

ОКИСЛЮВАЛЬНИЙ СТРЕС У ЛЕЙКОЦИТАХ КРОВІ, ПРО/АНТИОКСИДАНТНИЙ СТАТУС ТА ЖИРНОКИСЛОТНИЙ СКЛАД ЛІПІДІВ ПІДШЛУНКОВОЇ ЗАЛОЗИ ЗА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ГОСТРОГО ПАНКРЕАТИТУ В ЩУРІВ

І. Б. ПРИВРОЦЬКА¹, Т. М. КУЧМЕРОВСЬКА²

¹ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет
ім. І. Я. Горбачевського МОЗ України»;

²Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: irina.privrotska@yandex.ua

На експериментальній моделі гострого панкреатиту (ГП) в щурів методом протокової цитометрії виявлено, що життєздатність лейкоцитів крові не змінюється порівняно з таким показником у контрольній групі тварин. Через 1 добу після розвитку ГП продукування активних форм оксигену (АФО) в гранулоцитах збільшується в 5 разів, однак через 3 доби ГП рівень АФО зменшується. Встановлено порушення про/антиоксидантного статусу та специфічні зміни у складі жирних кислот у підшлунковій залозі. За розвитку ГП інтенсифікуються процеси ліпопероксидації та змінюється активність ферментів антиоксидантної системи, що є свідченням розвитку запальних процесів у підшлунковій залозі, а також зростає активність фосфоліпази А₂, що супроводжується значними змінами жирнокислотного складу загальних ліпідів підшлункової залози. При цьому підвищується вміст насичених жирних кислот: міристинової, пальмітинової та стеаринової, з одночасним зниженням сумарного вмісту поліненасичених жирних кислот, у першу чергу, есенціальних жирних кислот родини ω-3: ліноленової, ейкозапентаєнової, докозапентаєнової, докозагексаєнової. Застосування препарату БАД «Альфа+омега», який містить ω-3 поліненасичені жирні кислоти сприяло частковій нормалізації окислювального стресу в лейкоцитах та їх життєздатності, жирнокислотного складу та прооксидантно-антиоксидантної системи підшлункової залози.

Ключові слова: гострий експериментальний панкреатит, лейкоцити крові, активні форми оксигену, жирнокислотний склад, пероксидне окислення ліпідів, антиоксидантна система, ω-3 жирні кислоти.

Гострий панкреатит (ГП) – це захворювання, що супроводжується швидким розвитком запальних процесів внаслідок некробіозу панкреатоцитів, а також різним ступенем некрозу паренхіми підшлункової залози та її руйнуванням. Серед патологій органів черевної порожнини ГП займає третє місце. При цьому смертність, особливо за деструктивних його форм, є високою [1]. Вважають, що в основі розвитку ГП лежить інтенсифікація утворення активних форм оксигену (АФО) у підшлунковій залозі (ПЗ) [1, 2]. Не виключено, що за цих умов у першу чергу реагують клітини крові, зокрема лейкоцити. Відомо, що окремі типи лейкоцитів відрізняються за походженням, морфологією, функціональними та цитохімічними властивостями. Розвиток різних патологічних станів спричинює зміни в їх перерозподілі [3].

Під час активного утворення АФО інтенсифікуються процеси пероксидного окислення мембранних ліпідів (ПОЛ),

що призводить до підвищення проникності ацинусів та посилення окислювального стресу [4, 5]. Активація процесів ПОЛ має причинно-наслідкові зв'язки із структурно-функціональною цілісністю мембранних структур і зумовлює їх модифікації, в першу чергу, за рахунок окислення поліненасичених жирних кислот (ПНЖК), що призводить до загибелі клітин ПЗ [6, 7].

