

Сергеева Я. С.¹, Серебрякова М. Л.², Грек О. Р.³, Шарапов В. И.⁴

¹Студентка 4 курса лечебного факультета, Новосибирский государственный медицинский университет, Новосибирск;

²студентка 4 курса лечебного факультета, Новосибирский государственный медицинский университет, Новосибирск;

³доктор медицинских наук, профессор, Новосибирский государственный медицинский университет, Новосибирск;

⁴доктор медицинских наук, профессор, Новосибирский государственный медицинский университет, Новосибирск.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГИДРОКСИПРОЛИНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ИНФАРКТЕ МИОКАРДА И ЕГО КОРРЕКЦИИ

Аннотация

В эксперименте изучена динамика изменений фракций гидроксипролина в сыворотке крови у крыс-самцов Вистар массой 230-250г в зависимости от продолжительности интраперитонеального введения Тромбовазима при экспериментальном инфаркте миокарда (ИМ). Выявлено, что существует четкая зависимость между степенью отклонения от нормы уровней содержания фракций гидроксипролина в сыворотке крови и наличием изменения метаболизма соединительной ткани органа. Количественное и качественное определение гидроксипролина может быть использовано в диагностике для определения степени изменения метаболизма соединительной ткани. Введением Тромбовазима достигается снижение негативных последствий ИМ за счет снижения деструкции и повышения репарации соединительной ткани.

Ключевые слова: гидроксипролин, инфаркт миокарда, Тромбовазим

Sergeeva Ya. S.¹, Serebryakova M. L.², Grek O.R.³, Sharapov V.I.⁴

¹Student 4 course of the medical faculty, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk; ²student 4 course of the medical faculty, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk;

³doctor of medical Sciences, Professor, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk;

⁴doctor of medical Sciences, Professor, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk;

QUANTITATIVE DEFINITION OF HYDROXYPROLINE IN BLOOD SERUMS AT THE EXPERIMENTAL MYOCARDIAL INFARCTION

Abstract

In the experiment was studied the dynamics of changes of hydroxyproline fractions in the serum of rats, depending on the duration of intraperitoneal administration of Trombovazim during the experimental myocardial infarction (MI). It was revealed that there is a clear correlation between the degree of deviation from the norm of hydroxyproline fractions levels in the serum and the presence of changes in the metabolism of connective tissue of the organ. With the administration of Trombovazim reduction of the negative consequences of myocardial infarction is achieved on account of reducing of the destruction and increase of the connective tissue reparation.

Keywords: hydroxyproline, myocardial infarction, Trombovazim

Инфаркт миокарда является одним из наиболее частых проявлений ИБС и одной из наиболее частых причин смерти в развитых странах. По данным В. А. Люсова (2001), распространенность инфаркта миокарда составляет около 500 на 100 000 мужчин и 100 на 100 000 женщин [4, с. 270].

Инфаркт миокарда – это ишемический некроз сердечной мышцы [7, с. 286]. В своем течение инфаркт миокарда проходит две стадии – некротическую и стадию рубцевания [7, с. 288], то есть стадию непосредственного поражения вследствие нарушения кровотока и стадию замещения пораженных тканей соединительной тканью. Таким образом, не возникает сомнений в актуальности определения активности метаболизма соединительной ткани и ее компонентов как показателей субституции миокарда.

Одним из основных видов волокон соединительной ткани являются коллагеновые волокна, которые состоят преимущественно из коллагена — фибриллярного белка, являющегося главным компонентом экстрацеллюлярного матрикса соединительной ткани. Особенностью строения данного белка является то, что 1/3 всех аминокислотных остатков составляет глицин, 1/3 — пролин и гидроксипролин, около 1% — гидроксизалин [1, с.662].

Важнейшим показателем метаболизма коллагена является содержание гидроксипролина. При нарушениях синтеза коллагена уменьшаются поперечные связи в фибриллах коллагена, что приводит к возрастанию содержания легкорастворимого коллагена. Поэтому у больных с нарушенным метаболизмом соединительной ткани увеличивается содержание в сыворотке крови его свободной фракции и уменьшается содержание связанной фракции. Таким образом, можно считать свободную фракцию гидроксипролина маркером деструкции, белковую – маркером репарации, а пептидосвязанную – маркером активности метаболизма коллагена в целом.

