

На правах рукописи



МЕНЬШИКОВА
Надежда Николаевна

**ОБМЕН ГЛИКОЗАМИНОГЛИКАНОВ ПРИ РЕЗАНЫХ РАНАХ
БРЮШНОЙ СТЕНКИ**

03.00.04 – БИОХИМИЯ

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань
2005

Работа выполнена на кафедре клинической биохимии и лабораторной диагностики факультета повышения квалификации и последипломной подготовки Государственного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Ижевская государственная медицинская академия».

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор **Шараев Петр Низамиевич**

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор **Ишмухаметова Диляра Галимовна**

доктор медицинских наук, профессор **Буталин Евгений Германович**

Ведущая организация: Институт физиологии Коми научного центра УрО РАН

Защита состоится 2 июня 2005 г. в 13.00 на заседании диссертационного Совета Д 212.081.08 Казанского государственного университета по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского Казанского государственного университета по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18.

Автореферат разослан « 28 » июня 2005 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

кандидат биологических наук, доцент

 Аскарлова А.Н.

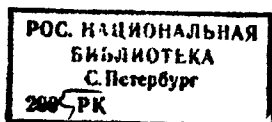
2005-4
45449

2051827

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Рана, или нарушение целостности наружного покрова (кожи, слизистой оболочки), повреждение внутренних органов влечет за собой изменение в обменных процессах соединительной ткани, что отражается на динамике гликозаминогликанов (ГАГ) (Рабинович П.Д., 1988, Мохначева С.Б., 1997, Rayan V. et al., 1998). К сожалению, при большом количестве экспериментальных и клинических исследований, посвященных изучению различных аспектов раневого процесса (Бушмелев В.А., 1990, Галингер Ю.И., Карпенкова В.И., 1996, Innes J.F., Sharif M., Barr A.R., 1999), механизмы нарушения обмена биополимеров соединительной ткани изучены недостаточно. В настоящее время мало доступной информации, посвященной отношению результатов, полученных при хирургических ранах на людях в условиях клиники и в условиях экспериментальной модели (Jorgensen L.N., 2003). Отсутствуют сравнительные исследования изменений содержания ГАГ в тканях, в зависимости от степени травматизации при резаных ранах в эксперименте и во время оперативных вмешательств в хирургии. В то же время тесная взаимосвязь обмена ГАГ с другими компонентами соединительной ткани, таких как гексозаминсодержащие белки (ГСБ) и коллаген, предполагает комплексное изучение этих биополимеров.

Представляет практический интерес изучение обменных процессов в соединительной ткани при хирургических операциях в клинике. Особенно актуально это в настоящее время, когда в практической медицине на смену традиционным, лапаротомным методам операций приходят эндоскопические методы. Все чаще лапароскопический метод используется хирургами при оперативном лечении желчнокаменной болезни (Сажин В.П., Федоров А.В., 1999, Ortiz-Oshiro E., Medrank J.C., 2001). Лапароскопические операции, выполняемые с использованием эндоскопического оборудования, – это малоинвазивные технологии, при которых отмечается минимальная травма брюшной стенки, поскольку все манипуляции выполняются инструментами, вводимыми в брюшную полость путем пункции, операция проходит в условиях не «открытого поля» (Каземир Д., 1996). Это предъявляет более высокие требо-



вания к лабораторной диагностике, поиску и использованию информативных показателей раневого процесса, степени травмирования с целью снижения интра- и послеоперационных осложнений, сокращения пребывания больного в стационаре и длительности временной нетрудоспособности, уменьшения послеоперационной летальности (Пучков К.В., 1997, Molina P.E. et al., 1998). В настоящее время показатели обмена биополимеров соединительной ткани при оперативных вмешательствах не нашли пока еще широкого применения в практике ввиду того, что, во-первых, недостаточно изучены, и во-вторых, не в полной мере определена их диагностическая ценность. В этом плане представляет интерес проведение сравнительного исследования показателей обмена биополимеров соединительной ткани при хирургических операциях по поводу холецистита, в эндоскопическом и традиционном, лапаротомном варианте.

Исследования в клинике существенно ограничены отсутствием возможности контролировать многие параметры. Этих ограничений значительно меньше в условиях экспериментальной модели на животных.

Цель работы: изучить особенности обмена гликозаминогликанов и других биополимеров соединительной ткани при резаных ранах брюшной стенки в зависимости от степени травматизации в эксперименте и клинике (холецистэктомия лапаротомным и лапароскопическим методами).

Задачи исследования:

1. Исследовать обмен ГАГ у крыс с проникающей и непроникающей резаной раной брюшной стенки в динамике заживления.
2. Исследовать изменения показателей обмена гексозаминсодержащих биополимеров и коллагена при ранах брюшной стенки в эксперименте.
3. Исследовать показатели обмена ГАГ в биологических жидкостях больных, прооперированных по поводу холецистита лапаротомным и лапароскопическим методами.

4. Провести сравнительный анализ показателей обмена ГАГ при разной степени травматизации (нанесения раны) в эксперименте и в условиях клиники.

Научная новизна. В работе впервые получены сравнительные данные о динамике изменений состояния обмена ГАГ при проникающих и непроникающих резаных ранах брюшной стенки в условиях экспериментальной модели у крыс.

Обнаружена зависимость характера изменений показателей обмена ГАГ и коллагена от степени травматизации при нанесении резаной раны.

Впервые проведен сравнительный анализ динамики показателей биополимеров соединительной ткани в течение раневого процесса после лапароскопических и лапаротомных операций.

Теоретическое значение. Результаты исследования расширяют представления о патохимии процессов заживления проникающих и непроникающих ран. Они позволяют глубже изучить причинно-следственные связи нарушения обмена ГАГ и коллагена, участвующих не только в репаративных процессах или процессах заживления, но и общем восстановлении организма после стресса, получаемого при хирургическом вмешательстве.

