

УДК 616.37-002-036.11-092.9:612.127.2:546.172.6-31

ДИНАМИКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ КИСЛОРОДТРАНСПОРТНОЙ ФУНКЦИИ КРОВИ И НИТРАТ/НИТРИТОВ ПРИ ОСТРОМ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ПАНКРЕАТИТЕ У КРЫС

С.В. Колешко

УО «Гродненский государственный медицинский университет»

Настоящая работа посвящена исследованию и сравнительному анализу показателей кислотно-основного состояния крови, кислородтранспортной функции и содержанию нитрат/нитритов в плазме крови при экспериментальном остром панкреатите у крыс. При этом развивается метаболический ацидоз и снижается pO_2 крови, что приводит к развитию гипоксии. Смещение кривой диссоциации оксигемоглобина при данной патологии на 5 сутки вправо при реальных значениях pH и pCO_2 , отражает усиление механизмов, направленных на компенсацию гипоксии. Концентрация нитрат/нитритов при остром панкреатите увеличивается, что отражает активизацию L-аргинин-NO системы, которая обусловлена экспрессией индуцибельной изоформы NO-синтазы.

Ключевые слова: острый панкреатит, кровь, система транспорта кислорода, нитрат/нитриты

The present work is devoted to research and comparative analysis of blood acid – base balance indexes, oxygen transport function and nitrate/nitrites content in blood plasma during experimental acute pancreatitis at rats. At this state the metabolic acidosis develops and blood pO_2 decreases that results in hypoxia development. At this pathology oxyhemoglobin dissociation curve shifts to the right at actual pH and pCO_2 on 5th day which reflects hypoxia compensatory mechanism potentiation. During acute pancreatitis nitrate/nitrites concentration increases and that reflects L-arginin-NO systems activation due to inducible nitric oxide synthase expression.

Keywords: acute pancreatitis, blood, system of oxygen transport, nitrate/nitrites

Введение

За последние десятилетия заболеваемость острым панкреатитом (ОП) увеличилась более чем в 2 раза и превышает 25% в структуре острых хирургических заболеваний [1, 4]. Высокая заболеваемость лиц молодого и трудоспособного возраста, высокая летальность при деструктивных формах представляют интерес ученых к разработке новых методов диагностики и поиску эффективных способов лечения. Предпринимаются попытки применения для лечения ОП лекарственных средств, направленных на различные звенья этого тяжелого заболевания. Несмотря на значительный прогресс в диагностике и лечении ОП, некоторые аспекты его патогенеза остаются недостаточно изученными, что отражается на показателях летальности, которые колеблются в пределах от 5-21% в целом, до 85% при деструктивных формах заболевания [3, 5, 10]. В связи с этим актуальным и перспективным направлением в решении данной проблемы является дальнейшее изучение механизмов патогенеза ОП с последующей разработкой патогенетически обоснованного воздействия на них.

В настоящее время многие авторы считают, что гипоксия является важным составным звеном в развитии ОП [9, 11, 14]. Однако патогенетическая характеристика изменений кислородсвязывающих свойств крови у больных с ОП исследована недостаточно, поэтому особую значимость приобретает изучение характера обеспечения тканей поджелудочной железы (ПЖ) кислородом при данной патологии и изыскание новых методов лечения ОП.

Целью данной работы является изучение кислородтранспортной функции крови и содержания нитрат/нитритов в плазме крови при экспериментальном ОП у крыс.

Материал и методы

Эксперименты проведены на 49 нелинейных белых крысах со средней массой около 200-250 г в соответствии с этическими нормами обращения с

животными, а также требованиями мирового сообщества «Европейская конвенция по защите позвоночных, используемых для экспериментальных и иных научных целей» (Страсбург, 1986).

Все животные были разделены на 2 экспериментальные группы: 1-я – контроль (24 животных); 2-я – модель острого очагового деструктивного панкреатита (25 животных).

В контрольной группе в стерильных условиях, после обработки операционного поля под внутримышечным наркозом (использовался раствор калипсола в дозе 20 мг/кг) производили верхнесрединную лапаротомию с последующим ушиванием брюшной полости послойно наглухо.

Моделирование ОП осуществлялось по разработанной нами методике. Способ осуществляли следующим образом. В стерильных условиях, после обработки операционного поля под внутримышечным наркозом (использовался раствор калипсола в дозе 20 мг/кг) производили доступ к ПЖ путем выполнения верхнесрединной лапаротомии. В ткань ПЖ, у основания селезеночной ее части инсулиновым шприцем однократной пункцией вводили 0,1 мл 5% раствора Тритона X-100. Рану ушивали послойно наглухо. Все крысы содержались на стандартном рационе вивария.