Исходя из выше сказанного, можно выдвинуть гипотезу о том, что при помощи определения гидроксипролина можно оценить процессы репарации в миокарде.

В целях ускорения регенерации тканей необходимо создание условий усиленной трофики, что зачастую достигается при помощи различных лекарственных препаратов. Один из таких препаратов – Тромбовазим.

Тромбовазим - препарат, полученный методом электронно-лучевой иммобилизации молекулы субтилилина молекулой полиэтиленгликоля в Сибирском центре фармакологии и биотехнологии. Тромбовазим лизирует субстраты денатурированного белка в полостях и тканях, очищает сосудистое русло от продуктов повреждения тканей, уменьшает концентрацию фибрина в кровотоке, снижает степень тромбинемии и нормализует показатели внутрисосудистого микротромбообразования.

Цель: обосновать метод количественного определения фракций гидроксипролина в сыворотке крови, как маркера метаболизма соединительной ткани, при экспериментальном инфаркте миокарда и при введении Тромбовазима. Изучить влияние Тромбовазима на метаболизм соединительной ткани посредством исследования содержания фракций гидроксипролина в сыворотке крови при экспериментальном инфаркте миокарда.

Материалы и методы исследования. Для эксперимента были использованы 30 крыс-самцов Wistar массой 230-250г в возрасте 4 месяцев.

Наркоз проводился интраперитонеальным введением смеси золетила и ксилозина. Далее проводилась операция окклюзии коронарной артерии путем наложения на нее лигатуры. Для создания оперативного доступа на уровне 3-6 ребер. Отступая влево от грудины на 1 см производилось рассечение кожи, мышц и 4-ого, 5-ого и 6-ого ребер. Затем на левую нижнюю открывающую коронарную артерию накладывали лигатуру на расстоянии около 3 мм ниже левого предсердия. Время нахождения в открытой грудной клетке составляло не более 3 мин. Затем рану зашивали с последующей обработкой антибиотиком (ампициллином).

Прооперированные животные были разделены на группы: группа №1 – контрольная, группа №2 – опытная. Группе №2 через 15 мин после операции вводили внутривенно раствор Тромбовазима (180 ЕД/кг в 2 мл физиологического раствора). Затем в течение месяца инъекции Тромбовазима осуществлялись два раза в сутки (в утренние и вечерние часы). Группе №1 в соответствующие интервалы времени проводили внутривенное введение физиологического раствора в объеме 2 мл.

Далее все животные были перераспределены по следующим группам: группа №1- интактные крысы, группа №2 – ИМ + введение физ. р-ра 7дней, группа №3 – ИМ + лечение Тромбовазимом 7дней, группа №4 – ИМ + введение физ. р-ра 1мес, группа №5 – ИМ + лечение Тромбовазимом 1 мес.

Затем под наркозом производился забор крови в целях определения фракций гидроксипролина (свободной, пептидно- и белковосвязанной) по методу Кузнецовой Т. П. (принцип метода основан на определении оптической плотности красного хромогена, полученного в результате конденсации продуктов окисления гидроксипролина с пара - диметиламинобензальдегидом).

Кровь центрифугировалась. В центрифужную пробирку добавляли 1мл сыворотки, 0,5 мл 5%-й трихлоруксусной кислоты и 0,5 мл 5%-й хлорной кислоты. Затем проводили центрифугирование при 3000 об/мин 6 минут. Надосадочную жидкость распределяли по 0,75 мл в две пробирки для определения свободной (пробирка №1) и пептидосвязанной (пробирка №2) фракций. Осадок использовался для определения белковосвязанной фракции (пробирка №3).

Содержимое пробирки №1 нейтрализовали 24% раствором NaOH в присутствии индикаторного раствора (до появления устойчивой слабопурпурной окраски).

Содержимое пробирки №2 гидролизвали в водяной бане 40 минут при температуре 60°C. Затем также нейтрализовали 24% раствором NaOH в присутствии индикаторного раствора (до появления устойчивой слабопурпурной окраски).

К содержимому пробирки №3 добавляли 0,5 мл дистиллированной воды, 0,5 мл 5%-й трихлоруксусной кислоты и 0,5 мл 57%-й хлорной кислоты, гидролизвали в водяной бане 6 часов при температуре 60°C. Далее добавляли 0,25 г активированного угля и центрифугировали при 3000 об/мин 6 минут. Прозрачную часть гидролизата нейтрализовали 24% раствором NaOH в присутствии индикаторного раствора (до появления устойчивой слабопурпурной окраски).

