УДК 616.37-002.3-089-019

В.В. Максим'юк, В.В. Тарабанчук, М.О. Гришин*

*Кафедра хірургії (зав. – проф. І.Ю. Полянський) ВДНЗ України "Буковинський державний медичний університет", м. Чернівці, *Чемеровецька центральна районна лікарня Хмельницької області*

ПАТОГЕНЕТИЧНІ ОСОБЛИВОСТІ РОЗВИТКУ ПРОЦЕСІВ ПЕРОКСИДНОГО ОКИСНЕННЯ ЛІПІДІВ ТА БІЛКІВ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ГОСТРОГО НЕКРОТИЧНОГО ПАНКРЕАТИТУ

Резюме. В експерименті досліджено особливості змін процесів пероксидного окиснення ліпідів та білків у крові та тканинах при гострому некротичному панкреатиті. Встановлено, що зростання активності окиснювальної модифікації білків у панкреатоцитах, гепатоцитах, альвеоцитах та ендотеліоцитах є одним з провідних механізмів їх ураження. Це супроводжується прогресуванням некротичного ураження підшлункової залози та сприяє виникненню ендотеліальної дисфункції, яка є провідним чинником вторинних уражень печінки та легень.

Ключові слова: гострий панкреатит, пероксидне окиснення ліпідів, окиснювальна модифікація білків.

Відомо, що порушення редокс-рівноваги при гострому панкреатиті (ГП) супроводжується трансформацією пероксидних реакцій, перетворюючи їх з адаптаційних на ушкоджуючі [1-5]. При цьому вільні радикали кисню є не тільки прямим ушкоджуючим фактором панкреатоцитів і ендотелія кровоносних судин, а й сигнальними молекулами, які запускають синтез молекул клітинної адгезії, цитокінів і проапоптичних сполук, а також здатні активувати панкреатичні ферменти, що, у свою чергу, супроводжується поглибленням некротичного ураження тканин підшлункової залози (ПЗ) та наростанням ендотоксикозу [1, 3-5]. Разом з тим, механізми розвитку таких ушкоджуючих реакцій при ГП потребують більш ґрунтовного вивчення.

Мета дослідження: дослідити особливості змін процесів пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) та білків у крові та тканинах при гострому некротичному панкреатиті в експерименті.

Матеріал і методи. *Об'єктом експериментальних досліджень стали 63 статевозрілі кролі породи "Сірий велетень", вагою від 8 до 10 кг, яким виконували моделювання гострого некротичного панкреатиту (ГНП) за напрацьованою методикою шляхом перев'язки головної протоки ПЗ з наступним ін'єкційним введенням у паренхіму ПЗ розчину жовчі з трипсином (патент на корисну модель № 66667).*

Оцінку ступеня окиснювальної модифікації білків (ОМБ) плазми крові проводили за методом І.Ф. Мещишена [6]. Вміст малонового альдегіду (МА) в еритроцитах визначали за методом И.Д Стальной, Т.Г. Горишвили [7]. Визначення вмісту церулоплазміну (ЦП) [КФ 1.16.3.1] в сироватці крові проводили методом М.І. Ревіна [8]. Рівень молекул середньої маси (МСМ) визначали за методикою Н.И. Габриэлян [9].

З метою визначення інтенсивності процесів ОМБ у тканинах ПЗ, печінки та легень проводили гістохімічні дослідження за оригінальними методиками І.С. Давиденка [10-12].

Співвідношення активності антиоксидатного захисту (АОЗ) та (ПОЛ) крові проводили шляхом визначення інтегрального показника (коефіцієнт К) за методом Е.В. Чуянової [2].

При виконанні досліджень дотримувались загальноприйнятих світових та вітчизняних норм здійснення досліджень у галузі біології та медицини, а саме: Ванкуверської конвенції про біомедичні дослідження (1979,1994) та інших законодавчих актів, що діють на території України.

