

DOI: 10.21802/gmj.2017.3.13

УДК 616-092+616.24+616.37-002+616-08

Черкасова В.В., Заяць Л.М.

Зміни прооксидантно-антиоксидантної системи при експериментальному гострому панкреатиті

Кафедра патологіології (зав.кафедри - проф. Заяць Л.М.),
ДВНЗ «Івано-Франківський національний медичний університет»
м. Івано-Франківськ, Україна, e-mail: kaliostrovik85@gmail.com

Резюме. Вступ. Летальність при гострому деструктивному панкреатиті, незважаючи на розробку і впровадження нових методів лікування, залишається стабільно високою і при важких формах досягає 25-85%. Активізація нейтрофілів і макрофагів при гострому панкреатиті призводить до «кисневого вибуху», що тісно пов'язане з активацією перекисного окиснення ліпідів.

Мета - встановити в динаміці зміни показників оксидантно-антиоксидантних систем при гострому L-аргінін індукованому панкреатиті.

Матеріали і методи. Дослідження проведені на 62 білих щурах-самцях лінії Вістар масою 180-220 г, яким було змодельовано гострий панкреатит. У крові тварин через 12, 24, 48 та 72 години визначали рівень активності продуктів тіобарбітурової кислоти, дієнових кон'югат, каталази для оцінки інтенсивності оксидативного стресу та антиоксидантних систем.

Результати. Отримані результати дослідження показали, що гострий L-аргінін індукований панкреатит супроводжується інтенсифікацією процесів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ). Встановлено, що найбільш виражений приріст всіх показників крові спостерігається через 24 год від початку дослідження. Виявлено достовірний приріст активних продуктів тіобарбітурової кислоти (ТБК-АП) і дієнових кон'югат (ДК) – відповідно в 1,98 та 2,7 раза, також ріст каталази (КТ) – у 2,2 раза. На наступному етапі експерименту відбувається сповільнення темпів приросту ПОЛ про що свідчать наступні значення. Так, на 48 год. у III групі: ТБК-АП – зросли на 5,1% ($p>0,05$), ДК – на 3,3% ($p>0,05$), рівень КТ – на 43,4% ($p<0,05$), порівняно з даними на 24 год. Важливо зазначити що на 72 год рівень КТ зменшився на 23,3% ($p>0,05$), що може свідчити про виснаження антиоксидантних систем. Показники ПОЛ на 72 год. порівняно з 48 год. у III групі: ТБК-АП – зросли на 1,7% ($p>0,05$), ДК – на 5,7% ($p>0,05$).

Висновки. Гострий L-аргінін індукований панкреатит супроводжується інтенсифікацією процесів перекисного-окиснення ліпідів, які можуть потенціювати розвиток поліорганної недостатності при запаленні підшлункової залози. Найбільш виражені зміни показників перекисного-окиснення ліпідів спостерігаються на 24 годину дослідження.

Ключові слова: гострий панкреатит, перекисне окиснення ліпідів, активні продукти тіобарбітурової кислоти, дієнові кон'югати, каталаза.

Постановка проблеми і аналіз останніх досліджень. На сьогодні гострий панкреатит (ГП) є важливою проблемою сучасної медицини. Захворювання трапляється приблизно 50 випадків на 100 тисяч населення, характеризується неоднорідністю клінічних проявів та має неухильну тенденцію до зростання. Спостерігається також збільшення частоти панкреонекрозу від 11,5% до 64%. [7]. Летальність при гострому деструктивному панкреатиті, незважаючи на розробку і впровадження нових методів лікування, залишається стабільно високою і при важких формах досягає 25-85%. Найбільша кількість летальних результатів пов'язана з гнійно-септичними ускладненнями й асоційованою з ними поліорганною недостатністю, яка приблизно в 80% випадків є безпосередньою причиною смерті [5].

Важливу роль у патогенезі ушкоджень при ГП відіграє викид великої кількості прозапальних медіаторів та розвиток синдрому системної запальної відповіді (ССЗВ) [11]. Активізація нейтрофілів і макрофагів призводить до «кисневого вибуху», що тісно пов'язане з активацією перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ), які є процесом окисної деструкції ліпідів з ненасиченими подвійними зв'язками та відбуваються за ланцюговим механізмом. Ініціальним етапом вільнора-

дикального окиснення є утворення активних форм кисню (АФК). До останніх належать супероксидний аніон-радикал, пергідроксильний, гідроксильний радикали та пероксид водню [8]. Окрім продуктів відновлення кисню, до активних форм належать кисневі метаболіти — активовані продукти тіобарбітурової кислоти (ТБК-АП), дієнові кон'югати (ДК), які служать маркером інтенсивності ПОЛ.

