

Заключение

Таким образом, после лазерного воздействия в склеротически измененной поджелудочной железе регистрируются выраженная гиперплазия и гипертрофия ацинарных клеток, увеличение числа кровеносных сосудов и выводных протоков на условной площади, снижение объемной доли фиброзной ткани. Наблюдаемый в поджелудочной железе неангиогенез является подтверждением

того, что процесс репарации ткани в ответ на лазерное повреждение является типовым воспалительным ответом, сопровождающимся восстановлением структуры органа [4]. Результаты экспериментально-морфологического исследования свидетельствуют о возможности стимуляции регенераторных процессов и обратимости склеротических изменений органа в поджелудочной железе с помощью лазерной туннелизации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Баранов А.А. Проблемы детской гастроэнтерологии на современном этапе // Российский гастроэнтерологический журнал. – 1995. – № 1. С. 7-11.
2. Бокерия Л.А. Трансмиокардиальная и эндомиокардиальная лазерная реваскуляризация – новый метод хирургического лечения ишемической болезни сердца. Минимально инвазивная хирургия сердца. – М.: НЦССХ РАМН им. А. Н. Бакулева, 1998. – С. 23-40.
3. Гарбузенко Д.В. Лазерная реваскуляризация цирротически измененной печени как способ лечения портальной гипертензии // Анналы хирургической гепатологии. – 2004. – Т.9, №2. – С. 216-218.
4. Головнева Е.С. Механизм универсальной активации неангиогенеза после воздействия высокоинтенсивного лазерного излучения на ишемизированные ткани // Вестник новых медицинских технологий. – 2003. – Т.10, №1-2. – С. 15-17.
5. Евдокимов С.В. Трансмиокардиальная лазерная реваскуляризация у больных с рефрактерной стенокардией (ближайшие результаты) // Лазерная медицина. – 2005. – №9(2). – С. 13-15.
6. Лопаткина Т.Н. Хронический панкреатит // Новый медицинский журнал. – 1997. – № 2. – С. 7-11.
7. Хазанов А.И. Основные подходы к лечению хронического панкреатита // Российские медицинские вести. – 1997. – № 2. – С. 4-10.
8. Шалимов С.А. и др. Руководство по экспериментальной хирургии. – М.: Медицина, 1989. – С. 190-191.
9. Eckhauser, F. Subtotal Pancreatectomy for Chronic Pancreatitis / F. Eckhauser, R. Cowles, L. Colletti // World journal of Surg. - 2003. - Vol. 27. - P. 1231-1234.

УДК: 617.741-004.1-092.9
© В.А. Сумеркина, 2009

В.А. Сумеркина

ФАКТОРЫ ПОДДЕРЖАНИЯ ПРОЗРАЧНОСТИ ХРУСТАЛИКА IN VITRO

ГОУ ВПО ЧелГМА Росздрава, Челябинск

В условиях *in vitro* изучали роль кальциевых и водных каналов (аквапоринов) в патогенезе катаракты, а также механизмы гуморальной регуляции прозрачности хрусталика. Установлено, что блокада аквапоринов вызывает помутнение хрусталика в более короткие сроки, чем изменение концентрации ионов кальция в культуральной среде. Функционирование водных каналов эпителия капсулы хрусталика находится под регуляторным влиянием вазопрессина, локальной ренин-ангиотензиновой системы и эстрогенов.

Ключевые слова: хрусталик, катарактогенез, аквапорины, вазопрессин, эстрогены, локальная ренин-ангиотензиновая система.

V.A. Sumerkina

FACTORS FOR MAINTAINING THE LENS TRANSPERANCY IN VITRO

The *in vitro* study of the role of calcium and aqua pores in the cataract pathogenesis as well as humoral regulation mechanisms of the lens transparency was conducted. It has been shown that aqua pore block causes lens opacity within a shorter period of time than the change of calcium ion concentration in the cultural medium. The functioning of the lens capsule epithelium is regularly affected by vasopressin, local renin-angiotensive system and estrogens.

Key words: lens, cataract genesis, aqua pores, vasopressin, estrogens, local rennin-angiotensive system.

В последние годы предпринимаются попытки разработать нехирургические способы лечения катаракты, что требует исследования патологических механизмов, лежащих в основе потери прозрачности хрусталика. В литературе в качестве индукторов катарактогенеза обсуждаются нарушения углеводного, электролитного, водного

гомеостаза хрусталика, воздействие токсических агентов, ионизирующей радиации [5, 15]. Представляется актуальным определить патологический фактор, который в наибольшей степени оказывает негативное влияние на прозрачность хрусталика.