Практическая значимость. Полученные данные позволят более целенаправленно подходить к выбору метода оперативного лечения холецистита и прогнозировать интенсивность воспалительного процесса в послеоперационный период.

На основе комплексного клинико-функционального исследования больных в приемном покое хирургического отделения МУЗ МСЧ № 3 г. Ижевска определены условия для проведения лапароскопических хирургических вмешательств, проводится лабораторная диагностика послеоперационного состояния пациентов. В качестве дополнительного теста в оценке состояния больных используются модифицированные лабораторные методы исследования обмена ГАГ и других биополимеров соединительной ткани. В лечебно-профиллак-

тических учреждениях г. Ижевска (ГУЗ РКБ № 1, МУЗ МСЧ № 1, МУЗ МСЧ № 3) врачи клинической лабораторной диагностики используют в своей работе рекомендации информационных писем «Методы лабораторных исследований гликозаминогликанов (кислых мукополисахаридов) в биологических жидкостях» (Ижевск, 2001), «Методы лабораторных исследований показателей обмена коллагенов в биологических жидкостях» (Ижевск, 2003). Клинико-диагностическим лабораториям ЛПУ Удмуртской Республики рекомендовано к внедрению рационализаторское предложение «Тест для определения гликозаминогликанов в сыворотке крови» (2002, № 10.02).

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Динамика обмена ГАГ в организме при нанесении раны имеет двухфазный характер. Выраженность изменений показателей обмена ГАГ при оперативном вмешательстве на брюшной стенке в эксперименте зависит от степени травматизации.

2. Изменения показателей обмена ГАГ при проникающей ране, в отличие от непроникающей, имеют системный характер.

3. Определение показателей обмена ГАГ и других биополимеров соединительной ткани при проведении хирургических операций в брюшной полости позволяет оценить тяжесть оперативного вмешательства и прогнозировать сроки реабилитации.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 12 научных работ.

Апробация работы. Основные положения доложены на конференции биохимиков Урала, Поволжья и Западной Сибири (Челябинск, 1999), на научно-практической конференции «Молодые ученые на рубеже веков» (Ижевск, 2000), на научно-практической конференции «Национальные дни лабораторной медицины России» (Москва, 2001)

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 132 страницах, содержит 23 таблицы, 16 рисунков и состоит из введения, обзора ли-

температуры, описания материалов и методов исследования, главы результатов собственных исследований и их обсуждения, выводов, списка литературы, включающего 202 источника, из которых 95 отечественных и 107 иностранных авторов.

Организация и методы исследования

Эксперименты проводились на 463 растущих крысах-самцах массой 110–140 г. Подопытные животные были разделены на две основные группы. Животным первой группы (192) под кратковременным эфирным наркозом в асептических условиях проводили прямой разрез кожи с подкожной клетчаткой от края реберной дуги длиной 5 см. Разрез проводили на 1 см справа от средней линии брюшной стенки.

Животным другой группы (182) моделировали проникающую рану в брюшную полость через все слои длиной 5 см, при этом кончиком шпателя без больших физических усилий надавливали на желудок, тонкую кишку и печень в области желчного протока. На раны накладывали швы послойно. Контролем для всех опытов служили крысы (89), находящиеся в обычных условиях вивария.

Контрольных и опытных животных забивали в различные сроки опытов под кратковременным эфирным наркозом. Для биохимического анализа использовали плазму крови, а также гомогенаты тканей кожи, стенки желудка (все слои) и проксимального отдела тонкого кишечника (все слои).

Отдельно проводились исследования в условиях клиники. С этой целью наблюдались пациенты, прооперированные с диагнозом хронического калькулезного холецистита. Первой группе, состоящей из 18 человек, была проведена холецистэктомия традиционным (лапаротомным) методом. Больные второй группы (16) прооперированы эндоскопическим методом. Отбор больных и их лечение осуществлялось в хирургическом отделении МУЗ МСЧ № 3 г. Ижевска. Для плановых лабораторных исследований кровь и моча забирались утром, натощак до операции, на следующий день после операции, затем на 5-й, 7-й и 12-й дни после операции.

В полученном материале определяли содержание суммарных ГАГ по гексуроновым кислотам (Шараев П.Н., 1987) с последующим их фракционированием на гиалуроновую и сульфатированную формы (Коннова Л.А., 1978). Суммарные гексозаминсодержащие биополимеры в сыворотке крови и ткани желудка оценивали по уровню гексозаминов (Gatt R., 1966). Гексозаминсинтетазную активность (ГАСА) тотальных гомогенатов тканей желудка и тонкой кишки и глюкуронатсинтетазную активность (ГСА) определяли по методу Malathy K., Kuḡur P.A. (1970) в модификации Иванова В.Г. (1990). Показатели обмена коллагена – свободный (СГОП), пептидносвязанный (ПСГОП) и белковосвязанный гидрооксипролин (БСГОП) в сыворотке крови, моче и гомогенатах тканей исследовали по методу Шараева П.Н. (1986). В сыворотке крови пациентов определяли гормоны: АКТГ – методом РИА, кортизол – методом ИФА.

Полученные результаты были подвергнуты статистическому анализу методами вариационной статистики с использованием компьютерных программ «Microsoft Excel» и «Statistica for Windows». Достоверность различий между группами оценивали с использованием t-критерия Стьюдента.

Результаты исследования и их обсуждение

В эксперименте, на 5-й день после нанесения непроникающей раны, количество ГАГ в сыворотке крови крыс достоверно повышалось с $55,9 \pm 2,5$ до $66,9 \pm 2,7$ ($p < 0,05$) мкмоль/л, а на 10-й день практически не отличалось от контроля. При проникающей ране, в первые 2 часа наблюдалось снижение количества ГАГ (до $45,7 \pm 2,9$, $p < 0,001$), а на 5-й день их уровень увеличился на 46,9% ($p < 0,001$), к 10-му дню этот показатель все еще оставался повышенным на 35,2% ($p < 0,001$) по сравнению с исходным.

