

**В. В. Анищенко¹, А. В. Трубачева¹, В. В. Морозов²,
А. Г. Коркотян¹, Б. В. Кан¹**

¹ Новосибирский государственный медицинский университет
Красный пр., 52, Новосибирск, 630091, Россия

² Институт химической биологии
и фундаментальной медицины СО РАН
пр. Акад. Лаврентьева, 8, Новосибирск, 630090, Россия

E-mail: trubacheva2008@mail.ru

БИОПОТЕНЦИАЛ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В НОРМЕ И ПРИ РАЗВИТИИ ПАНКРЕОНЕКРОЗА

Изучен биопотенциал поджелудочной железы в норме и при развитии некротического панкреатита в эксперименте. Проведено 183 измерения сигнала в остром опыте и более 240 в хроническом эксперименте. Установлено, что любые изменения функции железы немедленно сопровождаются нарушением биопотенциала железы. Определено, что изменения электрической активности при различном моделировании панкреонекроза однотипно и характеризуется ее длительным снижением. В некоторых случаях отмечалось периодическое возрастание активности, так называемая патологическая активность. Доказаны три типа ответа на повреждения.

Ключевые слова: поджелудочная железа, электрический сигнал, панкреонекроз.

В последнее время достигнут значительный прогресс в развитии неотложной панкреатологии, изучении патогенеза заболевания, различных его осложнений, способов диагностики, прогнозирования течения и лечения больных с острым панкреатитом. Социальная значимость проблемы обусловлена распространенностью заболевания и высокой смертностью. Жизненно важным для пациентов с острым панкреонекрозом является определение тяжести процесса в первые часы с момента госпитализации в стационар. Современная диагностика панкреатита использует значительный арсенал клинических, лабораторных и инструментальных методов. По данным отечественных авторов [1–3], чувствительность метода ультразвуковой диагностики составляет от 70 до 86 %, достоверность исследования повышается в динамике и связана со временем, прошедшим от начала заболевания. Наиболее информативным методом при панкреонекрозе признается компьютерная томография (КТ), но отмечено, что досто-

верным исследование становится к 4-м суткам и связано с развитием демаркации в очаге некроза [1]. Другим из наиболее достоверных способов диагностики формы панкреатита и масштаба поражения является лапароскопия. Но определение площади некроза и распространенности в забрюшинной клетчатке нередко сопряжено с объективными трудностями – отсутствие четкой демаркации очагов некроза в железе, нередко на фоне выраженного геморрагического пропитывания ткани железы в ранний период заболевания.

Электрофизиологические методы позволяют изучать процессы, происходящие в органах и тканях в норме и при патологии путем исследования протекающих в них биоэлектрических процессов. Известно, что функция органа проявляется, во-первых, специфическим рабочим эффектом (сокращение, секреция и т. п.) и, во-вторых, рядом общих для тканей неспецифических физико-химических изменений (интенсивность обменных процессов, теплообразование, био-

электрическая активность и др.) [4]. Таким образом, в ряде случаев состояние и рабочие возможности органа можно оценивать как по специфическому, рабочему эффекту, так и по сопровождающей его биоэлектрической активности.

Поджелудочная железа (ПЖ) – сложный секреторный орган, морфофункциональной основой которого является гранулоцит. Известно, что мембранный потенциал гранулоцита составляет 30–70 мВ. Оптимальной для возникновения секреторных потенциалов является поляризация мембран до 50 мВ. Известен потенциал β -клеток ПЖ – 50–70 мВ [4]. Хорошо изучены колебания электрического сигнала в β -клетках органа, а также в изолированных островках под действием различных концентраций глюкозы, фармакологических препаратов [5–9]. Особо следует выделить работу Н. Tamar et al. [9], в которой изучены колебания электрического потенциала как отдельных клеток ПЖ, так и целого органа. Выделены формы волн при преимущественном функционировании различных клеток островковой части железы, выявлены основные закономерности изменения сигнала под действием различных концентраций глюкозы и способах введения препарата в организм, также препаратов, снижающих секрецию эндокринных клеток поджелудочной железы [9].

С учетом теоретических предпосылок можно предположить, что изменение электрических полей ПЖ должно быть ранним диагностическим признаком гибели клеток, еще до появления зоны демаркации.