В умовах ССЗВ при ГП порушується баланс пероксидних реакцій, зростає кількість недоокиснених метаболітів, концентрація вільних радикалів кисню та виснаження антиоксидантної системи, наприклад каталази (КТ) [2].

Отже, високоокисні сполуки, такі як ДК, та ТБК-АП, які утворюються при активації ПОЛ, призводять до ушкодження мембран та клітинних структур і разом з енергодефіцитом та метаболічним ацидозом сприяють альтерації більшості паренхіматозних органів, і зокрема легеневої тканини [3].

Метою роботи було встановити в динаміці зміни показників прооксидантно-антиоксидантних систем при гострому L-аргінін індукованому панкреатиті.

Матеріал і методи дослідження

Дослідження проводилися на 62 білих щурах-самцях лінії Вістар масою 180-220 г, що утримувалися на стандартному раціоні з вільним доступом до води. Тварини були розділені на 4 групи: I – інтактна група тварин ($n=10$); II – контрольна ($n=10$), – внутрішньоочеревинно вводили фізіологічний розчин, з розрахунку 1 мл на 100 г маси щура; III – з моделлю гострого панкреатиту ($n = 42$). Всі дослідження проводили під загальним знечуженням, з використанням кетаміну (40 мг/кг). Утримання тварин та маніпуляції проводилися відповідно до положень Закону України «Про захист тварин від жорстокого відношення» (№1759-VI від 15.12.2009). Після закінчення експерименту всі тварини піддавалися евтаназії.

Експериментальний панкреатит відтворювали двома внутрішньоочеревинними ін'єкціями 20% розчину L-аргініну в сумарній дозі 5 г/кг з одногодинним інтервалом. Забір крові для біохімічного дослідження проводили через 12, 24, 48 та 72 годин від початку експерименту.

Вміст ДК визначали за методом [4], ТБК-АП- за методом [6], каталази (КТ)- за методом [1].

Отримані дані статистично обробляли із застосуванням непараметричних критеріїв на персональному комп'ютері за допомогою програми «Statistica 7» («Statsoft, Inc.» – США). Достовірність оцінювали за критерієм Вілкоксона та Sign-тесту. Відмінності вважалися достовірними, якщо величина P складала 95% і більше ($p<0,05$).

Результати дослідження та їх обговорення

Проведені біохімічні дослідження, свідчать що вже на 12 год. ГП відбувалося достовірно збільшення рівня ДК – на 31,6% (рис.1), ТБК-АП – на 53,9% (рис.2) та одночасно активація антиоксидантних систем, зокрема рівень КТ збільшився на 40,3% (рис.3) ($p<0,05$) порівняно з контролем в усіх дослідних групах.

Найбільш інтенсивний приріст всіх показників крові відбувалися через 24 год. від початку дослідження у тварин із ГП. Встановлено достовірний приріст ТБК-АП і ДК – відповідно у 1,98 та 2,7 раза, КТ – у 2,2 раза. Отже, порівняно з попереднім етапом дослідження, на 24 год. показники окисних реакцій зростали найшвидше, оскільки при L-аргініновій моделі ГП, вже через добу експерименту відбу-



Рис. 1. Графічний аналіз рівня дієвих кон'югат (ДК) у щурів при експериментальному гострому панкреатиті

вається некроз ацинарних клітин ПЗ.

На наступному етапі експерименту відбувається сповільнення темпів приросту ПОЛ про що свідчать наступні значення. Так, на 48 год. у III групі: ТБК-АП – зросли на 5,1% ($p>0,05$), ДК – на 3,3% ($p>0,05$), рівень КТ – на 43,4% ($p<0,05$), порівняно з даними на 24 год. Можна припустити, що на 48 год. експерименту рівень активності залишається високим, що свідчить про спробу пригнічення організмом бурхливих реакцій з утворенням АФК.

Відомо, що АФК можуть пошкоджувати всі компоненти клітин, зокрема ліпіди, структурні та регуляційні білки, вуглеводи. Пероксидне пошкодження мембранних структур порушує їхню плинність, іонний транспорт і зрештою призводить до втрати клітинами функціональної активності. Окисне пошкодження ліпідів мембран індукує загибель клітин шляхом апоптозу чи некрозу, що є одним із механізмів ушкодження багатьох органів, таких, як легені за умов гострого деструктивного панкреатиту [10].