Результати дослідження та їх обговорення. Встановлено, що через 24 год з часу початку моделювання панкреатиту відзначалось виражене істотне зростання концентрації МА (рис. 1) та ЦП (рис. 3), у той час як рівні ОМБ (рис. 2) та МСМ (рис. 4) помірно знижувались. Наведені зміни супроводжувались істотним зростанням інтегрального показника активності ПОЛ та АОЗ (рис. 5).

© Максим'юк В.В., Тарабанчук В.В., Гришин М.О., 2015

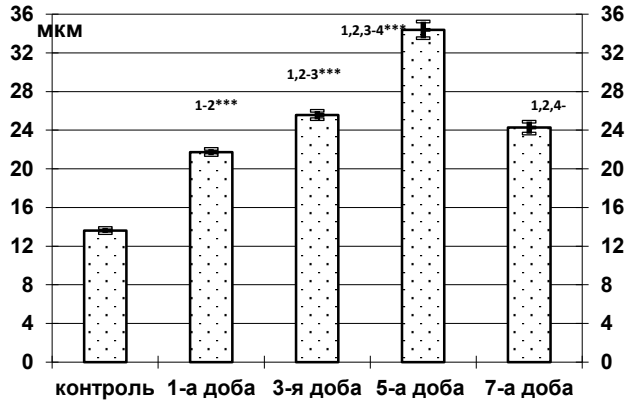

Рис. 1. Динаміка рівня малонового альдегіду (мкмоль/л) у плазмі крові експериментальних тварин у процесі розвитку гострого некротичного панкреатиту

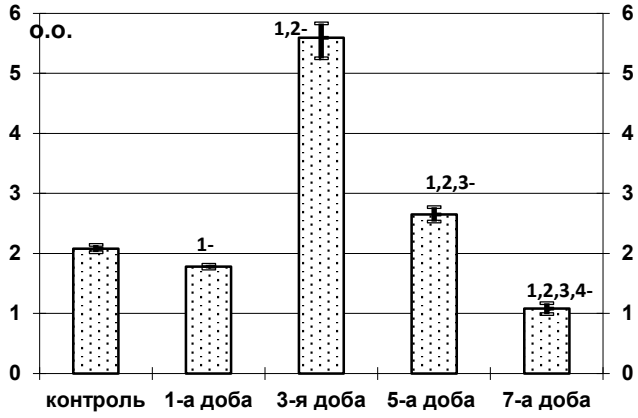

Рис. 2. Динаміка параметрів ОМБ (о.о.г/л) у плазмі крові у процесі розвитку гострого некротичного панкреатиту

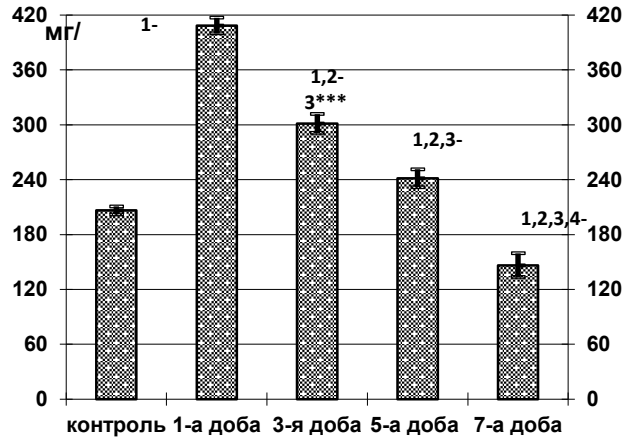

Рис. 3. Динаміка рівня церулоплазміну (мг/л) у плазмі крові експериментальних тварин у процесі розвитку гострого деструктивного панкреатиту
*Примітка. *** - коефіцієнт вірогідності Р між вказаними термінами спостереження < 0,001 (наведені тільки статистично істотні відмінності)*