Изменение концентрации отдельных фракций ГАГ в сыворотке крови представлены на рис.1. В отличие от сульфатированных ГАГ, концентрация которых в крови практически не изменялась, наблюдались значительные колебания ГК, причем наиболее заметные изменения были у животных с проникающей

раной. В частности, концентрация ГК сначала снижалась на (26,8%), затем резко возрастала к 5-му дню эксперимента (на 35,2%) и оставалась высокой до 10-го дня (разница с контролем составляла 25,2%).

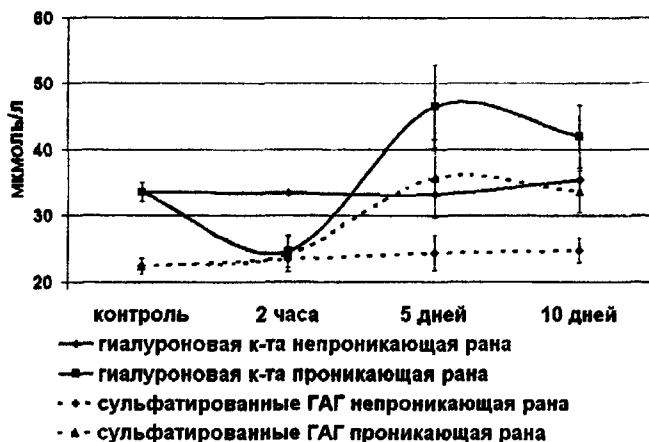


Рис. 1. Динамика концентрации ГК и сульфатированных ГАГ (мкмоль/л) в сыворотке крови крыс в зависимости от раны.

Изменения суммарных ГАГ и их фракций в гомогенатах желудка и тонкой кишки повторяли характер изменений в крови ($r = 0,68$ ГАГ крови с ГАГ желудка и $r = 0,71$ ГАГ крови с ГАГ тонкой кишки у животных с проникающей раной). Изменения концентрации суммарных ГАГ у крыс с непроникающей раной были не столь значительны.

У животных с проникающей раной содержание суммарных ГАГ в гомогенате тонкой кишки достоверно повысилось уже через 2 часа после нанесения раны (до $2,93 \pm 0,12$, $p < 0,05$), а к 5-му дню эксперимента достигло максимальных значений — $4,87 \pm 0,75$ ($p < 0,001$) ммоль/кг сухой ткани. К 10-му дню количество суммарных ГАГ снижается, приближаясь к значениям в контроле. Изменения фракций ГАГ в гомогенате тонкой кишки в ходе эксперимента отражены на рис. 2.

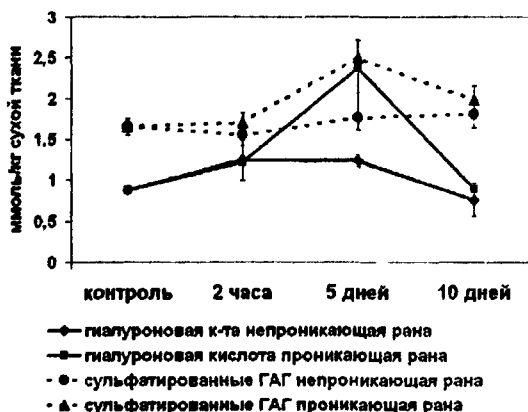


Рис.2. Динамика изменения концентрации ГК и СГАГ в гомогенате тонкой кишки крыс с проникающей и непроникающей раной брюшной стенки.

Высококочувствительной на травму оказалась фракция гиалуроновой кислоты. Незначительно меняясь у крыс из группы с непроникающей раной, концентрация ГК в гомогенате тонкой кишки у группы животных с проникающей раной увеличивалась к 5-му дню эксперимента в 2,7 раза (от $0,88 \pm 0,02$ до $2,37 \pm 0,6$ ммоль/кг сухой ткани, $p < 0,001$). В дальнейшем, уровень ГК несколько снижлся, оставаясь повышенным к 10-му дню эксперимента.

Изменения сульфатированных ГАГ у крыс с проникающей раной следующие: их содержание на 5-й день эксперимента выше контрольных значений в 1,5 раза, а на 10-й день — 1,2 раза. Сравнительный анализ изменения фракций ГАГ показал, что в тонком кишечнике ГК изменяется в большей степени, чем СГАГ с максимумом на 5-й день.

Ферментативная деградация протеогликанов (ПГл) осуществляется двумя классами ферментов — протеиназами, расщепляющими стержневой белок и гликозидазами, расщепляющими цепи ГАГ (В.В. Серов, А.Б. Шехтер, 1981). К классу последних относится гиалуронидаза, за изменением активности которой мы наблюдали во время исследования.

Динамика гиалуронидазной активности в условиях эксперимента носила отчетливо фазный характер, как при проникающей ране, так и непроникающей (рис. 3). Максимальные значения активности фермента были обнаружены через 2 часа после нанесения травмы.

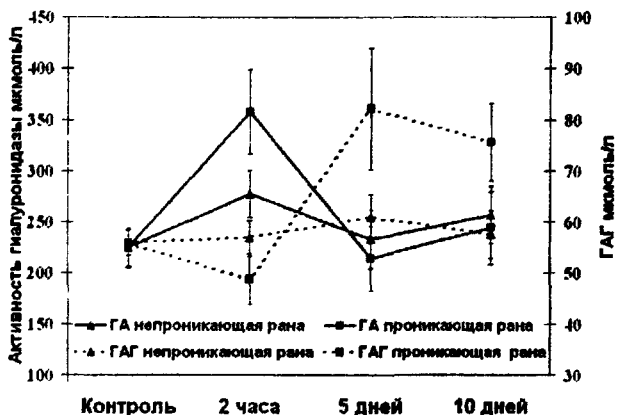


Рис. 3. Активность гиалуронидазы и ГАГ в крови после нанесения проникающей и непроникающей раны в эксперименте на крысах.