Забор смешанной венозной крови из правого предсердия осуществляли на 3, 5 и 10 сутки от начала эксперимента, с последующим выведением животного из эксперимента путем передозировки средств для наркоза.

В смешанной венозной крови определяли парциальное напряжение кислорода (pO_2), насыщение крови кислородом (SO_2), парциальное напряжение углекислого газа (pCO_2), pH при температуре 37 °С с помощью газоанализатора “Synthesis-15” фирмы “Instrumentation Laboratory”. Кислотно-основное состояние крови определялось по номограммам Siggaard-Andersen по следующим показателям: реальный и стандартный избыток буферных основа-

ний (ABE/SBE), концентрация гидрокарбоната (HCO_3^-), общей уголекислоты (TCO_2), стандартного бикарбоната (SBC). Сродство гемоглобина к кислороду оценивалось по показателю $p50$ (pO_2 , соответствующее 50% насыщению гемоглобина кислородом), определяемого спектрофотометрически при реальных значениях pH, pCO_2 ($p50_{\text{реал}}$), которое затем корректно приводили к стандартным условиям ($p50_{\text{станд}}$) по формулам Severinghaus J.W. [13]. Положение кривой диссоциации оксигемоглобина рассчитывали по полученным значениям $p50$, используя уравнение Хилла. Содержание нитрат/нитритов в плазме крови измеряли с помощью реактива Грисса [12]. К 0,6 мл исследуемого образца добавляли 0,8 мл 30% раствора цинка сульфата и инкубировали 15 минут при комнатной температуре. Пробы центрифугировали 15 минут при 3000 об/мин. Затем к 0,8 мл супернатанта вносили по 0,8 мл гидроксида натрия, перемешивали и центрифугировали 15 минут при 3000 об/мин. К 1,0 мл прозрачной надосадочной жидкости добавляли по 0,5 г кадмия и инкубировали при комнатной температуре в течение 24 часов. Через сутки к 1 мл пробы добавляли по 2 мл реактива Грисса (1% сульфаниламид и 0,1% N-нафтилэтилендиамин дигидрохлорид), интенсивно перемешивали и через 15 минут измеряли оптическую плотность на спектрофотометре СФ-46 при длине волны 540 нм. Количество нитрат/нитритов рассчитывали по калибровочному графику, построенному с известными концентрациями нитрат/нитритов.

Статистическая обработка полученных данных выполнялась на персональном компьютере с помощью прикладных программ «Excel» и «STATISTICA 6.0». Количественные сведения выражались средними арифметическими величинами и их стандартными ошибками ($M \pm m$). Оценка достоверности выявленных различий среди абсолютных величин по $p < 0,05$ выполнена методом непараметрической статистики с использованием критерия Манна – Уитни.

Результаты и обсуждение

Изменения показателей кислотно-основного состояния крови у крыс в проведенных исследованиях представлены в таблице 1. В контрольных группах на 3, 5, 10-е сутки достоверных изменений показателей кислотно-основного состояния практически не наблюдалось. При сравнении ОП с контролем в динамике на 3 сутки отмечается снижение pH на 0,097 ед. ($p < 0,01$), pCO_2 на 7,3% ($p < 0,01$), ABE на 410,5% ($p < 0,01$), HCO_3^- на 25,9% ($p < 0,01$), TCO_2 на 25,6% ($p < 0,01$), SBE на 286,2% ($p < 0,01$), SBC на 23,9% ($p < 0,01$). На 5