Ключевая роль в обеспечении нормальной жизнедеятельности хрусталика принадлежит метаболически активным пролиферирующим клеткам эпителия передней капсулы, обладающим всеми целлюлярными компартментами. Эпителий выполняет функцию доставки питательных и регуляторных веществ к волокнистым клеткам ядра хрусталика. Именно эпителиальный слой передней капсулы первым реагирует на изменения окружающей среды, регулируя проницаемость клеточных мембран для различных молекул, что поддерживает водный гомеостаз и энергетическое обеспечение остальных структур хрусталика. Дисфункциональные нарушения в системе эпителий капсулы – волокнистые клетки хрусталика вызывают изменение структуры водорастворимых белков – кристаллинов и, следовательно, помутнение. Цель исследования – в условиях *in vitro* изучить влияние на водный гомеостаз хрусталика гуморальных регуляторов (вазопрессин, эстрогены, ангиотензинпревращающий фермент – АПФ).

Материал и методы

Эксперименты были проведены *in vitro* на 313 изолированных хрусталиках взрослых лабораторных крыс обоего пола. Исследуемые хрусталики были культивированы в стерильном физиологическом растворе, сбалансированном по содержанию ионов кальция (0,7 мМ) и глюкозы (5 мМ).

В первой серии экспериментов изучалось воздействие на прозрачность хрусталика повышенного содержания ионов кальция (15 мМ) (n=31), блокады кальциевых каналов верапамилом ($1,5 \times 10^{-2}$ мМ) (n=31), а также блокады аквапоринов эпителия капсулы (AQP1) хлоридом ртути (HgCl_2 0,3 мМ) (n=31). Хрусталики контрольной группы культивировали в физиологическом растворе без добавления катарактогенных веществ (n=31).

Во второй серии экспериментов изучалось влияние различных гуморальных факторов (вазопрессин, эстрогены, ренин-ангиотензиновая система) на состояние водного гомеостаза хрусталика в условиях *in vitro*. В качестве источника вазопрессина был выбран экстракт гипофиза крысы. Хрусталики культивировали в среде, содержащей различные концентрации экстракта гипофиза (0,02 % (n=31); 0,03 % (n=31); 0,04 % (n=31) и 0,05 % (n=31)). Влияние ренин-ангиотензиновой системы на прозрачность хрусталика в условиях *in vitro* изучали при добавлении в культуральную среду 23 пМ каптоприла (n=33), что обеспечивает 50-процентное снижение активности АПФ фермента. Для оценки эффекта эстрогенов хрусталики культивировали в среде, содержащей 100 пМ синэстрола (синтетический эстрогенный препарат нестероидного строения) (n=32).

На протяжении всего периода инкубирования визуально оценивали прозрачность хрусталиков, используя разлинованную подложку, а также определяли изменение массы хрусталиков (ΔM , %). Все исследуемые хрусталики взвешивали на торсионных весах сразу после извлечения из глаза (M_0 , мг) и через одни сутки культивирования (M_1 ,

мг). Рассчитывали изменение массы хрусталиков ΔM , %:

$$\Delta M = ((M_1 - M_0) / M_0) \times 100, \%$$

Полученные экспериментальные данные были проверены на нормальность распределения с помощью критериев Колмогорова-Смирнова, Шапиро-Уилка, Эппса-Палли. Для установления различия в наблюдаемых независимых выборках использовали непараметрические критерии Колмогорова-Смирнова, Вилкоксона-Манна-Уитни и Крамера-Уэлча. Доверительная вероятность 95 %.

Результаты и обсуждение

Результаты влияния различных катарактогенных факторов на длительность сохранения прозрачности хрусталиков приведены в табл. 1.

Таблица 1
Сравнительная оценка сроков помутнения хрусталиков при добавлении в среду катарактогенных факторов ($M \pm m$, сутки)

Группа	Срок появления помутнения, сутки		
	2-я степень (начальное помутнение)	3-я степень (промежуточное помутнение)	4-я степень (полное помутнение)
Контроль (физио- раствор) (n=31)	2,7±0,23	4,9±0,25	6,5±0,33
Избыток ионов Ca^{2+} в среде (CaCl_2 15 мМ) (n=31)	1,3±0,08	2,8±0,11	4,1±0,16
Блокада кальциевых каналов (верапамил $1,5 \times 10^{-2}$ мМ) (n=31)	2,2±0,17	4,4±0,29	4,5±0,30
Блокада аквапоринов (HgCl_2 0,3 мМ) (n=31)	1,0±0,03	1,6±0,09	2,0±0,09