У животных с непроникающей раной рост ферментативной активности составил 23,5% (от $224,5 \pm 9,2$ до $277,4 \pm 15,1$ мкмоль/ч/л, $p < 0,001$), у животных с проникающей раной ГА увеличилась на 59,2% (до $357,6 \pm 21,0$ мкмоль/ч/л, $p < 0,001$). На 5-й день эксперимента активность фермента несколько снижалась, причем, в группе животных с проникающей раной, последнее было более выражено. К 10-му дню эксперимента наблюдалось повышение активности исследуемого фермента у животных обеих групп. Динамика активности фермента ГА носила взаимно противоположный характер от уровня ГАГ в крови ($r = -0,707$, $p < 0,05$).

Активность гиалуронидазы в крови изменялась в обратной зависимости от активности глюкоуронатсинтетазы (ГСА), участвующей в биосинтезе гексуроновых кислот и гексозаминов (рис. 4). Гексуроновые кислоты (глюкуроновая и идуруновая кислоты) и гексозамины (глюкозамин и галактозамин) являются предшественниками в биосинтезе ГАГ в тканях (Уоррен Л., 1976).

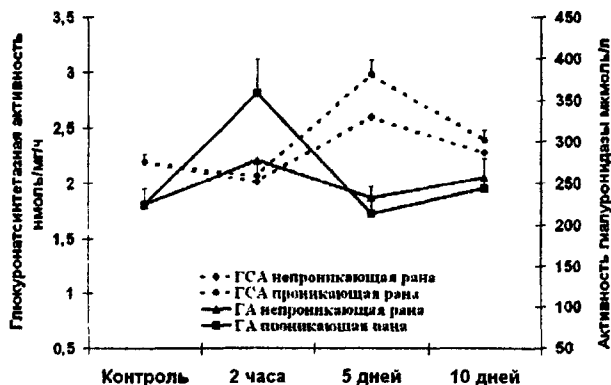


Рис. 4. Динамика активности ГСА в гомогенате желудка и ГА в крови в условиях эксперимента у крыс.

Уровень ГСА в гомогенате желудка intactных крыс равнялся $2,19 \pm 0,07$ нмоль/мг/ч. Полученные нами значения активности ГСА в стенке желудка согласуются с данными, приведенными в литературе об активности фермента в различных тканях организма (Malathy K., Kurup P.A., 1971), в том числе и в стенке желудка (Иванов В.Г., 1990). Глюкуронатсинтетазная активность через два часа после операции несколько снизилась в обоих случаях, хотя различие было не достоверным. Однако к 5-му дню эксперимента – повышалась на 18,7% у крыс с непроникающей раной, и на 36,0% – в группе животных с проникающей раной. На 10-й день у крыс первой группы активность ГСА превышает контрольные значения на 4,1%, во второй группе – на 18,3%.

Сопоставление динамики активности ГСА в желудке, ГА и ГАГ в крови, говорит о взаимосвязи протекающих процессов в крови и других органах после нанесения проникающей раны, то есть изменение показателей обмена ГАГ носит системный характер.

Биополимеры соединительной ткани такие, как ГАГ, гликопротеины, гексозаминсодержащие гликолипиды относятся к гексозаминсодержащим биополимерам (ГСБ). Эти биополимеры широко представлены в организме животных, и выполняют важную роль в жизнедеятельности тканей и органов (Серов В.В., Шехтер А.Б.,

1981, Степаненко Б.Н., 1978). Поэтому нашей задачей было исследовать динамику показателей обмена ГСБ после травматизации крыс в эксперименте.

В норме уровень суммарных гексозаминов (показатель содержания гексозаминсодержащих биополимеров) в сыворотке крови крыс был равен $1,39 \pm 0,04$ ммоль/л. Через 2 часа после нанесения травмы этот показатель резко увеличивается: у крыс с непроникающей раной на 48,2% (до $2,06 \pm 0,08$ ммоль/л, $p < 0,001$), у крыс с проникающей раной на 60,4% (до $2,23 \pm 0,09$ ммоль/л, $p < 0,001$). К 5-му дню наблюдений у животных с непроникающей раной уровень ГСБ снижается до $1,69 \pm 0,06$ ммоль/л, $p < 0,001$ (на 21,6% выше контроля), у крыс с проникающей раной уровень ГСБ составил $1,78 \pm 0,06$ ммоль/л, $p < 0,001$. Содержание ГСБ на 10-й день эксперимента почти не отличается от контрольных значений: у крыс первой группы выше контроля на 5,0%, у животных второй группы – на 10,7%.

В стенке желудка крыс ГСБ до нанесения травмы содержалось $5,39 \pm 0,13$ ммоль/кг. Через 2 часа после нанесения раны содержание суммарных гексозаминов снижалось у животных первой группы на 38,0% (до $3,34 \pm 0,21$ ммоль/кг, $p < 0,001$), у крыс второй группы – на 29,9% (до $3,78 \pm 0,24$ ммоль/кг, $p < 0,001$). К 5-му дню наблюдений за экспериментальными животными уровень ГСБ повышался: в группе с непроникающей раной он составлял $6,95 \pm 0,26$ ммоль/кг ($p < 0,001$), что выше контроля на 28,9%; у крыс с непроникающей раной ГСБ был равен $7,08 \pm 0,32$ ммоль/кг ($p < 0,001$), то есть на 31,4% выше контроля. В дальнейшем, к 10-му дню наблюдений этот показатель снижался, приближаясь к контрольным значениям.