сутки pH снижается на 0,182 ед. ($p < 0,001$), при этом ABE на 467,1% ($p < 0,001$), HCO_3^- на 24,8% ($p < 0,001$), TCO_2 на 23,9% ($p < 0,001$), SBE на 337,9% ($p < 0,001$), SBC на 28,6% ($p < 0,001$), а pCO_2 увеличивается на 14% ($p < 0,001$). На 10 сутки pH становится меньше на 0,051 ед. ($p < 0,001$), ABE на 117,2% ($p < 0,001$), HCO_3^- на 9,8% ($p < 0,05$), SBE на 89,2% ($p < 0,001$), SBC на 9,8% ($p < 0,05$), при этом pCO_2 достоверно не изменялось. В развитии ОП прослеживались следующие изменения: на 5 сутки снижались показатели pH на 0,08 ед. ($p < 0,001$), ABE на 24,5% ($p < 0,05$), SBE на 27,8% ($p < 0,05$), SBC на 5,9% ($p < 0,05$), увеличивалось pCO_2 на 22,6% ($p < 0,001$). К 10 суткам pH наоборот, увеличилось, по отношению к 5 суткам на 0,135 ед. ($p < 0,001$), ABE на 93,5% ($p < 0,001$), HCO_3^- на 23,7% ($p < 0,01$), TCO_2 на 22,3% ($p < 0,01$), SBE на 105,8% ($p < 0,001$), SBC на 29,2% ($p < 0,001$), при этом pCO_2 уменьшилось на 9,2% ($p < 0,01$).

Изменения показателей кислородтранспортной функции крови у крыс в проведенных исследованиях представлены в таблице 2. В контрольных группах достоверных изменений показателей кислородтранспортной функции крови также не наблюдалось. В сравнении с контролем при ОП на 3 сутки снижались pO_2 на 28,8% ($p < 0,01$), SO_2 на 16,1% ($p < 0,01$), увеличивалось $p50_{\text{реал}}$ на 15,7% ($p < 0,01$). К 5 суткам продолжали снижаться pO_2 на 37,1% ($p < 0,001$), SO_2 на 41,3% ($p < 0,001$), $p50_{\text{реал}}$ на 7,4% ($p < 0,01$), увеличивалось $p50_{\text{станд}}$ на 13,5% ($p < 0,01$). На 10 сутки также отмечается снижение pO_2 на 15% ($p < 0,01$), SO_2 на 13,5% ($p < 0,01$) и $p50_{\text{станд}}$ на 7,6% ($p < 0,05$), $p50_{\text{реал}}$ существенно не поменялось. В динамике развития ОП отмечалось: на 5 сутки снижение pO_2 на 18,1% ($p < 0,01$), SO_2 на 27% ($p < 0,01$), $p50_{\text{станд}}$ на 9% ($p < 0,02$), кривая диссоциации оксигемоглобина (КДО) смещается вправо (рисунок 1). К 10 суткам существенно увеличились, по отношению к 5 суткам, показатели pO_2 – на 43% ($p < 0,001$) и SO_2 – на 33,3% ($p < 0,01$), однако продолжали оставаться ниже контрольных; уменьшилось $p50_{\text{реал}}$ на 12,2% ($p < 0,01$).

Концентрация нитрат/нитритов в плазме крови у крыс при ОП отображена на рисунке 2. Содержа-

Таблица 1 – Изменение показателей кислотно-основного состояния крови у крыс при остром панкреатите ($M \pm m$)

Показатель	3 сутки		5 сутки		10 сутки	
	Контроль	О. панкреатит	Контроль	О. панкреатит	Контроль	О. панкреатит
n	8	8	8	9	8	8
pH, ед.	7,320±0,009	7,223±0,011*	7,325±0,004	7,143±0,006*#	7,329±0,002	7,278±0,006*#ψ
pCO_2 , мм рт.ст.	57,3±0,68	53,1±0,73*	57,1±0,62	65,1±0,98*#	58,5±0,38	59,1±0,77#ψ
ABE, ммоль/л	2,00±0,21	-6,21±0,43*	2,10±0,13	-7,71±0,40*#	2,91±0,34#	-0,50±0,33*#ψ
HCO_3^- , ммоль/л	28,6±0,36	21,2±0,77*	28,6±0,83	21,5±0,67*	29,5±0,91	26,6±0,87*#ψ
TCO_2 , ммоль/л	30,5±0,37	22,7±0,78*	30,6±0,90	23,3±0,63*	31,5±0,89	28,5±0,91#ψ
SBE, ммоль/л	2,9±0,21	-5,4±0,44*	2,9±0,14	-6,9±0,41*#	3,7±0,24#	0,4±0,33*#ψ
SBC, ммоль/л	26,8±0,62	20,4±0,92*	26,9±0,60	19,2±0,64*#	27,5±0,54	24,8±0,68*#ψ

Примечание: * - $p < 0,05$ по отношению к контрольной группе, # - по отношению к третьим суткам, ψ - по отношению к пятым суткам

Таблица 2 – Изменение показателей кислородтранспортной функции крови у крыс при остром панкреатите ($M \pm m$)