Как свидетельствует таблица, различные патологические факторы по-разному влияют на прозрачность хрусталика. Отклонение концентрации ионов кальция от физиологического уровня вызывает нарушение системы кальциевой сигнализации, что запускает каскад патологических процессов: активацию протеаз, ингибирование Na,K-АТФазы, повышение мембранной проницаемости, синтез патологических белков, нарушение пространственной структуры нормальных белков, активацию тока кальция в клетку. Повышенная концентрация ионов кальция нарушает работу натриевых насосов, оказывая прямое цитотоксическое действие [14]. Все вышеперечисленные факторы приводят к нарушению молекулярной структуры кристаллинов хрусталика и его помутнению [1, 4, 5, 11, 12, 13]. В литературных источниках имеются сведения, подтверждающие этот факт. Так, концентрация ионов кальция у больных сенильной катарактой в 4 раза выше, чем у здоровых лиц [3]. Низкая концентрация Ca^{2+} не оказывает стимулирующего влияния на внутриклеточные ферменты (протеиназы), участвующие в метаболических процессах, что также способствует формированию катаракты. Кроме того, низкий уровень ионов Ca^{2+} приводит к повышению проницаемости водных каналов, что неизбежно вызывает помутнение хрусталика [7]. Полученные в ходе экспериментов результаты совпадают с литературными сведениями.

Однако большее значение в развитии помутнения хрусталика играет дисфункция водных

каналов. Блокада аквапоринов эпителия AQP1 вызывает нарушение циркуляции жидкости между эпителием капсулы и волокнистыми клетками ядра хрусталика, что приводит к повреждению структуры водорастворимых белков-кристаллинов, которые определяют прозрачность хрусталика, а также обладают активностью белков теплового шока и шаперонов. В результате развивается помутнение хрусталика [10, 15].

Описанные выше результаты экспериментов свидетельствуют, что прозрачность хрусталика в условиях *in vitro* в значительной степени зависит от функционирования водных каналов – аквапоринов эпителия капсулы. В этой связи представляется актуальным исследовать возможные механизмы регуляции активности аквапоринов AQP1 эпителия хрусталика, что и послужило основной целью следующей серии экспериментов (табл. 2, 3) [2, 6, 9].

Таблица 2
Сравнительная оценка сроков помутнения и изменения массы хрусталиков (ΔM , %) при культивировании в среде, содержащей экстракт гипофиза в различной концентрации ($M \pm m$)

Параметр	Контроль (n=31)	Концентрация экстракта гипофиза			
		0,02 % (n=31)	0,03 % (n=31)	0,04 % (n=31)	0,05 % (n=31)
Изменение массы через одни сутки культивирования ΔM , %	8,87±1,429	9,14±1,238	4,06±1,041	6,94±1,741	12,61±9,61
Начальное помутнение (2-я степень), сутки	2,7±0,23	2,5±0,17	2,1±0,14	1,6±0,11	1,5±0,10
Промежуточное помутнение (3-я степень), сутки	4,9±0,25	5,7±0,32	6,3±0,30	3,7±0,21	4,3±0,23
Полное помутнение (4-я степень), сутки	6,5±0,33	8,6±0,45	10,3±0,53	8,3±0,36	8,7±0,40

Статистически значимых различий между изменением массы хрусталиков, культивированных в физиологическом растворе (контрольная группа) и в среде, содержащей 0,02; 0,04 и 0,05 % экстракта гипофиза, не установлено. Однако при культивировании хрусталиков в среде, содержащей экстракт гипофиза в концентрации 0,03 %, отмечается достоверно меньшее изменение массы, чем в контрольной группе (доверительная вероятность 0,95).

При сопоставлении изменения массы культивируемых хрусталиков и сроков формирования помутнения прослеживается вполне определённая закономерность – чем меньше изменяется масса хрусталиков, тем дольше сохраняется их прозрачность. Это характерно для всех степеней помутнения, однако в большей мере для полной потери прозрачности хрусталиков (4-я степень). Если при обычных условиях культивирования в физиологическом растворе 4-я степень помутнения развивается на $6,5 \pm 0,33$ сутки, то при добавлении различных концентраций экстракта гипофиза полное помутнение формируется на 2 – 4 суток позднее. Очевидно, меньшее, по сравнению с контролем изменение массы хрусталиков при добавлении в среду экстракта гипофиза 0,03 % связано с активацией функции аквапоринов, что позволяет установить оптимальный баланс циркулирующей жидкости в хрусталике.