Динамика изменений ГСБ отражала скорость биосинтеза гексозаминов, в котором участвует фермент гексозаминсинтетаза (ГАСА).

В гомогенате стенки желудка интактных крыс ГАСА равнялась $38,6 \pm 1,98$ нмоль/мг/ч, колеблясь в довольно широких пределах от 32,1 до 46,8 нмоль/мг/ч, что не отличается от опубликованных данных (Malathy K., Kurup P.A., 1971, Иванов В.Г., 1990).

Через 2 часа после нанесения раны активность энзима существенно снижалась у всех подопытных животных: в первой группе – до $21,2 \pm 2,06$ нмоль/мг/ч

($p < 0,05$); во второй группе – до $20,4 \pm 2,24$ нмоль/мг/ч ($p < 0,001$). В последующие дни наблюдений уровень исследуемой ферментативной активности повышался, причем у крыс с проникающей раной – значительно (на 5-й день выше контроля на 114,2% (до $82,7 \pm 3,13$ нмоль/мг/ч, $p < 0,001$), на 10-й день – на 59,0% (до $61,4 \pm 4,02$ нмоль/мг/ч, $p < 0,001$).

Изменения ГАСА в гомогенате тонкой кишки повторяют характер изменений этого фермента в гомогенате желудка: через 2 часа после нанесения раны активность фермента понижалась у крыс с непроникающей раной на 30,6% (с $32,9 \pm 2,09$ до $22,8 \pm 1,96$ нмоль/мг/ч, $p < 0,001$), у животных с проникающей раной – на 28,9% (до $23,4 \pm 2,12$ нмоль/мг/ч, $p < 0,001$).

Затем к 5-му дню эксперимента активность гексозаминсинтетазы увеличивалась: у животных первой группы – на 63,2% (до $53,7 \pm 3,71$ нмоль/мг/ч, $p < 0,001$), у крыс второй группы – на 93,6% (до $63,7 \pm 3,59$ нмоль/мг/ч, $p < 0,001$). К 10-му дню наблюдений активность этого фермента приближалась к контрольным значениям.

Динамика изменения активности двух ключевых ферментов синтеза гексозаминов и глюкуроновых кислот, а также содержания ГСБ в гомогенате желудка крыс показаны на рис. 5.

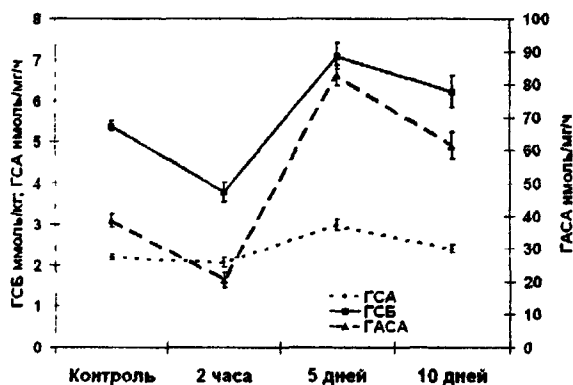


Рис 5 Динамика изменения активности ГСА, ГАСА и содержания суммарных ГСБ в гомогенате желудка крыс при проникающей ране.

Из рисунка видно, что содержание ГСБ в гомогенате желудка в большей степени зависит от активности ГАСА ($r = 0,96$, $p < 0,05$). Характер изменений ГСА и ГАСА по направленности аналогичен.

Сравнительный анализ изменения обмена ГАГ обнаружил, что в коже, в отличие от крови, желудка, тонкой кишки, как при проникающей ране, так и непроникающей ране, изменения обмена ГАГ и их фракций были практически одинаковы ($r = 0,62$ ГАГ кожи и ГАГ крови у животных с непроникающей раной, $r = 0,99$ ГАГ кожи и ГАГ крови у животных с проникающей раной). Этот факт очевиден, и следует из экспериментальных условий. В том и другом эксперименте при нанесении раны на кожу оказывалось практически одинаковое оперативное воздействие. В то же время, в крови, желудке и тонком кишечнике значимые изменения в показателях обмена ГАГ наблюдались только при проникающем ранении.

Это позволяет предполагать, что инициирующим фактором развития системной реакции является не только стресс-реакция, а возможно и другие специфические факторы (физиологические и биохимические), формирующиеся или образующиеся в условиях проникающей раны. Ключевым звеном в развитии системной реакции, на наш взгляд, может быть изменение показателей обмена ГАГ в крови, которая может быть местом образования, или переноса, или тем и другим одновременно, для факторов инициации изменений в обмене тканевых ГАГ. Это предположение подтверждается выраженными изменениями показателей обмена ГАГ в крови при проникающей ране по сравнению с желудком и тонким кишечником.

ГАГ, взаимодействуя с коллагеном, способны непосредственно модифицировать физические свойства в целом коллагеновых волокон и влиять, таким образом, на физические свойства ткани. Кроме того, ГАГ выполняет функцию информационного ключа в формировании коллагеновых волокон (Слуцкий Л.И., 1988, Anderson K.V., Garcia M.J., 2003).