Показатель	3 сутки		5 сутки		10 сутки	
	Контроль	О.панкреатит	Контроль	О.панкреатит	Контроль	О.панкреатит
n	8	8	8	9	8	8
Гемоглобин, г/л	109,38±0,53	108,25±0,75	107,63±0,82	107,89±0,95	108,13±0,85	108,25±0,84
pO_2 , мм рт.ст.	27,1±0,64	19,3±0,73*	25,1±0,67	15,8±0,36*#	26,6±0,60	22,6±0,75*#ψ
SO_2 , %	27,4±0,70	23,0±0,71*	28,6±0,68	16,8±0,96*#	25,9±0,45	22,4±0,65*#ψ
$p50_{\text{реал}}$, мм рт.ст.	28,6±0,41	33,1±0,75*	28,8±0,46	32,7±0,45*	29,3±0,66	28,7±0,70#ψ
$p50_{\text{станд}}$, мм рт.ст.	26,4±0,48	27,5±0,69	27,0±0,41	25,0±0,31*#	27,6±0,62	25,5±0,72*

Примечание: * - $p < 0,05$ по отношению к контрольной группе, # - по отношению к третьим суткам, ψ - по отношению к пятым суткам

ние $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ на 3 сутки при ОП составляет $26,14 \pm 0,48$, что значительно выше, чем в контрольной группе – $16,37 \pm 0,52$, т.е. на 59,7% ($p < 0,01$). К пятым суткам концентрация нитратов/нитритов увеличилась еще на 37,5% ($p < 0,001$) и составила $35,94 \pm 0,95$. На 10 сутки их концентрация уменьшилась до $28,19 \pm 0,74$, т.е. на 21,6% ($p < 0,001$), но продолжала оставаться выше, по сравнению с контрольной группой ($17,91 \pm 0,30$), на 57,4% ($p < 0,001$).

Из представленных данных следует, что при ОП развивается метаболический ацидоз и снижается pO_2 крови, что приводит к развитию гипоксии. Для формирования кислородтранспортной функции крови имеют большое значение кислородсвязывающие свойства крови, и, в частности, сродство гемоглобина крови (СГК). В организме СГК в значительной степени определяет диффузию кислорода из альвеолярного воздуха в кровь, а затем на уровне капилляров в ткань. Процесс присоединения кислорода к гемоглобину является ступенчатым, присоединение молекулы кислорода к одному гему приводит к изменению микроструктуры молекулы гемоглобина и приближению плоскости соответствующего гема к плоскости глобина. Целесообразность такого хода процесса оксигенации, т.е. нелинейной зависимости насыщения гемоглобина кислородом от pO_2 , проявляется в том, что содержание кислорода в крови может оставаться достаточно высоким даже при значительном снижении pO_2 (при снижении pO_2 со 100 до 70 мм рт.ст. фракция оксигемоглобина уменьшается лишь на 5%). Клиническое выражение подобной физиологической целесообразности наблюдается у тяжелобольных с дыхательной недостаточностью, когда при существенно сниженном pO_2 (до 55-50 мм рт.ст.) остается достаточно высоким насыщение гемоглобина кислородом, что является одним из путей компенсации возникшей гипоксии [7]. При гемической гипоксии сдвиг КДО вправо, вызванный усилением синтеза 2,3-дифосфоглицерата (2,3-ДФГ) в эритроцитах ($\Delta\text{p}50 - 2,5$ мм рт. ст.), увеличивает количество поступающего в ткани кислорода на 15% [6]. Смещение КДО при ОП на 5 сутки вправо при реальных значениях pH и pCO_2 , отражает усиление механизмов, направленных на компенсацию гипоксии.

В последние годы установлено, что оксид азота (NO) имеет большое значение для формирования кислородтранспортной функции крови. Он выполняет роль аллостерического эффектора в отношении гемоглобина, изменяя его сродство к кислороду через образование различных NO-производных гемопротейна, изменения внутриэритроцитарных механизмов его регуляции, действие пероксинитрита [2]. Как видим из наших данных, концентрация нитрат/нитритов при ОП увеличивается, что отражает активизацию L-аргинин-NO системы, которая обусловлена экспрессией индуцибельной изоформы NO-синтазы [8].