Далее во все пробирки добавляли 0,5 мл раствора хлорамина Б, 0,5 мл 57%-й хлорной кислоты и 0,5 мл пара - диметилбензальдегида. Смесь помещали в водяную баню на 20 мин при 60°C. Затем измеряли оптическую плотность содержимого пробирок № 1- 3 при 557 нм. Расчет концентрации фракций гидроксипролина производился по калибровочной кривой. Полученные данные обрабатывали с использованием статистической программы «SPSS for Windows 17.0», с вычислением медианы (Me) и интерквартильного размаха (Q₁; Q₃). Различия между группами сравнения определяли по Манну-Уитни (p<0,05).

Результаты исследования. Смертность животных составила 24%. Признаки ишемии сердца наблюдалось визуально вскоре после перевязки артерии и выражались в побледнении зоны ишемии в первые 30-40 секунд, с последующим цианозом; в ослаблении сокращений в зоне ишемии и некоторой дилатации Наблюдаемое развитие ишемии совпадает с описанным в литературе (Асташов В.В., 1993).

Содержание фракций ГП в сыворотке крови при экспериментальном инфаркте миокарда при лечении тромбовазимом

Условия экс/фракции	СГП	ПГП	БГП
КОНТРОЛЬ –Интактные	7±2,6	76,3±14,8	317,4±71,9
ИМ + Физ. р-р. 7 дней	19,5±3,3	10,7±2	68,1±9,6
ИМ + Тромбовазим 7 дней	43,3±7,2	50,1±16,7	78,5±13,1
ИМ + Физ. р-р 1 мес	33,4±13,2	26,1±5,4	279,4±145
ИМ + Тромбовазим 1 мес	11,6±3,7	43,6±7,3	248,8±86

Как видно из таблицы в семидневном эксперименте наиболее выражены изменения в свободной фракции гидроксипролина (биохимического маркера деструкции белка коллагена), в группе №2 показатель увеличился в 1,5 раза (p< 0,05), а в группе №3 в 5 раз (p< 0,05). Помимо этого, отмечается понижение белковосвязанного гидроксипролина (биохимического маркера репарации коллагена) в группе №2 на 79% (p< 0,05) и в группе №3 на 75% (p< 0,05). Изменения данных показателей свидетельствуют о активации катаболизма и депрессии анаболизма соединительной ткани.

В группах №4 (ИМ + введение физ. р-ра 1мес) и №5 (ИМ + лечение тромбовазимом 1 мес) в сравнение с интактной так же наблюдается резкое увеличение титра свободного гидроксипролина и снижение белковосвязанного.

При оценке динамических показателей были отмечены следующие изменения: в группах № 2 и 4 (группы с применением физ. р-ра) выявлено увеличение свободного гидроксипролина в 1,5 (p< 0,05) и в 4 (p< 0,05) раза соответственно, в то время как в группах №3 и 4 (с применением Тромбовазима) в 5 (p< 0,05) и 0,6 (p< 0,05) раза. Это указывает на то, что в группах без лечения отмечается тенденция к прогрессии катаболизма коллагена, а в группах с применением Тромбовазима, наоборот, происходит затухание деструкции коллагена. Так же особого внимания заслуживают изменения в белковосвязанной фракции: не смотря на то, что относительно интактной группы показатели других групп снижены (группа №2 – на 79% (p< 0,05), №3 – на 75% (p< 0,05) №4 – на 21% (p< 0,05), №5 – на 22% (p< 0,05)), наблюдается постепенное нарастание титра, что свидетельствует об активации синтеза коллагена и интенсивной регенерации соединительной ткани.

Из представленных выше данных следует вывод о влиянии Тромбовазима - резкое снижение деструкции (снижение свободного гидроксипролина почти в 4 раза (p< 0,05) в группе №5 сравнительно с группой №3) при активной репарации (увеличение белковосвязанного гидроксипролина почти в 3 раза (p< 0,05) в группе №5 сравнительно с группой №3). Влияние на метаболизм противоречиво: не смотря на низкую скорость восстановления нормального метаболизма (в группе №3 на 1,5% (p< 0,05) в сравнение с интактной, а в группе №5 на 1,75 %) при лечении Тромбовазимом, показатель почти в 2 (p< 0,05) раза выше по сравнению с группами с применением физ. раствора (p< 0,05). Это указывает на более высокий уровень восстановления метаболизма при лечении Тромбовазимом.