Анализ изменения показателей обмена коллагена в исследуемых тканях после нанесения раны показал, что их динамика имеет сходный характер с изменением обмена ГАГ (у животных с проникающей раной ГАГ и СГОП

в крови: $r = 0,79$, $p < 0,05$; в желудке: $r = 0,95$, $p < 0,001$; в тонком кишечнике: $r = 0,84$, $p < 0,05$). Так же практически не наблюдались изменения этих показателей при непроникающей ране, и носили ярко выраженный характер при проникающей ране. Через 2 часа содержание СГОП в крови увеличились на 30,8% (от $11,7 \pm 1,7$ до $15,3 \pm 2,5$ мкмоль/л) и оставалось высоким на протяжении всего эксперимента: к 5-му дню – на 60,7% ($18,8 \pm 1,5$ мкмоль/л, $p < 0,001$); к 10-му дню – на 61,5% выше контроля ($18,9 \pm 1,7$ мкмоль/л, $p < 0,05$). Высокий уровень ПСГОП в крови животных этой группы наблюдался на протяжении всего эксперимента: через 2 часа, 5 дней, 10 дней он превышал контрольный на 66,7% (от $9,6 \pm 1,9$ до $16,0 \pm 2,2$ мкмоль/л), 85,4% ($17,8 \pm 2,0$ мкмоль/л, $p < 0,05$) и 98,9% соответственно ($19,1 \pm 2,6$ мкмоль/л, $p < 0,05$). Значения БСГОП у крыс после нанесения проникающей раны в ходе всего эксперимента превышали контрольные. Активность коллагеназы в сыворотке крови резко возрастала уже через 2 часа после нанесения раны в обеих экспериментальных группах. Причем, у животных с непроникающей раной активность фермента достоверно увеличилась на 95,7%, а у крыс с проникающей раной – на 175,7%. К 5-му дню эксперимента активность коллагеназы несколько снижалась, но еще продолжала оставаться достаточно высокой. Этот уровень сохранялся и к десятому дню эксперимента. Изменения показателей обмена коллагена в других исследуемых тканях соответствовали характеру наносимой в эксперименте травмы. Наблюдалась незначительная и непродолжительная реакция организма на непроникающую рану и более выраженная и продолжительная – на проникающую рану.

Известно, что показателем интенсивности обмена белков соединительной ткани является отношение ПСГОП/СГОП определяемое в тканях и органах. Увеличение отношения ПСГОП/СГОП в крови свидетельствует об активизации фибриллогенеза в соединительной ткани (Шараев П.Н., 1998).

Динамика изменения отношения ПСГОП/СГОП у животных после нанесения непроникающей и проникающей раны в исследуемых тканях у крыс представлены на рис. 6.

Величина и направленность сдвигов в метаболизме коллагена в значительной мере зависит от ткани и характера нанесенной травмы (Renvall S. et al., 2001). Так, если в крови данное отношение практически не меняется, то в тонком кишечнике и желудке реакция на травму выражена в большей степени, при этом наблюдается значимое различие между непроникающей и проникающей травмой. Так как непосредственной физической травмы ни желудка, ни тонкого кишечника в эксперименте не было, учитывая значительные изменения в обмене коллагена, можно говорить о системном характере реакции организма на проникающую рану.

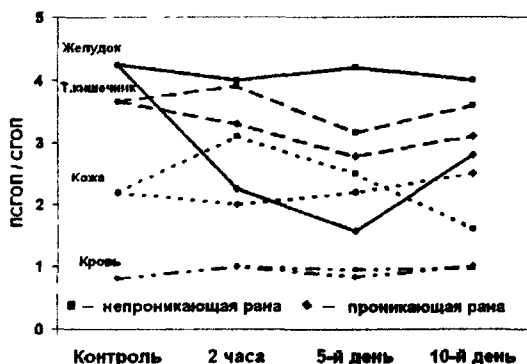


Рис 6. Изменение отношения ПСГОП/СГОП в крови, коже, желудке и тонком кишечнике у крыс после нанесения непроникающей (НР) и проникающей (ПР) раны. Данные представлены в условных единицах.

Анализ динамики изменения данного показателя выявил, что увеличение синтетической активности в обмене биополимеров соединительной ткани у животных с проникающей раной начинается после 5-го дня эксперимента и не заканчивается к 10-му дню. У животных, которым была нанесена непроникающая травма, процесс активации фибриллогенеза и рубцевания ткани отмечается сразу после нанесения раны.

Процесс заживления раны – нелинейный, сложно организованный процесс, инициируемый повреждением целостности органа или ткани. Отдельным этапам этого процесса свойственны свои закономерности (Пучков К.В., 1997,

Jorgensen L.N., Галингер Ю.И. и соавт., 1996, Sorensen L.T. et. al., 2001). Анализ динамики изменения обмена ГАГ и ферментов, детерминирующих его основные параметры, после нанесения травмы показал, что она состоит из двух четко выраженных этапов. Первый этап характеризуется значениями определяемых нами показателей через 2 часа после операции. Этот этап можно определить, как фаза катаболических реакций, которая разворачивается в своих процессах, как стресс-реакция. Это проявляется в усиленном распаде биополимеров соединительной ткани, активации гидролизующих ферментов и снижения активности ферментов синтеза. Рост продуктов распада соединительной ткани может по механизму обратной связи усилить синтетические процессы, и тем самым, обмен в целом.

Значения исследуемых показателей на 5-й день экспериментальных наблюдений отражают совершенно иные процессы, их изменения имеют другую направленность. Этот этап можно определить как синтетический, он характеризуется высокой активностью синтетических ферментов и соответствующим изменением показателей обмена ГАГ. Высокий уровень в крови общих ГАГ, ГК, СГАГ и других биополимеров СТ на 5–10-й дни после нанесения раны отражает, по-видимому, интенсивно идущие процессы регенерации, фиброплазию, формирование межклеточного матрикса и эпителизацию тканей (Zou X.H., Foong W.C., Cao T. et al., 2004 г.).

Одной из практических задач данного исследования была оценка чувствительности показателей обмена соединительной ткани в зависимости от степени травмирования в условиях двух методов холецистэктомии – лапароскопического и лапаротомного.