Цель исследования – изучить биопотенциал поджелудочной железы в норме и при развитии некротического панкреатита в эксперименте.

Материал и методы

Регистрация электрического сигнала с ПЖ проводилась прибором БИ-01Р, входящим в состав программно-аппаратного комплекса «БОСЛАБ» (Россия). Этот комплекс решает задачи регистрации электрических сигналов, их отображения, обработки, первичного статистического анализа (включая спектральный анализ), хранения в базе данных и экспорта в Excel.

Регистрация электрической активности железы осуществлялась на единственном

ЭМГ-канале прибора, имеющем возможность регистрировать колебания с вольтажом до 1 000 мкВ. Следует отметить, что в отечественной литературе нет упоминаний о специальном приборе для регистрации электрического сигнала с поджелудочной железы. Из-за особенностей программного обеспечения прибора при исследовании электрической активности ПЖ мы регистрировали «сырой» сигнал, хранили его в базе данных, затем экспортировали в Excel, потом проводили основные расчеты характеристик сигнала по разработанному нами алгоритму. В качестве игольчатых электродов применялась тонкая платиновая проволока длиной 0,5 см.

Первая серия экспериментов проведена на 10 крысах и 5 кроликах. После лапаротомии под эфирным наркозом, биполярно, после погружения электродов в железу регистрировали сигнал. Поджелудочная железа у крыс и кроликов располагается на брыжейке кишечника отдельными дольками и не представляет собой единого органа, как у человека. Кроме того, ПЖ человека в отличие от ПЖ грызунов находится в тесной связи с гладкой мускулатурой желудочно-кишечного тракта, аортой, нервными сплетениями. Все эти образования, несомненно, вносят свой вклад в регистрируемый электрический сигнал. Немаловажно, что поджелудочная железа человека с физической точки зрения является объемным проводником. Эти особенности могут значительно влиять на результат исследования, особенно на этапе моделирования острого панкреатита. Поэтому в качестве объекта исследования на следующем этапе выбраны кошки, строение и топографическая анатомия ПЖ которых близка человеку.

Эксперимент по изучению нормальной электрической активности в *остром эксперименте* проведен на 60 беспородных кошках обоих полов. Электрический сигнал с железы регистрировался униполярно. Для определения характера распределения сигнала по всей железе на поверхности и глубине на 20 беспородных котах после лапаротомии под наркозом (золетил, диприван и эфир) униполярным электродом железа зондирована в точках, расположенных друг от друга на расстоянии 1–1,5 см по радиусу на поверхности и глубине железы. Точки выбирались с учетом индивидуальных размеров железы и отмечались на схематичной

карте железы. Время регистрации сигнала в каждом отведении 2 мин. Всего, в зависимости от размера железы, зондировалось от 28 до 36 точек. Дополнительно в конце каждого эксперимента проводилась запись сигнала биполярно. Нулевой электрод во всех случаях устанавливался на ухо животного, а электроды погружались в ткань железы в трех стандартных отведениях: «головка – тело» – I отведение, «тело – хвост» – II, «головка – хвост» – III. Расстояние между электродами в III отведении было достаточно большим, что отражалось на качестве записи. Нередко, особенно в III отведении, появлялись помехи в виде артефактов – колебаний переменного электрического тока. Кроме того, в записи присутствовали помехи в виде ЭКГ-сигнала, который является наиболее сильным физиологическим сигналом. В настоящее время задача фильтрации ЭКГ сигнала при различных видах физиологических исследований успешно решается [10]. Несмотря на имеющиеся сложности, возникающие при регистрации и обработке сигнала, основные закономерности изменений сигнала в норме и при патологии были установлены.

Регистрация сигнала у животных проводилась после лапаротомии, непосредственно из ткани железы. В качестве препаратов для наркоза использовался эфир (у 4 особей), диприван (у 32), золетил (у 24 особей).

Регистрации сигнала в первой серии экспериментов (40 животных) проводилась стандартно в течение 2 мин, после чего предварительно обрабатывались результаты исследования и сопоставлялись полученные данные с данными литературы. Учитывая сведения о периодичности секреции каждые 10 мин [11], отсутствии сигнала с железы более 8 мин [9], а также собственные наблюдения, мы увеличили время регистрации сигнала в норме до 10 мин в каждом отведении.