Дослідження крові тварин на останньому етапі експерименту показали незначне збільшення показників ПОЛ порівняно з 24 та 48 годинами в III групі. Важливо зазначити, що на 72 год. експерименту рівень КТ (див. рис. 3) зменшився на 23,3% ($p>0,05$), що може свідчити про виснаження антиоксидантних систем. Показники ПОЛ на 72 год. порівняно з 48 год. у III групі: ТБК-АП – зросли на 1,7% ($p>0,05$), ДК – на 5,7% ($p>0,05$).

Одна з особливостей ГП – здатність швидко переходити

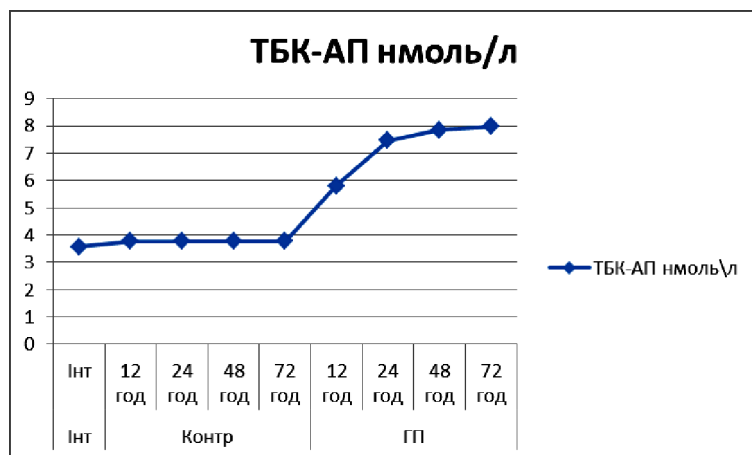


Рис. 2. Графічний аналіз рівня активних продуктів тіобарбітурової кислоти (ТБК-АП) у щурів при експериментальному гострому панкреатиті

від легкої форми до тяжкої, яка загрожує життю за рахунок викиду великої кількості прозапальних медіаторів та розвитку ССЗВ, що значною мірою визначає тяжкість ГП [9]. В умовах запалення та ішемії порушується баланс пероксидних реакцій, зростає кількість недоокиснених метаболітів, концентрація АФК значно збільшується, а антиоксидантні системи виснажуються. При недостатності антиоксидантних систем, таких як КТ, відбувається нестримна пероксидація мембранних ліпідів, що призводить до збільшення проникності клітинних мембран за рахунок утворення наскрізних полярних каналів і в результаті пошкодження ациноцитів ПЗ [12]. Пошкоджені ацинарні клітини вивільнюють АФК, продукти ПОЛ, які здатні активувати нейтрофіли з подальшим потенціюванням ССЗВ і мікроциркуляційних розладів. Незадовільні результати лікування та високий рівень летальності при тяжких формах гострого панкреатиту багато в чому визначаються

складним і недостатньо вивченим патогенезом та несвочасним прогнозуванням перебігу запалення ПЗ [13].

Отже, гострий деструктивний панкреатит провокує і поглиблює утворення ПОЛ та призводить до істотних порушень балансу прооксидантно-антиоксидантних систем, на що вказує і ряд інших авторів [10, 12, 13].

Висновки

1. Гострий L-аргінін індукований панкреатит супроводжується інтенсифікацією процесів ПОЛ, які можуть потенціювати розвиток поліорганної недостатності при запаленні підшлункової залози.

2. Найбільш стрімкі зміни показників ПОЛ спостерігаються на 24 годину дослідження.

Перспективи подальших досліджень

У подальшому передбачається дослідити прооксидантно-антиоксидантний статус легеневої тканини при гострому експериментальному панкреатиті.

