение модуляционного механизма компенсации развивающейся тканевой гипоксии у крыс с острым панкреатитом. Через месяц после начала моделирования содержание лактата в органах сохраняется высоким на фоне снижения уровня эритроцитарного 2,3-дифосфоглицерата по сравнению с контролем, что отражает нарушение компенсаторных механизмов.
5. Увеличение синтеза оксида азота фагоцитами и усиление активности миелопероксидазы в плазме крови свидетельствует о генерализованной активизации лейкоцитов.
6. Сульфат цинка, угнетая повышенную продукцию NO' и активность МПО, направленно корригирует функциональную активность фагоцитов крови при экспериментальном панкреатите.
7. СКЭНАР-терапия уменьшает выраженность тканевой гипоксии крыс с ОП, об этом свидетельствуют данные газотранспортной функции и антиоксидантный статус эритроцитов. Снижение активности КФК-МВ в плазме крови пролеченных животных отражает уменьшение деструктивных процессов в ткани миокарда.

Практические рекомендации.

1. На основании данных о депрессии глутатион зависимого звена АОЗ при ОЭП целесообразно рассмотреть вопрос о включении в комплексную терапию лекарственных средств, содержащих тиоловую группу.
2. Использование СКЭНАР-терапии в сочетании с применением терапевтических дозировок сульфата цинка способствует снижению выраженности тканевой гипоксии и клеточной деструкции при остром панкреатите.
3. Определение КФК-МВ необходимо включить в лабораторную диагностику обследуемых больных с панкреатитами для своевременного выявления повреждения миокарда.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Шимунов Г.Я., Летуновский А.В., Ветрова Е.В., Положишникова А.А. Состояние газотранспортной функции крови и выраженность гипоксии при остром экспериментальном панкреатите // IV научная сессия РостГМУ. - Ростов-на-Дону, 2004. - С. 136 - 137.
2. Шимунов Г.Я., Летуновский А.В., Положишникова А.А., Павлова Е.Б., Аргун Н.А. Состояние газотранспортной функции крови и антиоксидантной защиты при остром экспериментальном панкреатите // Труды III-й межвузовской международной конференции «Обмен веществ при адаптации и повреждении». - Ростов-на-Дону, 2004. - С. 12-14.
3. Шимунов Г.Я., Пыльцин С, Ильин А., Барина В. Состояние антиоксидантной системы при остром экспериментальном панкреатите // 58-я итоговая научная конференция молодых учёных РостГМУ. - Ростов-на-Дону, 2004. - С. 128.
4. Шимунов Г.Я., Положишникова А, Пыльцин С, Ильин А., Ломбе Д. Оценка выраженности тканевой гипоксии при остром экспериментальном панкреатите // 58-я итоговая научная конференция молодых учёных РостГМУ. - Ростов-на-Дону, 2004. - С. 129.
5. Шимунов Г.Я., Микашинович З.И. Влияние сульфата цинка на антиоксидантную систему крыс с острым экспериментальным панкреатитом // Известия ВУЗов. Сев.-Кавк. регион. Естественные науки. — 2005. - Спецвыпуск «Гастроэнтерология Юга России». - С. 100 - 101.
6. Шимунов Г.Я., Летуновский А.В., Василенко В.С., Опруженков А.В. Острый панкреатит: новый взгляд на старую проблему // Труды IV-й межвузовской международной конференции «Обмен веществ при адаптации и повреждении». - Ростов-на-Дону, 2005. - С. 168-173.
7. Shimunov G.J., Letunovski A.V., Shapovalov A.S., Kuznetsov D.V. NO-production in rat's macrophages with an acute experimental pancreatitis // The materials of the IV international conference between highest educational establishments: «Peculiarities of metabolism at adaptation and alteration». - Rostov-on-Don, 2005. - P. 190.
8. Шимунов Г.Я., Микашинович З.И. Состояние антиоксидантной системы миокарда при остром экспериментальном панкреатите // 4-я национальная научно-практическая конференция с международным участием «Активные формы кислорода, оксид азота, антиоксиданты и здоровье человека». - Смоленск, 2005. - С. 199 - 201.
9. Шимунов Г.Я., Шаповалов А., Кузнецов Д., Василенко В. Макрофагальная продукция оксида азота при остром экспериментальном панкреатите // 59-я итоговая научная конференция молодых учёных Рост-ГМУ. - Ростов-на-Дону, 2005. - С. 72.
10. Шимунов Г.Я., Микашинович З.И. Антиоксидантный статус эритроцитов при остром экспериментальном панкреатите // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. - 2005. - Т. XV, № 5.-С. 66.
11. Шимунов Г.Я. Поджелудочная железа (исторический очерк) // Вестник Гиппократ.-2006.-№ 1 (9).-С. 9-14.
12. Шимунов Г.Я. Патогенез острого панкреатита // Вестник Гиппократ. - 2006.-№1(9).-С.64-70.

Выражаем глубокую благодарность профессору А.В. Тараканову за предоставление аппарата СКЭНАР и возможность проведения экспериментальных исследований.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

2,3-ДФГ	— 2,3-дифосфоглицериновая кислота
КФ	— международная классификация ферментов
КФК	— креатинфосфокиназа; КФК-АТФ: креатинфосфотрансфераза (КФ 2.7.3.2)
КФК-МВ	— МВ-фракция креатинфосфокиназы
ЛО	— ложно оперированные крысы
ОП	— острый панкреатит
ОЭП	— острый экспериментальный панкреатит
ПЖ	— поджелудочная железа
ПОЛ	— перекисное окисление липидов
СКЭНАР	— самоконтролирующий энергонеуроадаптивный регулятор
ГПО	— глутатионпероксидаза (КФ 1.11.1.9)
ГР	— глутатионредуктаза (КФ 1.6.4.2)
Г-SH	— восстановленный глутатион
МПО	— миелопероксидаза (КФ 1.11.1.7)
СОД	— супероксиддисмутаза (КФ 1.15.1.1)