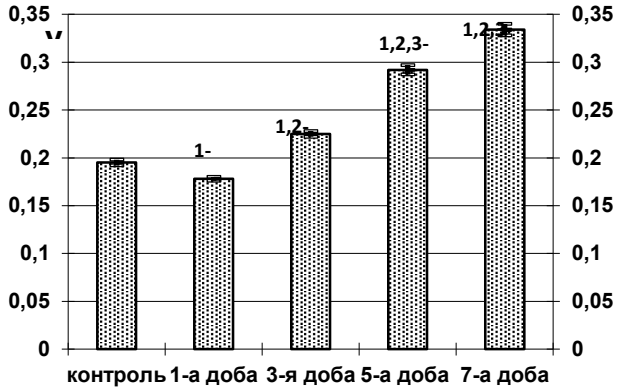

Рис. 4. Динаміка рівня молекул середньої маси (у.о.) у плазмі крові експериментальних тварин у процесі розвитку гострого некротичного панкреатиту

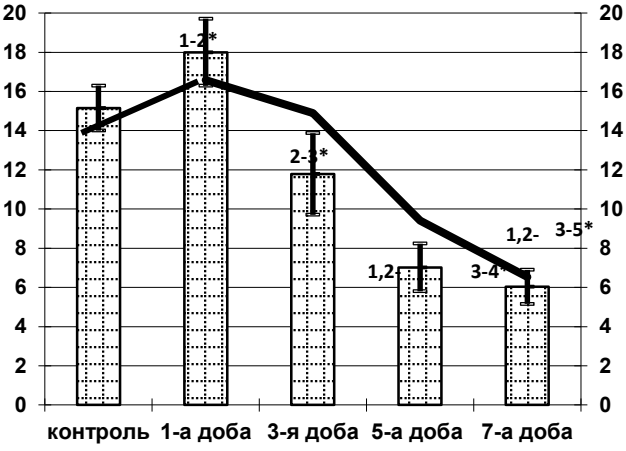

Рис. 5. Динаміка змін інтегрального показника активності систем пероксидного окиснення ліпідів та антиоксидантного захисту крові (коефіцієнт К) у процесі розвитку гострого некротичного панкреатиту
*Примітка. * - коефіцієнт вірогідності Р між вказаними термінами спостереження < 0,05, *** - < 0,001 (наведені тільки статистично істотні відмінності)*

Паралельно з цим, ОМБ як функціональних клітин, так і ендотелія кровоносних судин ПЗ (рис. 6), печінки (рис. 7) та легень (рис. 8) виражено істотно зростала.

Викладені дані свідчать, що ініціація ГНП у тварин супроводжувалась активізацією ПОЛ. Паралельне зростання активності АОЗ є закономірним процесом, який запобігає побічним негативним наслідкам окисних реакцій. Доказом цього є істотне зростання на 1-у добу коефіцієнту К та зниження активності ОМБ і рівня МСМ у плазмі крові, а також наявність зворотнього істотного кореляційного зв'язку між МА та ЦП (таблиця).

Разом з тим, раннє зростання ПОЛ, навіть на тлі вираженої активізації АОЗ та домінування його інтегрального показника, стимулює внутрішньоацинарну активацію панкреатичних ензимів

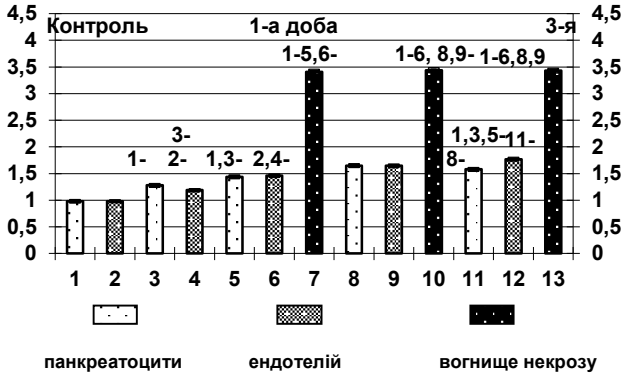

Рис. 6. Динаміка змін коефіцієнту R/B у тканинах підшлункової залози у процесі розвитку гострого некротичного панкреатиту