Заключение

Анализ проведенных исследований указывает, что при ОП развивается падение pO_2 , кривая диссоциации оксигемоглобина сдвигается вправо на пике патологии (5 сутки), но это не приводит к сни-

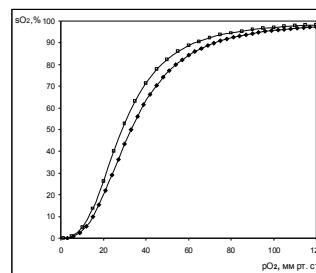


Рисунок 1 – Кривые диссоциации оксигемоглобина при реальных значениях pH, pCO_2 у крыс на 5-е сутки: □ - контроль, ◆ - острый панкреатит

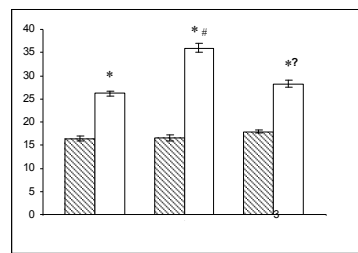


Рисунок 2 – Концентрация нитратов/нитритов в плазме крови у крыс при остром панкреатите

Примечание: по оси ординат - $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ мкмоль/л; по оси абсцисс - опытные группы: 1- 3-и сутки; 2- 5-е сутки; 3-10-е сутки; * - $p < 0,05$ по отношению к контрольной группе, # - по отношению к 3 суткам, ψ - по отношению к 5 суткам

жению проявления гипоксии, что представляет интерес к поиску средств для коррекции данных нарушений, и что в дальнейшем позволит предложить целенаправленное воздействие на механизмы прогрессирования заболевания, а, следовательно, повысить эффективность лечения данной патологии.

Литература

1. Диагностика и хирургическое лечение панкреонекроза / Э.И. Гальперин [и др.] // Хирургия. – 2003. – №3. – С.55-59.
2. Зинчук, В.В. Участие оксида азота в формировании кислород-связывающих свойств гемоглобина / В.В. Зинчук // Усп. физиол. наук. – 2003. – Т. 34, № 2. – С. 33-45.
3. Коротков, Н.И. Мининвазивные технологии в диагностике и лечении местных гнойных осложнений деструктивного панкреатита / Н.И. Коротков, А.В. Кукушкин, А.С. Метелев // Хирургия. – 2005. – №3. – С. 40-44.
4. Острый панкреатит и травмы поджелудочной железы / Р.В. Вашетко [и др.] – Спб.: Издательство «Питер», 2000. – 320 с.
5. Решетников, Е.А. Диагностика и дифференцированное лечение острого панкреатита билиарной этиологии / Е.А. Решетников, А.С. Миронов, Ю.Я. Малов // Хирургия. – 2005. – №11. – С. 25-27.
6. Роль гемоглобина в адаптации к гипоксии больных железодефицитной анемией / М.Г. Дмитриева [и др.] // Гематол. и трансфузиол. – 1994. – Т. 39, №1. – С. 13-15.
7. Рябов, Г.А. Гипоксия критических состояний / Г.А. Рябов. – М.: Медицина, 1988. – 288 с.
8. Bradyinin and ATP stimulate L – arginine uptake and nitric oxide release in vascular endothelial cells / R.G. Bogle [et al.] // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1992. – Vol.80. – P. 926-932.
9. Chen, H.M. Hyperbaric oxygen therapy attenuates pancreatic microcirculatory derangement and lung edema in an acute experimental pancreatitis model in rats / H.M. Chen, M.H. Shyr // Pancreas. – 1998. – Vol.17, №1. – P. 44-49.
10. Fernandez-Cruz, L. Minimally invasive surgery of the pancreas in progress / L. Fernandez-Cruz, G. Cesar-Borges // Surg. – 2005. – Vol.4. – P. 342-354.
11. Inhibition of TNF improves survival in an experimental model of acute pancreatitis / C.B. Hughes [et al.] // The American Surgeon. – 1996. – Vol.62, №1. – P. 8-13.
12. Reevaluation of the Griess method for determining NO/NO₂ in aqueous and protein-containing samples / K. Schulz [et al.] // Nitric Oxide. – 1999. – № 3. – P. 225-234.
13. Severinghaus, J.W. Blood gas calculator / J.W. Severinghaus // J. Appl. Physiol. – 1966. – Vol. 21, № 5. – P. 1108-1116.
14. Sweiry, J.H. Role of oxidative stress in the pathogenesis of acute pancreatitis / J.H. Sweiry, G.E. Mann // Scand. J. Gastroenterol. – 1996. – Vol.31(suppl 219). – P. 10-15.

Поступила 20.04.09