Выводы:

1. Отмечена четкая зависимость между степенью отклонения от нормы уровней содержания фракций гидроксипролина в сыворотке крови и наличием изменения метаболизма соединительной ткани;
2. Количественное и качественное определение гидроксипролина может быть использовано в диагностике для определения уровня метаболизма соединительной ткани;
3. Тромбовазим способствует стабилизации метаболизма соединительной ткани, что проявляется снижением негативных последствий инфаркта миокарда.

Литература

1. Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф. Биологическая химия. — М.: Медицина, 1998. — 704 с.
2. Дайхин Е.И., Козлова Н.И., Сиванова Л.А. Некоторые актуальные проблемы биохимической диагностики патологии соединительной ткани // Педиатрия. — 1983. — №4. — С. 68-70.
3. Кадурина Т.И. Наследственные коллагенопатии. Клиника, диагностика, лечение, диспансеризация. — СПб.: Невский диалект, 2000. — 270 с.
4. Окорочков А. Н. Диагностика болезней внутренних органов: Т. 6 Диагностика болезней сердца и сосудов.: - М.: Мед. Лит., 2003. – 464 с.
5. Серов В.В., Шехтер А.В. Соединительная ткань — М.: Медицина, 1981. — 312 с.
6. Слудкий Л.И. Биохимия нормальной и патологически измененной соединительной ткани. — М.: Медицина, 1969. — 375 с.
7. Струков А. И., Серов В. В. Патологическая анатомия – М.: Медицина, 1995 – 688 с.
8. Шараев П.Н. Метод определения свободного и связанного оксипролина в сыворотке крови // Лаб. дело. — 1981. — №5. — С. 283-285.

References

1. Berezov T.T., Korovkin B.F. Biologicheskaja himija. — M.: Medicina, 1998. — 704 s.
2. Dajhin E.I., Kozlova N.I., Sivanova L.A. Nekotorye aktual'nye problemy biohimicheskoj diagnostiki patologii soedinitel'noj tkani // Pediatrija. — 1983. — №4. — S. 68-70.
3. Kadurina T.I. Nasledstvennyye kollagenopatii. Klinika, diagnostika, lechenie, dispanserizacija. — SPb.: Nevskij dialekt, 2000. — 270 s.
4. Okorokov A. N. Diagnostika boleznej vnutrennih organov: T. 6 Diagnostika boleznej serdca i sosudov.: - M.: Med. Lit., 2003. — 464 s.
5. Serov V.V., Shehter A.V. Soedinitel'naja tkan' — M.: Medicina, 1981. — 312 s.
6. Sluckij L.I. Biohimija normal'noj i patologicheski izmenennoj soedinitel'noj tkani. — M.: Medicina, 1969. — 375 s.
7. Strukov A. I., Serov V. V. Patologicheskaja anatomija — M.: Medicina, 1995 — 688 s.
8. Sharaev P.N. Metod opredelenija svobodnogo i svjazannogo oksiprolina v syvorotke krovi // Lab. delo. — 1981. — №5. — S. 283-285.

Стронина С.Н.¹, Клестова Е.О.²

^{1,2}Студент, НИУ «БелГУ» Медицинский институт, Факультет лечебного дела и педиатрии

СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К ДИАГНОСТИКЕ И ЛЕЧЕНИЮ ГАСТРОШИЗИСА В БЕЛГОРОДСКОЙ ОБЛАСТИ

Аннотация

В статье рассмотрено – анализ частоты встречаемости детей с врождённым заболеванием Гастрошизис в Белгородской области за период с 2008 по 2012 гг., сравнение частоты встречаемости дефекта с периодом 2003-2007гг, а так же выявление основных факторов, предрасполагающих к развитию порока, определение принципов современных методов диагностики и лечения. Анализ причин летальности детей с данным пороком развития.

Ключевые слова: заболевание гастрошизис, новорождённые, выживаемость, летальность.

Stronina S.N.¹, Klestova E.O.²

^{1,2}Student, NIU "BSU" Medical Institute, Faculty of general medicine and pediatrics

MODERN APPROACHES TO DIAGNOSIS AND TREATMENT OF GASTROSCHISIS IN THE BELGOROD REGION

Abstract

The article considers - the analysis of frequency occurrence children with congenital disease Gastroschisis in Belgorod region for the period from 2008 to 2012., Comparing frequency occurrence the defect with the period 2003-2007, as well as identification of the main factors predisposing to the development blemish the definition of principles of modern methods diagnosis and treatment. Analysis of the causes lethality of children with this malformation.