Для определения характера изменений электрического сигнала в зависимости от типа кормления проведен *хронический эксперимент* на двух беспородных котах. В связи с данными литературы [9] и собственными наблюдениями о различии электрической активности у животных, находящихся под действием фармакологических препаратов, включая средства для наркоза, еще одной задачей исследования было изучение сигнала в естественных условиях.

Под внутривенным наркозом в стерильных условиях после лапаротомии двум животным установлены электроды в 3-х стандартных отведениях. Электроды глубоко погружались в ткань железы и подшивались нитью викрил 4/0 к капсуле железы для исключения миграции в ходе эксперимента. Дополнительно к железе подшивался большой сальник в виде плаща во избежание регистрации сигналов от других возможных источников. Провода электродов выводились по боковым поверхностям живота животного, фиксировались к телу эластичным бинтом. Каждый провод окрашивался разным цветом для исключения ошибки при регистрации сигнала в различных отведениях. На животных были надеты комбинезоны. В послеоперационном периоде устанавливалось круглосуточное наблюдение, назначались антибиотики и обезболивающие препараты. Послеоперационный период протекал без осложнений, животные начали питаться со 2-х суток после операции. Передвижение животных по лаборатории было не ограничено. Регистрация сигнала стартовала через 6 сут после операции у клинически здоровых животных при нормальных показателях общих и биохимических анализов крови. Длительность эксперимента составила 10 сут. Регистрация сигнала с железы в условиях голодания проводилась у этих двух животных через 9, 12, 16, 20 и 48 ч голода. После кормления сигнал регистрировали на протяжении от 30 мин до 7 ч. Для определения характера изменений сигнала, связанного с различным по составу кормом, животных кормили сладким (сладкая манная каша, сладкий творог), мясным (сырое мясо, рыба, яйцо) и смешанным (каша с мясом) кормом.

Действие глюкозы на характер изменений электрической активности железы изучался после введения голодным котам шприцом через рот 40 % 20 мл раствора глюкозы. В этом случае сигнал регистрировался через 30, 40 мин и 1,5 ч после введения раствора.

Через 3 мес. под общим обезболиванием электроды были удалены из ПЖ животных, отмечен характер изменений железы в зонах имплантации электродов. При этом миграции электродов из ткани железы не установлено, вокруг электрода обнаружена формирующаяся фиброзная капсула, в ткани

ПЖ определено незначительное локальное воспаление.

За животными, участвовавшими в хроническом эксперименте, после удаления электродов установлено наблюдение в течение 3 мес. За весь этот период наблюдения клинически и лабораторно животные были здоровы.

Изменения биопотенциала поджелудочной железы при *некротическом панкреатите* изучались при различном моделировании заболевания. Эксперимент проводился на 42 беспородных котах после лапаротомии под общим обезболиванием после регистрации исходного сигнала в стандартных отведениях. Ткань железы повреждалась различными способами: механически, жидким азотом [12], 95 % спиртом, трипсином, трипсином, активированным желчью [13], ядом гадюки [3]. Сразу после повреждения регистрировали сигнал «повреждения» с железы в отведении «головка – хвост» в течение 30–90 мин. Затем электроды устанавливали в отведениях «головка – тело», «тело – хвост», «головка – хвост», проводили запись сигнала в течение 10 мин. В последующие 60 мин регистрация сигнала проходила в отведении «головка – хвост».

Каждый час регистрации вновь переставляли электроды в стандартные отведения и проводили запись сигнала в течение 10 мин. Перестановка электродов каждый час проводилась из-за отсутствия в нашем приборе параллельных каналов, позволяющих одновременно проводить регистрацию сигнала из различных поврежденных участков железы. Нам удалось стандартизировать методику регистрации сигнала и определить необходимое минимальное время регистрации сигнала и оптимальное межэлектродное расстояние, необходимое для получения достоверных результатов. Среднее время регистрации сигнала в каждом эксперименте составило от 1,5 до 8 ч. В протоколе эксперимента каждый час отмечали изменения, происходящие в брюшной полости, железе и забрюшинной клетчатке, время забора крови, время гибели животного, а также появление артефактов.