Література

1. Бабенко Г.О. Визначення мікроелементів і металоферментів у клінічних лабораторіях / Бабенко Г.О. – К., 1968. – 138с.
2. Берник О.О. Пероксидне окиснення білків печінки за умов гіпоацидного стану / О.О. Берник, О.М. Савчук, К.О. Дворченко, Т.В. Берегова, Л.І. Остапченко // Фізика живого. – 2010. – Т.18, №3. – С. 89–92.
3. Беський В.О. Показники вільнорадикального окиснення крові та бронхоальвеолярного лаважу при синдромі гострого ушкодження легень / В.О. Беський, Л.А. Гришук, М.І. Марущак // Сучасні медичні технології. – 2014. – №2. – С. 48–54.
4. Гаврилов В.Б. Изменение диеновых конъюгатов в плазме по ультрафиолетовому поглощению гептановых и изопропиловых экстрактов / В.Б. Гаврилов, А.Р. Гаврилова, Н.Ф. Хмара Н.Ф. // Лаб. Дело. – 1988. – №2. – С. 60-64.
5. Дацюк О.І. Особливості інфузійної терапії у хворих за тяжкого гострого деструктивного панкреатиту / О.І. Дацюк, В.О. Шапринський, І.П. Шлапак // Клін. хірургія. — 2013. — № 9. — С. 22-25.
6. Коробейникова Е.Н. Модификация измерения продуктов перекисного окисления липидов в реакции с тиобарбитуровой кислотой / Е.В. Коробейникова – Лаб. Дело. – 1989. – №7. – С. 8–10.
7. Криворучко И.В. Дифференцированный подход к выбору метода лечения псевдокист поджелудочной железы / И.В. Криворучко // Клін. хірургія. — 2013. — № 7. — С. 16-19.

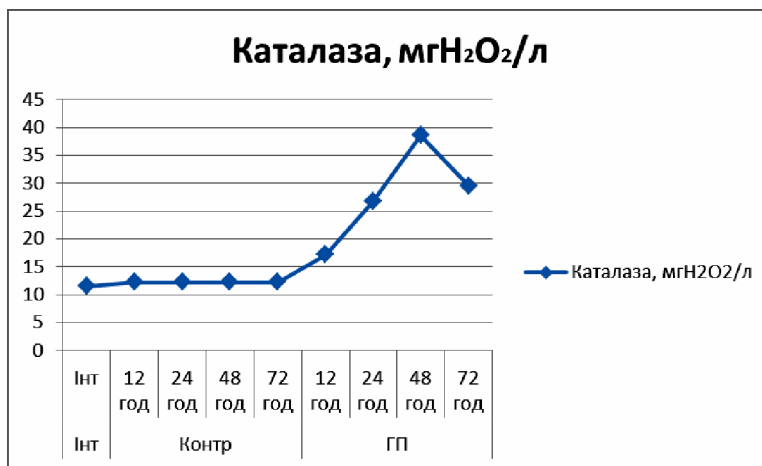


Рис. 3. Графічний аналіз рівня каталази (КТ) у шурів при експериментальному гострому панкреатиті

8. Литвиненко О.М. Альтернативний метод прогнозування гострого панкреатиту / О.М. Литвиненко, І.В. Гомоляко, А.С. Калюжка // Клін. хірургія. — 2013. — № 4. — С. 28-31.

9. Максим'юк В.В. Сучасні підходи до діагностики, прогнозування перебігу та лікування гострого некротичного панкреатиту / В.В. Максим'юк // Медицина невідкладних станів. — 2014. — № 7(62). — С. 84-87.

10. Чуклін С.М. Маркери оксидативного стресу як показники тяжкості гострого панкреатиту / С.М. Чуклін, І.Ю. Бігальський, А.А. Переяслов // Український журнал хірургії. — 2011. — №6(15). — С. 159–163.

11. An assessment of the severity of interstitial pancreatitis / Singh V.K., Bollen T.L., Wu B.U. et al. // Clin. Gastroenterol. Hepatol. — 2011. — Vol. 9. — P. 1098-1103.

12. Cruz-Santamaria D.M. Update on pathogenesis and clinical management of acute pancreatitis / D.M. Cruz-Santamaria, C. Taxonera, M. Iner // World J Gastrointest. Pathophysiol. — 2012. — Vol. 3, № 3. — P. 60–70.

13. Mukaddes Esrefoglu Experimental and clinical evidence of antioxidant therapy in acute pancreatitis / Mukaddes Esrefoglu // World J Gastrointest. — 2012. — Vol. 18, № 39. — P. 5533–5541.

Черкасова В.В., Заяц Л.М.

Изменения прооксидантно-антиоксидантной системы при экспериментальном остром панкреатите

Резюме. Введение. Летальность при остром деструктивном панкреатите, несмотря на разработку и внедрение новых методов лечения, остается стабильно высокой и при тяжелых формах достигает 25-85%. Активизация нейтрофилов и макрофагов при остром панкреатите приводит к «кислородному взрыву», что тесно связано с активацией перекисного окисления липидов.

Цель - установить в динамике изменения показателей оксидантно-антиоксидантной системы при остром L-аргинин индуцированном панкреатите.