Keywords: disease gastroschisis, neonates, survival, mortality.

Во всем мире ежегодно все больше рождаются детей с врожденными пороками развития, десятки и сотни тысяч из них жизнеспособны. Врожденные пороки занимают одно из первых мест в структуре детской заболеваемости, а также перинатальной и ранней детской смертности.[2] Возможно, это связано с повышением в окружающей среде веществ, являющихся тератогенными, увеличением контакта населения с источниками ионизирующего излучения, а так же с успехами в фармацевтической, химической и других отраслях промышленности. Помимо этих факторов, возможному увеличению частоты ВПР способствуют не всегда оправданные попытки сохранения любой беременности, а также успехи современной хирургии в коррекции врожденных дефектов.[1]

Актуальность данной проблемы обусловлена тем, что на данное время, остается высоким процент рождаемости детей с диагнозом Гастрошизис, и низким процент выживаемости.[4] Так же, не менее интересен тот факт, что выживаемость детей с данным видом порока, например в США 95-97%. [3]

Цель исследования: анализ частоты встречаемости детей с гастрошизисом в Белгородской области за период с 2008 по 2012 гг., сравнение частоты встречаемости дефекта с периодом 2003-2007гг, а так же выявление основных факторов, предрасполагающих к развитию порока, определение принципов современных методов диагностики и лечения. Анализ причин летальности детей с данным пороком развития.

Материалы и методы исследования: Проведен ретроспективный анализ историй болезней детей, родившихся с гастрошизисом за период с 2008-2012г. Проведен анализ основных факторов, предрасполагающих к пороку. Проанализированы основные принципы современных методов диагностики и лечения. Анализ данных детского отделения патологоанатомического бюро с целью выявления причин смертности детей с гастрошизисом.

Результаты и собственные наблюдения.

К основным факторам, способствующим развитию данного порока относятся: возраст родителей до 20 лет, инфекция мочеполовой системы и ЗППП, употребление психоактивных средств в I триместре беременности, аспирина, кортикостероидов, работа на вредных производствах, а также генетическая предрасположенность (отмечаются случаи семейного заболевания с аутосомно-доминантным типом наследования).

Диагностировать данный порок с помощью УЗИ можно уже с 12 недели гестации, а так же с помощью определения АФП в крови матери с 14-15 недель. В некоторых случаях возникают проблемы дифференциальной диагностики гастрошизиса с омфалоцеле. В отличие от омфалоцеле при гастрошизисе пуговина прикрепляется не к грыжевому образованию, а к передней брюшной стенке. Кроме этого при омфалоцеле эвентрированные органы покрыты мембраной, а при гастрошизисе они свободно располагаются в околоплодных водах.

Нами были исследованы истории болезней детей, родившихся с гастрошизисом и проходивших лечение в хирургических отделениях ОДБ за период с 2008 по 2012 гг., протоколы патологоанатомических исследований умерших детей отделения детской патологии. Проанализировав все, мы выявили, что в Белгородской области за данный промежуток времени с гастрошизисом родилось 11 детей, 6 - умерли, а 5 были прооперированы с дальнейшим выздоровлением. Так же, по поводу гастрошизиса было произведено 11 прерываний.

Мы выявили, что частота встречаемости данного порока развития в Белгородской области за период 2008-2012гг составила приблизительно 0,1‰, что в целом ниже, чем за период 2003-2007гг.; При анализе причин смертности выяснилось, что в периоде 2008-2012гг. множественные пороки развития стали причиной смерти лишь у 33% детей, в то время как за период 2003-2007 гг. эта причина являлась ведущей (70, 5% новорождённых). 83% умерших имели изолированный порок, но умерли от осложнений, связанных с наличием инфицирования околоплодной среды. Выживаемость в Белгородской области составила в периоде 2008-2012гг 46%, а в периоде 2003-2007гг. 50%.

В последнее время в Белгородской области преимущественными методами лечения является Безнаркозное Вправление по А. Bianchi, в то время как за период 2003г-2007гг. первостепенную роль отдавали радикальной пластике передней брюшной стенки местными тканями и применение мешка Шустера;