После эксперимента посмертно удаляли ПЖ, препарат фиксировали формалином, делили на 10–12 частей. Из каждой части готовили 4–6 срезов. Для получения объективных данных, подтверждающих изменения в железе, проводилась компьютерная

морфометрия с определением относительной площади некроза в ткани поджелудочной железы. Масштаб повреждения железы сопоставлялся с расчетными характеристиками сигнала.

Экспериментальная часть исследования проведена на кафедре патологической физиологии Омской государственной медицинской академии (заведующий кафедрой – доктор медицинских наук, профессор, Заслуженный деятель науки РФ В. Т. Долгих) в 2008–2010 гг. Все экспериментальные работы проводились согласно «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу Министерства здравоохранения СССР № 755 от 12.08.1977).

Для выявления отличий в сигналах при различных состояниях нормы и панкреонекрозе разработан базовый алгоритм расчета. Оценка «сырого» электрического сигнала в норме и при патологии проводилась по максимальному вольтажу пиков (его отрицательных и положительных значений), стандартному отклонению и сумме квадратов амплитуды в секунду сигнала¹. «Сырой сигнал» экспортировался в электронную таблицу Excel, рассчитывались средние значения стандартного отклонения сигнала, максимальное значение вольтажа пиков, суммы квадратов амплитуды в секунду. Затем записи сигнала в III отведении, полученные при повреждении железы, разбивались на 10-минутные отрезки и рассчитывались средние значения основных показателей сигнала на каждом временном интервале. Отдельно по принятому алгоритму рассчитывались характеристики сигнала, зарегистрированного после каждого часа после моделирования панкреонекроза в течение 10 мин в стандартных отведениях.

Полученные данные обрабатывались при помощи статистических программ Statistica 6.0, Excel, Biostat 2008. При нормальном распределении данных использовались параметрические методы статистической обработки данных (дисперсионный анализ, корреляция), при ненормальном – их непараметрические аналоги.

¹ Смирнов В. А. Основы измерений вибрации. URL: http://www.vibration.ru/osn_vibracii.shtml

Результаты исследования и обсуждение

Проведено 183 измерения сигнала в остром и более 240 – в хроническом экспериментах. Записи, содержащие явные артефакты и ритмичные колебания с периодом 12–18 в секунду, характерные для гладкой мускулатуры желудочно-кишечного тракта и сосудистой стенки, исключали из обработки. Таким образом, в исследование электрического сигнала железы в норме включены 136 записей острого опыта при биполярном способе отведения и 133 записи хронического эксперимента.

Установлено, что наиболее стабильный сигнал получен при биполярном способе регистрации. При униполярном способе нередко в записи наблюдались помехи, связанные с колебаниями в сети переменного тока. Ведущей особенностью сигнала ПЖ в отличие от других известных физиологических сигналов является различная периодичность проходящих пиков, чаще регистрировалась группа пиков (импульс), изредка колебания принимали почти регулярный характер. Вольтаж пиков в обычных условиях колебался от 17 до 450 мкВ. Основная масса пиков была в пределах до 150 мкВ. Ширина пиков колебалась от нескольких сотых долей секунд до одной десятой доли секунды. Встречались электрограммы, в которых электрическая активность железы отсутствовала от 1 до 6 мин.

Регистрируемая электрическая активность железы была совершенно различной – от полного ее отсутствия до умеренной и очень высокой, с множеством высокоамплитудных пиков. При этом основные характеристики сигнала (форма волны, периодичность пиков, выраженность электрической активности и т. д.), полученные нами и другими исследователями [9], совпадают.

На проявление электрической активности в норме влияют многие фармакологические препараты, включая средства для наркоза. Анестезия пропофолом у животных практически не вызывала изменений электрической активности поджелудочной железы, электрограммы соответствовали электрической активности ПЖ в естественных условиях хронического эксперимента (регистрация сигнала у животных после имплантации электродов). Анестезия золетилом практически полностью блокировала электриче-

скую активность, что проявлялось низкоамплитудными электрограммами. Ингаляционный эфирный наркоз резко увеличивал амплитуду и частоту проходящих пиков, имеющих высокий вольтаж. Основные показатели сигнала в группе с использованием эфирного наркоза (вольтаж, стандартное отклонение, сумма квадратов амплитуды в секунду) значительно превышали сходные характеристики сигнала в группе животных с пропофоловым и золетилловым наркозом ($p = 0,000$). Золетилл значительно угнетал активность железы, отмечалось снижение вольтажа сигнала и частоты проходящих пиков. Все характеристики сигнала в группе с использованием золетила были достоверно значительно ниже, чем в других группах животных, исследованных на фоне пропофолового и эфирного наркоза ($p = 0,0003$).