Таблица 3
Сроки формирования различных степеней помутнения и изменения массы хрусталиков (ΔM , %) при культивировании в среде, содержащей эстрогены, и в условиях блокады АПФ ($M \pm m$)

Параметр	Контроль (n=31)	Блокада АПФ каптоприлом (n=33)	Эстрогены (n=32)
Изменение массы через одни сутки культивирования ΔM , %	8,87±1,429	8,62±0,919	14,43±0,785
Начальное помутнение (2-я степень), сутки	2,7±0,23	2,1±0,14	2,3±0,17
Промежуточное помутнение (3-я степень), сутки	4,9±0,25	5,3±0,24	5,6±0,27
Полное помутнение (4-я степень), сутки	6,5±0,33	9,0±0,37	8,6±0,44

Увеличение массы хрусталиков в условиях блокады ангиотензинпревращающего фермента не различается с контрольной группой (доверительная вероятность 0,95) (табл. 3). Ингибитор АПФ каптоприл позволяет сохранять прозрачность хрусталиков до $9,0 \pm 0,37$ суток, что достоверно больше, чем в контрольной группе. В ряде работ показано, что в структурах глаза экспрессируются все компоненты ренин-ангиотензиновой системы. Предполагается, что они участвуют в регуляции продукции внутриглазной жидкости. Возможно, локальная ренин-ангиотензиновая система оказывает воздействие на систему циркуляции жидкости в хрусталике [9]. Эксперименты показали положительное влияние блокады АПФ на прозрачность хрусталика, однако механизм указанного воздействия требует дальнейшего изучения.

По литературным данным, эстрогены способствуют поддержанию прозрачности хрусталика, повышая переживаемость эпителиальных клеток капсулы [2, 8]. Однако система регуляторного воздействия эстрогенов на водный гомеостаз хрусталика не описана. Культивирование хрусталиков в среде, содержащей 100 nM синэстрола, приводит к значительно большему увеличению их массы, чем в контрольной группе. Увеличение массы хрусталиков можно связать с активацией аквапоринов, что приводит к избыточному скоплению воды под капсулой хрусталика. Однако, несмотря на это обстоятельство, полное помутнение наступает на $8,6 \pm 0,44$ сутки, что достоверно дольше, чем в контрольной группе ($6,5 \pm 0,33$ сутки). Наблюдаемое нами влияние эстрогенов на прозрачность хрусталика можно объяснить блокированием процессов перекисного окисления липидов, но для понимания механизмов регуляции водного гомеостаза хрусталика эстрогенами требуются дополнительные исследования.