Рис. 7. Динаміка змін коефіцієнту R/B у тканинах печінки у процесі розвитку гострого некротичного панкреатиту

Рис. 8. Динаміка змін коефіцієнту R/B у тканинах легень у процесі розвитку гострого некротичного панкреатиту

*Примітка. * - коефіцієнт вірогідності P між вказаними термінами спостереження < 0,05, ** - < 0,01, *** - < 0,001; ++ - коефіцієнт вірогідності між вказаними тканинами < 0,05, ++ - < 0,01; +++ - < 0,001 (наведені тільки статистично істотні відмінності)*

та виникнення місцевої гіпоксії. Доказом цього є виражене істотне зростання на 1-у добу коефіцієнту R/B в епітеліальних клітинах екзокринного апарату та ендотелія кровоносних судин ПЗ (див. рис. 6), а також наявність тісних прямих істотних кореляційних залежностей між збільшенням рівня МА та активності ОМБ у панкреатоцитах та ендотеліальних клітинах ПЗ (див. табл.). Тобто, інтенсифікація ПОЛ є не тільки причиною змін ліпідного компоненту мембран та сприяючим фактором внутрішньоацинарної активації панкреатичних ферментів, але й провідним тригерним механізмом активізації ОМБ як у крові [2, 4, 5, 12], так і у тканинах. Окиснені білки, у свою чергу, є активаторами численних мультикаталітичних протеаз, у тому числі й панкреатичних [2, 4]. Це дозволяє розглядати наведені патологічні механізми у якості факторів, які сприяють прогресуванню ГП.

Окремо слід зазначити, що зростання активності ПОЛ плазми крові супроводжується істотною елевацією ОМБ гепатоцитів (див. рис. 7), альвеоцитів (рис. 8), а також ендотеліальних клітин печінки (див. рис. 7) та легень (див. рис. 8). Окрім того, такі зміни характеризуються наявністю цілого ряду прямих істотних кореляційних залежностей (див. табл.). Це свідчить про те, що інтенсифікація ПОЛ призводить до запуску системних реакцій, в основі яких лежить ініціація процесів, які є чинниками розвитку гіпоксії та дисфункції дистантних органів, зокрема печінки та легень.

З 24 год. по 72 год. розвитку ГНП у плазмі крові відзначалось істотне зростання рівнів МА, ОМБ та МСМ, у той час як концентрація ЦП вірогідно знижувалась. При цьому, вірогідне зменшення величини інтегрального показника активності процесів ПОЛ свідчило про домінування прооксидантних систем над резервними можливостями відновлювальних редокс-механізмів. Паралельно з цим, на 3-ю добу визначалось прогресивне зростання активності ОМБ у панкреатоцитах, гепатоцитах, альвеоцитах, а також ендотеліальних клітинах судин ПЗ, печінки та легень (див. рис. 6-8). Окрім того, при гістологічному дослідженні у тканинах ПЗ визначались вірогідні морфологічні ознаки формування дрібних вогнищ некрозу, активність ОМБ яких була істотно вищою, ніж у життєздатних панкреатоцитах та ендотеліальних клітинах кровоносних судин (див. рис. 6). При цьому, зміни ОМБ у тканинах носили взаємопов'язаний універсальний характер, що засвідчувалось наявністю багатьох прямих істотних кореляційних залежностей (див. табл.).

Викладене свідчить, що за умов прогресу-

Таблиця

Корелятивні зв'язки про- та антиоксидантних систем крові та тканин на 1-у, 3-ю та 7-у добу розвитку гострого некротичного панкреатиту