В условиях голодания электрическая активность железы сохранялась высокой, при этом нередко изменялась форма волны. После кормления сладким кормом изменение активности отмечено уже через 30 мин, высокая активность сохранялась до 3 ч, постепенно снижаясь в последующие 5 ч, но периодически кратковременно повышаясь в более поздние периоды наблюдения. После кормления белковой пищей электрической активность была длительно умеренная, кратковременное повышение активности регистрировалось в конце периода наблюдения ($p \leq 0,05$). При кормлении смешанным кормом не выявлено характерных особенностей активности в различные периоды наблюдения ($p = 0,25$).

На большом количестве измерений при различных вариантах нормы рассчитаны границы нормы расчетных показателей сигнала (максимальные отрицательные и положительные значения амплитуды, стандартное отклонение амплитуды сигнала и сумма квадратов амплитуды сигнала в секунду) – 5 и 95 перцентиль и среднее значение показателей сигнала. Таким образом, мы стандартизировали сигнал в периоде измерения, равном 10 мин.

Общее время регистрации сигнала, включенного в анализ, после повреждения составило 103 ч. Общей закономерностью сигнала после повреждения было уменьшение вольтажа и частоты проходящих пиков или полное отсутствие сигнала длительное время. Далее, через несколько минут после повреждения, часто на фоне общего низкого

сигнала, возникало резкое повышение электрической активности, которое характеризовалось значительным повышением амплитуды пиков с возрастанием их частоты. Вольтаж пиков после повреждения возрастал в 3–10 раз (от 300 до 1 000 мкВ), при этом регистрировались импульсы длительностью от нескольких секунд до нескольких минут. Подобная активность в норме (до повреждения) не отмечалась.

В процессе исследования показаны три типа ответа на повреждение независимо от его типа. Прежде всего, резко возникающая активность периодически повторялась от 1–3 ч и медленно затухала, затем сигнал был совершенно плоский, активность очень низкая или совсем отсутствовала (I тип электрической активности). В других случаях изначально на фоне резкого снижения активности в течение первых трех часов происходило ее периодическое импульсное повышение, максимум активности приходился на период 3,5–4,5 ч (II тип электрической активности). В третьей группе зарегистрированных электрограмм низкий сигнал регистрировался на всем протяжении эксперимента (III тип электрической активности).

Наиболее характерной чертой изменения сигнала после повреждения было его резкое снижение. При этом после повреждения преобладал сигнал, расчетные характеристики которого были ниже ранее рассчитанной нормы сигнала. Низкая активность после повреждения регистрировалась в 32–65 % электрограмм, при этом в норме низкая активность отмечена всего в 5,8 % случаев. Чаще всего снижение сигнала больше нормы регистрировалось при повреждении железы спиртом, реже всего такие изменения сигнала были отмечены в группе животных, моделирование панкреонекроза которым проводилось трипсином. Повышение электрической активности после повреждения явно отличалось от высокой активности, зарегистрированной в нормальных условиях, по всем основным расчетным показателям сигнала. Такая активность названа нами патологической.

Несмотря на различный механизм повреждения, основные расчетные характеристики сигнала при патологической активности в экспериментальных группах достоверно не имели отличий ($p \geq 0,05$). В исследовании изучена возможная корреляционная связь

между максимальным значением показателя суммы квадрата амплитуды в секунду и повреждающей дозой. Выявлена прямая корреляционная связь между указанными значениями ($r = 0,6033$, $p = 0,0062$).

Заключение

Проведенное исследование биопотенциала поджелудочной железы позволяет утверждать, что электрическая активность органа отражает ее секреторную функцию. Любые изменения функции ПЖ немедленно сопровождаются изменением биопотенциала железы.