Выводы

1. Одним из ключевых факторов, индуцирующих формирование катаракты, является нарушение водного гомеостаза хрусталика.
2. К основным гуморальным регуляторам активности аквапоринов можно отнести вазопрессин, локальную ренин-ангиотензиновую систему, эстрогены. Эти компоненты в физиологических условиях содержатся во внутриглазной жидкости, однако механизмы их регуляторного воздействия в отношении баланса воды требуют уточнения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Calcium-induced opacification and proteolysis in the intact rat lens / R.J.W. Truscott, J.M. Marcantonio, J. Tomlinson et al. // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* - 1990. - Vol. 31. - № 11. - P. 2405-2411.
2. Estrogen protects lenses against cataract induced by transforming growth factor- β (TGF β) / A.M. Hales, C.G. Chamberlain, C.R. Murphy et al. // *J. Exp. Med.* - 1997. - Vol. 185. - P. 273-280.
3. Functional impairment of lens aquaporin in two families with dominantly inherited cataracts / P. Francis, J.-J. Chung, M. Yasui et al. // *Hum. Mol. Genet.* - 2000. - Vol. 9. - № 15. - P. 2329-2334.
4. Gupta P.D. Causative and preventive action of calcium in cataractogenesis / P.D. Gupta, K. Johar, A. Vasavada // *Acta Pharmacol Sin.* - 2004. - Vol. 25. - P. 1250-1256.
5. Influence of age, diabetes, and cataract on calcium, lipid-calcium, and protein-calcium relationships in human lenses / D. Tang, D. Borchman, M.C. Yappert et al. // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* - 2003. - Vol. 44. - № 5. - P. 2059-2066.
6. Marples D. Long-term regulation of aquaporins in the kidney / D. Marples, J. Frøkiaer, S. Nielsen // *Am.J. Physiol. Renal Physiol.* - 1999. - Vol. 276. - F. 331-339.
7. Németh-Cahalan K.L. pH and calcium regulate the water permeability of aquaporin 0 / K.L. Németh-Cahalan, J.E. Hall // *J. Biol. Chem.* - 2000. - Vol. 275. - № 10. - P. 6777-6782.
8. Oxidative damage to human lens epithelial cells in culture: estrogen protection of mitochondrial potential ATP, and cell viability / X. Wang, J.W. Simpkins, J.A. Dykens et al. // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* - 2003. - Vol. 44. - № 5. - P. 2067-2075.
9. Paul M. Physiology of local renin-angiotensin systems / M. Paul, A.P. Mehr, R. Kreutz // *Physiol. Rev.* - 2006. - Vol. 86. - P. 747-803.
10. Regulation of aquaporin water permeability in the lens / K. Varadaraj, S. Kumari, A. Shiels et al. // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* - 2005. - Vol. 46. - P. 1393-1402.
11. Role of calcium-dependent protease(s) in globalization of isolated rat lens cortical fiber cells / L.-F. Wang, B.N. Christensen, A. Bhatnagar et al. // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* - 2001. - Vol. 42. - P. 194-199.
12. Role of the endoplasmic reticulum in shaping calcium dynamics in human lens cells / M.R. Williams, R.A. Riach, D.J. Collinson et al. // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* - 2001. - Vol. 42. - P. 1009-1017.
13. Sanderson J. A human lens model of cortical cataract: Ca²⁺-induced protein loss, vimentin cleavage and opacification / J. Sanderson, J.M. Marcantonio, G. Duncan. // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* - 2000. - Vol. 41. - P. 2255-2261.
14. The influence of calcium on the rabbit lens sodium pump / N.A. Delamere, C.A. Paterson, D. Borchman et al. // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* - 1993. - Vol. 34. - № 2. - P. 405-412.
15. Transcellular water transport in lung alveolar epithelium through mercury-sensitive water channels / H.G. Folkesson, M.A. Matthay, H. Hasegawa et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 1994. - Vol. 91. - P. 4970-4974.

УДК 616.36.002-099-07

© Я.В. Тишкова, О.В. Молотков, Э.Э. Ферамузова, 2009

Я.В. Тишкова, О.В. Молотков, Э.Э. Ферамузова

**ОБ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ГЛЮКОЗОТОЛЕРАНТНОГО И АДРЕНАЛИНОВОГО ТЕСТОВ
ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ПЕЧЕНИ ПРИ ЕЕ
ТОКСИЧЕСКОМ ПОРАЖЕНИИ**

Смоленская государственная медицинская академия

В динамике экспериментального токсического поражения печени, вызванного введением половозрелым крысам четыреххлористого углерода в дозе 0,25 мл, с помощью двойного теста (ГТ и через 3 часа от его начала – введение адреналина) изучено ее функциональное состояние. У этих крыс показано уменьшение исходной концентрации глюкозы в крови и существенное замедление времени ее нормализации в процессе ГТТ. После введения адреналина у опытных животных наблюдалась менее выраженная гипергликемия, которая была меньше в 1,5 раза контрольных значений. Полученные результаты свидетельствуют, что такой комбинированный тест позволяет детализировать изменения в глюкозорегулирующей функции гепатоцитов при токсическом поражении печени.

Ключевые слова: острое токсическое поражение печени, глюкозотолерантный и адреналиновый тесты.

Ya. V. Tishkova, O. V. Molotkov, E. E. Feramuzova.

**THE USE OF GLUCOSE TOLERANCE AND ADRENALINIC TESTS FOR DIAGNOSTICS
OF THE LIVER FUNCTION IN ITS TOXIC INJURY**

The functional state of experimental toxic injury of the liver caused by the administration of carbon tetrachloride to adult rats in a dose of 0,25 ml per 100 gr of weight was studied by using a double test (the glucose tolerance test (GTT) and 3 hours later after its beginning adrenaline administration in a dose of 0.5 ml). A reduction in the initial concentration of blood glucose and significant delay of its normalization time during the GTT process was noted. After adrenaline administration in experimental animals less expressed hypoglycemia was observed. There was a 1,5 times decrease in the control readings. The data obtained show that such a combined test allows to identify changes in glucose controlling functions of hepatocytes in toxic injury of the liver.

Key words: acute toxic injury of the liver, glucose tolerance test, adrenaline test.