Матеріал дослідження	1-а доба		3-я доба		7-а доба		Матеріал дослідження
	r	p	r	p	r	p	
МА	-0,48	<0,05	0,10	>0,05	0,21	>0,05	ЦП
МА	0,64	<0,05	0,50	<0,05	-0,13	>0,05	ОМБ панкреатоцитів
МА	0,63	<0,05	0,10	>0,05	0,03	>0,05	ОМБ ендотелію ПЗ
ОМБ крові	0,58	<0,05	0,09	>0,05	0,52	<0,05	ОМБ панкреатоцитів
МСМ	0,64	<0,05	0,59	<0,05	0,70	<0,05	ОМБ панкреатоцитів
ОМБ панкреатоцитів	0,99	<0,01	0,87	<0,01	0,90	<0,01	ОМБ ендотелію ПЗ
ОМБ панкреатоцитів	0,57	<0,05	0,49	<0,05	0,33	>0,05	ОМБ гепатоцитів
ОМБ панкреатоцитів	0,86	<0,01	0,60	<0,05	0,59	<0,05	ОМБ альвеоцитів
ОМБ гепатоцитів	0,52	<0,05	-0,02	>0,05	-0,48	<0,05	ОМБ альвеоцитів
ОМБ альвеоцитів	0,87	<0,01	0,12	>0,05	-0,02	>0,05	ОМБ ендотелію легень
ОМБ ділянок панкреонекрозу	-	-	0,51	<0,05	0,49	<0,05	МСМ
ОМБ ділянок панкреонекрозу	-	-	0,73	<0,05	0,48	<0,05	ОМБ панкреатоцитів
ОМБ ділянок панкреонекрозу	-	-	0,63	<0,05	0,48	<0,05	ОМБ ендотелію ПЗ
ОМБ ділянок панкреонекрозу	-	-	0,55	<0,05	0,25	>0,05	ОМБ ендотелію печінки
ОМБ ділянок панкреонекрозу	-	-	0,61	<0,05	0,59	<0,05	ОМБ альвеоцитів
ОМБ ділянок панкреонекрозу	-	-	0,43	>0,05	0,50	<0,05	ОМБ ендотелію легень

вання ГНП максимальну інтенсивність прооксидантних реакцій на тлі неспроможності компенсаторних систем можна розцінити як прояв "кисневого вибуху" [5, 9]. Різка активізація вільнорадикальної трансформації пов'язана зі зростанням вмісту реакційно здатних форм кисню, основними джерелами яких є стимульовані фагоцити та ендотеліальні клітини [2, 5, 11]. Очевидно, що таке неконтрольоване надмірне зростання активності прооксидантних чинників у крові та тканинах призводить до численних негативних наслідків. Серед них, поряд зі змінами метаболізму, кровообігу та імунітету [2, 5, 11], варто відмітити порушення стабільності клітинних та субклітинних мембран, що, окрім розладів трансмембранного транспорту, є однією з причин розвитку некротичного ураження панкреатичної паренхіми [2]. Останнє вірогідно підтверджується тим, що на 3-ю добу активність ОМБ у вогнищах некротичного ураження тканин ПЗ була у 2,5 раза вищою, ніж у життєздатних панкреатоцитах та ендотеліальних клітинах, перевищуючи при цьому їх вихідні показники майже у 3,5 раза (див. рис. 6). Окрім того, ці зміни характеризувались тісними прямими ік-

тотними кореляційними залежностями (див. табл.). Викладене дозволяє розглядати різке зростання активності ОМБ у тканинах ПЗ у якості одного з провідних механізмів її некротичного ураження.

З 3-ої по 7-у добу розвитку ГНП у плазмі крові відзначалось істотне зниження концентрації ОМБ та ЦП нижче вихідних величин на тлі вираженої тенденції до зменшення рівня МА, який, одначе, був вищим, ніж у контролі. Паралельно з цим, рівень МСМ продовжував прогресивно зростати, а інтегральний показник активності процесів ПО характеризувався ще більш вираженою вірогідною тенденцією до переважання прооксидантних чинників. Окрім того, спостерігалось істотне зростання активності ОМБ функціональних клітин та ендотеліоцитів всіх органів (див. рис. 6-8), що супроводжувалось появою поширеного некротичного ураження ПЗ та розвитком дистрофічних процесів у печінці та легенях. При цьому виявлялись прямі істотні кореляційні залежності, між зростанням активності ОМБ у функціональних клітинах та ендотеліоцитах ПЗ, печінки та легень (див. табл.).