Материалы и методы. В статье представлены результаты исследования, проведенного на 62 белых крысах-самцах линии Вистар массой 180-220 г, которым был смоделирован острый панкреатит. В крови животных через 12, 24, 48 и 72 часа определяли уровень активности продуктов тиобарбитуровой кислоты, диеновых конъюгатов, каталазы для оценки интенсивности оксидантного стресса и антиоксидантных систем.

Результаты. Полученные результаты исследования показали, что острый L-аргинин индуцированный панкреатит сопровождается интенсификацией процессов перекисного окисления липидов. Установлено, что наиболее выраженный прирост всех показателей крови достигается через 24 ч от начала исследования. Выявлено достоверный прирост активных продуктов тиобарбитуровой кислоты (ТБК-АП) и диеновых конъюгатов (ДК) - соот-

ветственно в 1,98 и 2,7 раза, также рост каталазы (КТ) - в 2,2 раза. На следующем этапе эксперимента происходит замедление темпов прироста перекисного окисления липидов (ПОЛ) о чем свидетельствуют следующие значения. Так, на 48 ч в III группе: ТБК-АП - выросли на 5,1% (p> 0,05), ДК - на 3,3% (p> 0,05), уровень КТ - на 43,4% (p <0,05) по сравнению с данными на 24 ч. Важно отметить, что на 72 ч уровень КТ уменьшился на 23,3% (p <0,05), что может свидетельствовать об истощении антиоксидантных систем. Показатели ПОЛ на 72 ч по сравнению с 48 ч в III группе выросли: ТБК-АП - на 1,7% (p> 0,05), а ДК - на 5,7% (p> 0,05).

Выводы. Острый L-аргинин индуцированный панкреатит сопровождается интенсификацией процессов ПОЛ, которые могут усиливать развитие полиорганной недостаточности при воспалении поджелудочной железы. Наиболее быстро увеличивающиеся изменения показателей ПОЛ наблюдаются на 24 часа исследования.

Ключевые слова: острый панкреатит, перекисное окисление липидов, продукты тиобарбитуровой кислоты, диеновые конъюгаты, каталаза.

V.V. Cherkasova, L.M. Zaiats

Changes of Prooxidant-Antioxidant Systems in Experimental Acute Pancreatitis

Abstract. Introduction. Mortality in acute destructive pancreatitis, despite the development and introduction of new methods of treatment, remains stable high and in severe forms reaches 25-85%. Activation of neutrophils and macrophages in acute pancreatitis leads to an "oxygen burst", which is closely linked with the activation of lipid peroxidation.

Goals. The purpose is to establish dynamic changes in the indexes of prooxidant-antioxidant systems in acute L-arginine-induced pancreatitis.

Materials and methods. The study was performed on 62 white male rats of Wistar line weighing 180-220g, with modeled acute pancreatitis. Blood for analysis have been taken: the blood serum on 12, 24, 48 and 72 hours of experiment to determine the activity level of thiobarbituric acid products, diene conjugates, catalase and lactate for assessment of the intensity of oxidative stress and antioxidant systems.

Results. The obtained results of the study showed that acute L-arginine-induced pancreatitis is accompanied by an intensification of lipid peroxidation processes (LPO). Revealed that the most pronounced increase in all blood parameters is observed 24 hours after the beginning of the study. A significant increase in the active products of thiobarbituric acid (TBA-AP) and diene conjugates (DC) was detected - 1.98 and 2.7 times, respectively, and 2.2 times the growth of catalase (CT). At the next stage of the experiment there is a slowdown in the rate of LPO, as evidenced by the following values. Thus, for 48 years in the 3rd group: TBA-AP - they increased by 5.1% (p> 0.05), DC - by 3.3% (p> 0.05), and the level of CT - by 43.4% (P <0.05), compared with data for 24 hours. It is important to note that at 72 hours, the CT level decreased by 23.3% (p> 0.05), which may indicate an exhaustion of antioxidant systems. Indicators of LPO on 72 hours compared with 48 hours in group III: TBA-AP - increased by 1.7% (p> 0.05), DC - by 5.7% (p> 0.05).

Conclusions. Acute L-arginine-induced pancreatitis is accompanied by an intensification of lipid peroxidation-oxidation processes that can potentiate the development of multiple organ failure in pancreatic inflammation. The most pronounced changes in lipid peroxidation-oxidation rates are observed for 24 hours of study.

Key words: acute pancreatitis, lipid peroxidation, products of thiobarbituric acid, diene conjugates, catalase.

Надійшла: 11.07.2017

Завершено рецензування: 27.09.2017

Прийнята до друку: 28.09.2017