При эндоскопическом варианте холецистэктомии суммарные ГАГ крови увеличивались к 5-му дню после операции на 18,3% по сравнению с исходным уровнем. Затем постепенно снижались, к 12-му дню уровень ГАГ ниже дооперационного и отличается от нормального всего на 9,0%. При ТХЭ пик роста показателей обмена ГАГ приходился на 5-й день после операции – суммарные ГАГ крови увеличивались на 46,9% ($p < 0,001$) по сравнению с исходным уровнем. Приближение к нормальным значениям не заканчивалось и

к 12-му дню наблюдений – уровень ГАГ оставался немного выше дооперационного, а нормальный превышал на 25,2%.

Анализ данных, полученных при исследовании в крови отдельных фракций ГАГ, показал, что независимо от вида хирургического вмешательства сдвиги в суммарном содержании ГАГ обусловлены в основном изменениями концентрации ГК. Пик увеличения содержания ГК у всех прооперированных пациентов наблюдался на 5-й день после операции: ТХЭ – на 47,9% ($p < 0,001$), ЛХЭ – 15,5% по сравнению с дооперационным. К 12-му дню наблюдений, концентрация ГК в крови составила у больных после лапаротомной холецистэктомии – $26,1 \pm 4,3$ мкмоль/л, что отличалось от исходных значений на 9,7%, и было выше контроля на 41,8%. У больных, после эндоскопического варианта холецистэктомии, значения ГК в эти же сроки стали ниже исходных, и составили $19,0 \pm 5,6$ мкмоль/л, то есть почти не отличались от контроля.

Динамика изменения активности гиалуронидазы и ГАГ в крови у пациентов после ЛХЭ и ТХЭ представлена на рис.7.

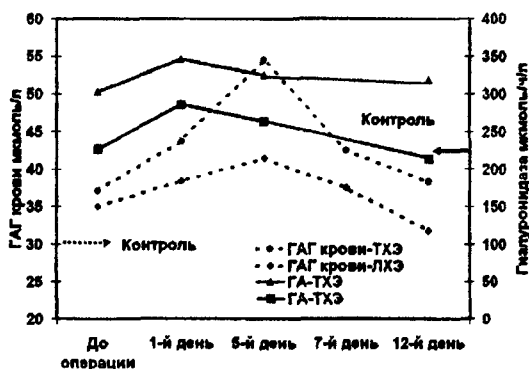


Рис.7. Динамика изменения активности гиалуронидазы и ГАГ в крови у пациентов после ЛХЭ и ТХЭ.

Динамика фермента у пациентов, перенесших ТХЭ подвержена резким колебаниям. До операции, отражая высокий уровень воспаления, ГА выше контроля на 39,3%, сразу после операции возрастает еще на 14,5%, что выше контроля на 59,4%. К концу наблюдений, на 12-й день, отражая процесс не-

полного восстановления, ГА крови остается выше контрольных значений на 46,3%. У больных, прооперированных эндоскопическим методом, активность гиалуронидазы максимально повышается на следующий день после операции – на 26,3% ($p<0,05$) выше исходных значений, что на 31,7% выше контроля. Постепенно снижаясь, к 12-му дню после операции ГА крови приближается к контрольным значениям.

На рисунке видно, что на фоне высокого уровня ГА и ГАГ к крови у больных до операции, как и в экспериментах на крысах, на следующий день после операции наблюдается увеличение активности ГА и содержания ГАГ в крови. На 5-й день после холецистэктомии при снижении активности ГА, суммарные ГАГ достигают максимальных значений. В последующем исследуемые показатели снижаются, приближаясь к норме.

После проведенных хирургических операций в клинике максимальный рост показателей приходился на следующий день после операции: СГОП крови у больных после ТХЭ увеличивается на 42,7% ($p<0,001$) от исходных значений, у больных после ЛХЭ – на 21,4% ($p<0,001$). У больных в 1-й день после операции ТХЭ, ПСГОП в сыворотке крови выше исходных значений на 33,5% ($p<0,001$), у больных, прооперированных ЛХЭ, содержание ПСГОП выше на 29,4% ($p<0,001$). К 12-му дню после холецистэктомии значения ПСГОП возвращаются к дооперационным у пациентов обеих групп.

Степень изменения показателей обмена коллагена у больных после ЛХЭ была менее значима, чем после ТХЭ, то есть зависела от степени травмирования при хирургическом вмешательстве. Это хорошо согласуется с данными, полученными нами на экспериментальных животных.

Для того, чтобы оценить характер реакции организма на операционную травму, нами изучалось содержание гормонов в крови больных, которым была проведена ЛХЭ. Исследование АКТГ в периферической крови свидетельствует о повышении секреции данного гормона во время операции на 41,2% (от $27,4\pm 3,3$ до $38,7\pm 9,1$ пг/мл, $p<0,05$). В ответ на выброс АКТГ, синхронно повышалась продукция кортизола, и его динамика в крови была адекватной секреции АКТГ. После операции содержание гормонов снижалось до исходных значений.

Сравнительный анализ данных, полученных в эксперименте на животных, и в исследованиях в клинике показал, что в обоих случаях отмечается четко выраженный двухфазный характер в изменении показателей обмена ГАГ и других биополимеров соединительной ткани. Наблюдалась зависимость величины этих изменений от степени травмирования.

ВЫВОДЫ

1. Содержание гликозаминогликанов, их фракций в крови и других исследуемых тканях, при проникающей ране у крыс, изменялись в большей степени, чем у животных с непроникающей раной.

2. Динамика обмена гликозаминогликанов при нанесении проникающей раны имеет двухфазный характер. Через два часа после нанесения раны наблюдалось снижение уровня суммарных гликозаминогликанов и их фракций, на пятый день эксперимента отмечался рост этого показателя на фоне повышения гексозаминсинтетазной активности и снижения гиалуронидазной активности.

3. Показатели обмена гликозаминогликанов в коже различались незначительно в обоих экспериментальных условиях.