Такі зміни свідчать, що, окрім зростання ОМБ у панкреатоцитах, альвеоцитах та гепатоцитах, ще одним механізмом ураження ПЗ, печінки та легень є зростання ОМБ у їх ендотеліоцитах. Останнє, на нашу думку, сприяє виникненню ендотеліальної дисфункції, яка є провідним чинником вторинних уражень ПЗ, печінки та легень.

Окремо слід зазначити, що, незважаючи на виражене пригнічення редокс-реакцій крові, активність ОМБ тканин всіх органів характеризувалась невпинно прогресуючим зростанням. Це супроводжувалось появою вірогідних морфологічних проявів поширеного панкреонекрозу та розвитком дистрофічних процесів у печінці та легенях.

Викладене свідчить, що некротичне ураження ПЗ та розвиток дисфункції/недостатності дистантних органів корелює з активністю ОМБ і тяжкістю синдрому ендогенної інтоксикації. Вірогідність останнього додатково підтверджувалась сукупністю прямих істотних кореляційних залежностей між вказаними змінами (див. табл.).

Особливої уваги заслуговує також те, що на ранніх стадіях розвитку ГП активність ПОЛ тісно прямо істотно корелює з ОМБ у панкреатоцитах та ендотеліальних клітинах ПЗ, а при початковому розвитку некротичного ураження панкреатичної паренхіми та подальшому його прогресуванні такий зв'язок не простежується. Викладене, цілком ймовірно, вказує на те, що швидке зростання активності процесів ПО ініціює процеси ОМБ у тканинах ПЗ, що призводить до запуску місцевого альтераційного механізму. Подальший розвиток останнього потенціюється власними непрооксидантними чинниками і характеризується універсальністю, що полягає в укоджуючому впливі як на паренхіму ПЗ, так і на тканини дистантних органів.

Висновки. 1. Розвиток гострого некротичного панкреатиту в експерименті характеризується зростанням активності процесів ліпідів та білків у крові та окиснювальної модифікації білків у панкреатоцитах, гепатоцитах та альвеоцитах, що є одним з провідних механізмів їх ураження. 2. Зростання окиснювальної модифікації білків у ендотеліоцитах підшлункової залози, печінки та легень в процесі розвитку гострого панкреатиту сприяє виникненню ендотеліальної дисфункції, яка є провідним чинником вторинних уражень цих органів.

Перспективи подальших досліджень. Зважаючи на важливу роль процесів ліпопероксидації та окиснювальної модифікації білків у механізмах прогресування гострого некротичного панкреатиту перспективним є напрацювання нових ефективних методів системного та місцевого антиоксидантного і антипротеолітичного впливу.

Список використаної літератури

1. Морозов С.В. Активация процессов липопероксидации — патогенетический фактор полиорганной дисфункции при остром панкреатите / С.В. Морозов, В.Т. Долгих, В.Л. Полуэктов // Бюллетень СО РАМН. – 2010. – № 4. – С. 32-35. 2. Чуянова Е.В. Уровень свободнорадикального окисления в ферментативной фазу острого панкреатита и его прогностическое значение: автореф. дис. на соикание ученой степени кандидата мед. наук: спец. 14.01.17 "Хирургия" / Е.В. Чуянова. – СПб., 2009. – 25 с. 3. Щетинин Н.А. Морфофункциональное обоснование применения высоких доз аскорбиновой кислоты в лечении экспериментального острого панкреатита: автореф. дис. на соикание ученой степени кандидата мед. наук: спец. 14.01.17 "Хирургия", 03.03.04 "Клеточная биология, цитология, гистология" / Н.А. Щетинин. – Оренбург, 2010. – 25 с. 4. Oxidative Risk for Atherothrombotic Cardiovascular Disease / Jane A. Leopold, Joseph Loscalzo [et al.] // Biol Med. – 2009. – V. 47, № 12. – P. 1673-1706. 5. Oxidative stress pathway genes and chronic renal insufficiency in Asian Indians with Type 2 diabetes / K.T. Arun, P.F.