При всех механизмах повреждения железы обнаружена схожая электрическая активность, позволяющая связывать изменения сигнала после повреждения с самим фактом повреждения и гибелью клеток железы, а не изменениями электрической активности железы под действием различных фармакологических препаратов, выявленной в острых и хронических экспериментах. При этом установлены следующие закономерности:

1) снижение электрической активности связывается, прежде всего, с защитным механизмом клетки, проявляющимся в снижении функции в ответ на повреждение;

2) стойкое снижение электрической активности, особенно возникающее после периодов патологического повышения, должно рассматриваться как гибель большого количества клеток;

3) резкое повышение электрической активности совпадает с моментом гибели большого количества клеток железы и может служить критерием диагностики и прогноза развивающегося некроза (гипотеза);

4) повторные изменения активности после длительного времени, прошедшего после повреждения железы, соответствуют вторичному аутолизу клеток поджелудочной железы, хорошо известному в патогенезе развития панкреонекроза (гипотеза).

Проведенное исследование позволяет с уверенностью констатировать, что на электрическую активность ПЖ в живом организме влияют многие факторы, но электрическая активность органа отражает ее секреторную функцию. Поэтому метод регистрации биопотенциала поджелудочной железы может быть с успехом применен в

медицине как в норме, так и при различной патологии.

Список литературы

1. Багненко С. Ф., Толстой А. Д., Красногоров В. Б. Острый панкреатит (протоколы диагностики и лечения) // Анн. хир. гепатологии. 2006. № 1. С. 60–66.
2. Савельев В. С., Филимонов М. И., Бруневич С. З. Панкреонекрозы. М., 2008.
3. Двинянинова Н. А., Вискунов В. Г. Тайна панкреатической драмы. Новосибирск, 2000.
4. Шмидта Р., Тевса Г. Физиология человека: Пер. с англ. М., 2006.
5. Branstrom R. Metabolic Signal and the ATP-Sensitive Potassium Channel in the Pancreatic B-Cell. Stockholm, 1999. P. 16–24.
6. Dean P. M., Matthews E. K. Glucose-Induced Electrical Activity in Pancreatic Islet Cells // J. Physiol. Lond. 1970. Vol. 210. P. 255–264.
7. Henquin J. C., Meissner H. P. Significance of Ionic Fluxes and Changes in Potential for Stimulus-Secretion Coupling in Pancreatic B-Cells // Experientia. 1984. Vol. 40. P. 1043–1052.
8. Matthews E. K., Connor M. D. L. Dynamic Oscillations in the Membrane Potential of Pancreatic Islet Cells // J. Exp. Biol. 1979. Vol. 8. P. 75–91.
9. Tamar H., Tamar L., Yuval M. Sensing of Pancreatic Electrical Activity // Patent US2007. № 0060812A1.
10. Зайченко К. В., Жаринов О. О., Кулин А. Н. Съём и обработка биоэлектрических сигналов. СПб., 2001.
11. Аметов А. С. Роль β -клеток в регуляции гомеостаза глюкозы в норме и при сахарном диабете 2 типа // Сахарный диабет. 2008. № 4. С. 6–12.
12. Махнев А. В., Шнейдер В. С., Стрелин С. А. Обоснование применения криохирургического лечения при повреждениях поджелудочной железы в эксперименте // Материалы науч.-практ. конф., посвящ. 40-летию кафедры госпитальной хирургии Тюменской гос. мед. академии. Тюмень, 2008. С. 84–85.
13. Ковальчук В. И. Форсированный диурез при остром панкреатите: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Л., 1972.

Материал поступил в редколлегию 17.02.2012

V. V. Anishchenko, A. V. Trubacheva, V. V. Morozov,
A. G. Korkotyan, B. V. Kan

BIOPOTENTIAL OF THE PANCREAS IS NORMAL IN THE DEVELOPMENT OF PANCREATIC NECROSIS

Study of biopotential of the pancreas in normal conditions and in the development of necrotizing pancreatitis in the experiment. The investigations carried out measurements of the signal 183 in acute experiments and more than 240 in a chronic experiment. It is established that any change in function of the gland immediately accompanied by a change biopotential cancer. It is established that changes in electrical activity at different modeling of the same type of pancreatic necrosis and is characterized by its long decline. In some cases, there is a periodic sharp increase in the activity, «pathology activity». Show three types of response to injury in this case regardless of the type of damage.

Keywords: pancreas, electrical signal, pancreatic necrosis.