4. Динамика показателей обмена коллагена имеет сходный характер с изменениями показателей обмена гликозаминогликанов. Реакция обмена биополимеров соединительной ткани на проникающую рану, в отличие от непроникающей, носит системный характер.

5. При традиционном и эндоскопическом методе проведения хирургических операций отмечаются одинаковые по направленности, но разные по величине изменения показателей обмена гликозаминогликанов и коллагена в крови и моче у наблюдаемых пациентов в динамике заживления раны. При эндоскопических операциях сдвиги в обмене биополимеров относительно их значений до операции были меньше, чем при традиционных методах холецистэктомии.

6. У больных, перенесших лапароскопическую холецистэктомию, пик АКТГ и кортизола наблюдался в интраоперационный период, через сутки уровень исследуемых гормонов практически не отличался от контроля.

7. Определение показателей обмена гликозаминогликанов и коллагена может использоваться в контроле и мониторинге послеоперационного заживления раны, а так же служить дополнительным критерием в оценке степени травматизации, воспаления и эффективности терапии в хирургической практике.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Показатели обмена коллагена и гликопротеинов при эндогенных интоксикациях / Шараев П.Н., Стрелков Н.С., Меньшикова Н.Н. и др. // Тез. докл. конференции биохимиков Урала, Поволжья и Западной Сибири, посвященной 70-летию Лифшица Р.И. «Актуальные проблемы теоретической и прикладной биохимии». Челябинск, 1999. – С. 122.

2. Метод определения активности глюкозаминсинтетазы в моче / Шараев П.Н., Санникова А.А., Меньшикова Н.Н. и др. // Клиническая лабораторная диагностика. – 1999. – №11. – С. 45.

3. О диагностическом значении показателей обмена коллагена и гликопротеинов при эндогенных интоксикациях / Шараев П.Н., Стрелков Н.С., Меньшикова Н.Н. и др. // Клиническая лабораторная диагностика. – 2000. – № 9. – С. 9–10.

4. Об обмене соединительной ткани при ранах брюшной стенки /Игуменова О.В., Овечкина О.Е., Меньшикова Н.Н. // Тез. докл. научно-практической конференции «Молодые ученые на рубеже веков», посвященной 25-летию образования Совета молодых ученых и 55-летию образования Студенческого научного общества ИГМА. Ижевск, 2000. – Т. 25. – С. 56–57.

5. Клиническое значение исследования гликозаминогликанов у больных до и после холецистэктомии /Меньшикова Н.Н., Мальчиков А.Я., Корюков А.Н. и др. // Клиническая лабораторная диагностика. – 2000. – № 10. – С.

6. О состоянии обмена гликозаминогликанов у больных при холецистэктомии /Меньшикова Н.Н., Мальчиков А.Я., Корюков А.Н.// Труды Ижевской государственной медицинской академии. Ижевск, 2000. – Т. 37. – С. 26–27.

7. Показатели обмена биополимеров соединительной ткани при хирургических вмешательствах /Мальчиков А.Я., Стрелков Н.С., Меньшикова Н.Н. и др.// Тез. докл. конференции «Национальные дни лабораторной медицины России». Москва, 2001. – С.23.

8. Динамика показателей обмена гликозаминогликанов при ранах брюшной стенки в эксперименте /Меньшикова Н.Н. // Труды Ижевской государственной академии. Ижевск, 2001. – Т. 39. – С. 31–32.

9. Метод количественного определения лизоцима в моче /Шараев П.Н., Стрелков Н.С., Меньшикова Н.Н. и др.// Клиническая лабораторная диагностика. – 2001. – № 4. – С. 52–53.

10. Методы лабораторных исследований гликозаминогликанов (кислых мукополисахаридов) в биологических жидкостях /Шараев П.Н., Мальчиков А.Я., Меньшикова Н.Н. и др.// Информационное письмо для врачей клинической лабораторной диагностики. Ижевск, 2001. – 12 с.

11. Показатели обмена биополимеров соединительной ткани при хирургических вмешательствах /Мальчиков А.Я., Стрелков Н.С., Меньшикова Н.Н. и др. // Клиническая лабораторная диагностика. – 2001. – № 10. – С. 46–47.

12. Методы лабораторных исследований показателей обмена коллагенов в биологических жидкостях /Шараев П.Н., Меньшикова Н.Н., Чернышева Н.Г. // Информационное письмо для врачей клинической лабораторной диагностики. Ижевск, 2003. – 15 с.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АКТГ – адренокортикотропный гормон
 СТОП – белковосвязанный гидроксипролин
 ГА – гиалуронидазная активность
 ГАГ – гликозаминогликаны
 ГАСА – гексозаминсинтетазная активность
 ГК – гиалуроновая кислота
 ГОП – гидроксипролин
 ГСА – глюкуронатсинтетазная активность
 ГСБ – гексозаминсодержащие биополимеры

КА – коллагеназная активность
 ЛХЭ – лапароскопическая холецистэктомия
 ПГл – протеогликаны
 ПСТОП – пептидносвязанный гидроксипролин
 СТ – соединительная ткань
 СТАГ – сульфатированные гликозаминогликаны
 СГОП – свободный гидроксипролин
 ТХЭ – традиционная холецистэктомия

РНБ Русский фонд

2005-4

45449

Лицензия ЛР № 020411 от 16.02.97.

Сдано в производство 22.05.04. Формат 60×84 1/16.

Печать офсетная. Усл. печ. л. 1,39. Уч.-изд. л. 1,3.

Тираж 100 экз. Заказ № 67.

Издательский дом «Удмуртский университет»,
426034, г. Ижевск, ул. Университетская, 1, корп. 2.

Факс: 8(3412) 75-21-55; e-mail: knigi@udm.ru;

internet: <http://www.uni.udm.ru/pubhouse>

07 МАЙ 2005