Prasad, B.K. Thelma [et al.] // J. Diabetes Complications. – 2009. – V. 23. – P. 104. 6. Мещишен І.Ф. Метод визначення окислювальної модифікацій білків плазми (сироватки) крові / І.Ф. Мещишен // Бук. мед. Вісн. – 1999. – Т. 2, № 1. – С. 187-197. 7. Стальная И.Д. Метод определения малонового альдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты / И.Д. Стальная, Т.Г. Горишвили // Современные методы в химии. – М.: Медицина, 1977. – С. 66-68. 8. Колб В.Т. Справочник по клинической химии / В.Т. Колб, В.С. Камышникова. – Минск: Беларусь, 1982. – 290 с. 9. Габриэлян Н.И. Скрининговый метод определения средних молекул в биологических жидкостях / Н.И. Габриэлян, Э.Р. Левицкий, А.А. Дмитриев. – М., 1985. – 18 с. 10. Давиденко І.С. Гістохімічні особливості окиснювальної модифікації білків у клітинах ниркового клубочка при гострому післяінфекційному гломерулонефриті / І.С. Давиденко, О.М. Давиденко // Бук. мед. вісн. – 2012. – Т. 16., № 3(63), Ч. 2. – С. 106-108. 1. Окисномодифіковані білки за гістохімічними даними у нирках щурів при інтоксикації тетрахлорметаном і дії мелатоніну та настоянки ехінацеї пурпурової / І. Мацьопа, Н. Григор'єва, І. Давиденко [та ін.] // Вісн. Львівського ун-ту. Серія біологічна. – 2010. – Вип. 54. – С. 69-74. 12. Пат. 38260 Україна, МПК G 09 B 23/28. Спосіб вимірювання окиснювальної модифікації білків у тканині печінки / Давиденко І.С., Ленга Е.Л., Мещишен І.Ф.; заявник та патентовласник Буковинський державний медичний університет; заявка № и200810681; заявл. 27.08.2008; опубл. 25.12.2008. – Бюл. № 24.

ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ РАЗВИТИЯ ПРОЦЕССОВ ПЕРОКСИДНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ И БЕЛКОВ В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ОСТРОГО НЕКРОТИЧЕСКОГО ПАНКРЕАТИТА

Резюме. В эксперименте изучены особенности изменений процессов пероксидного окисления липидов и белков в крови и тканях при остром некротическом панкреатите. Установлено, что рост активности окислительной модификации белков в панкреатоцитах, гепатоцитах, альвеоцитах и эндотелиоцитах является одним из ведущих механизмов их поражения. Это сопровождается прогрессированием некротического поражения поджелудочной железы и способствует возникновению эндотелиальной дисфункции, которая является ведущим фактором вторичных поражений печени и легких.

Ключевые слова: острый панкреатит, пероксидное окисление липидов, окислительная модификация белков.

PATHOGENETIC FEATURES OF LIPID AND PROTEIN PEROXIDATION UNDER EXPERIMENTAL ACUTE NECROTIZING PANCREATITIS

Abstract. Specific changes in the processes of lipid and protein peroxidation in the blood and tissues under experimental acute necrotizing pancreatitis have been studied. Increased activity of oxidative modification of proteins in the pancreatic, hepatic, alveolar and endothelial cells was found to be one of the leading mechanisms of their damage. It is accompanied by a progression of necrotic lesions of the pancreas and contributes to endothelial dysfunction, which is the leading factor of secondary lesions of the liver and lungs.

Key words: acute pancreatitis, lipid peroxidation, oxidative modification of proteins.

Bukovinian State Medical University (Chernivtsi)

Надійшла 17.06.2015 р.
Рецензент – проф. Шкварковський І.В. (Чернівці)