Зміни структурно-функціонального стану ліпідного бішару мембран клітин ПЗ порушують вибірково проникність, рецепторопосередковане сприйняття гормональних, медіаторних та інших впливів, що призводить до розвитку патологічних процесів як у ПЗ, так і в інших органах [1, 8]. Відомо, що рівень насиченості жирних кислот (ЖК) регулюється складними системами ферментів, серед яких ключова роль належить десатуразам, які каталізують утворення подвійних зв'язків у молекулах довголанцюгових ЖК [9]. За даними літератури відомо, що активність десату-

раз, у тому числі $\Delta 6$ -десатурази, залежить від багатьох факторів [7]. Кількість подвійних зв'язків у ланцюзі визначають температуру фазового переходу, фізико-хімічні властивості мембранних фосfolіпідів, а також плинність біологічних мембран [9]. Відомо, що окремі ПНЖК є сигнальними молекулами, які впливають на функціональну активність багатьох клітин. Тому зміна вмісту та співвідношення жирних кислот можуть порушувати регуляцію біохімічних процесів у клітині та призводити до патологічного стану. Крім того, зміна складу ліпідів впливає на фізико-хімічні властивості плазматичних мембран, що значною мірою визначає особливості адаптивної відповіді клітин на дію чинників внутрішнього та зовнішнього середовищ [7, 9].

У зв'язку з цим актуальним є проведення досліджень, які дали б змогу з'ясувати чи відбуваються зміни у лейкоцитах крові, оцінити наявність функціональних змін ліпідного профілю, особливо жирнокислотного складу в підшлунковій залозі, в динаміці розвитку ГП. Такі дослідження не тільки дозволять з'ясувати деякі механізми, які лежать в основі розвитку та перебігу ГП, але й сприятимуть цілеспрямованому пошуку ефективних препаратів для корекції цього захворювання. На сьогодні вважають, що застосування ПНЖК ω -3 у складі біодобавок для лікування панкреатитів обумовлено також їхніми метаболітами, які виявляють виражену протизапальну дію. [10]. Це і стало підґрунтям застосування за ГП біологічно активної добавки (БАД) «Альфа+омега» (« α + ω ») як джерела ПНЖК ω -3, вітамінів А та Е і мікроелементів цинку і селену. Відомо, що ці жиророзчинні вітаміни є компонентами неензиматичної антиоксидантної системи захисту організму та мають специфічну спорідненість до мембранних ліпідів [11], а цинк і селен входять до складу деяких антиоксидантів, ензимів або активують їх.

Метою роботи було дослідити життєздатність лейкоцитів крові та рівень окислювального стресу в них, порушення жирнокислотного складу загальних ліпідів, процесів ПОЛ та активності антиоксидантних ензимів у тканині підшлункової залози щурів у динаміці розвитку ГП та з'ясувати чи здатен препарат, що містить ω -3 жирні кислоти, вітаміни А та Е і мікроелементи покращувати стан тварин.

Матеріали і методи

Дослідження проводили на статевозрілих самцях безпородних білих щурів з масою тіла 200–230 г. Експерименти проводили відповідно до «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених на I Національному конгресі з біоетики (Київ, 2000). Тварин утримували у стандартних умовах із природними змінами освітлення на загальному раціоні віварію при вільному доступі до їжі та води. Піддослідних тварин було розділено на 7 груп по 5 тварин у кожній: 1 – (контрольна), щурам якої одноразово інтраперитонеально вводили по 0,5 мл ізотонічного розчину NaCl; 2, 4, 6 – тварини з експериментальним ГП, який моделювали шляхом одноразового інтраперитонеального введення натщесерце L-аргініну гідрохлориду (Sigma, США) у дозі 4 г/кг [12] і яких використовували для досліджень відповідно через 1, 3 і 7 діб після введення аргініну; 3, 5, 7 – тварини з експериментальним ГП, яким через годину після 1-, 3- і 7-ї доби ін'єкції аргініну вводили внутрішньощлунково БАД «Альфа+омега» в дозі 0,5 мг/кг [13] впродовж 7 діб. Дослідження на лейкоцитах крові проводили лише через одну та три доби після введення аргініну, оскільки саме в цей термін патологія є найбільш вираженою [12]. Тварин, яких за 15 год до закінчення експерименту позбавляли їжі, декапітували під тиопентал-натрієвим наркозом (внутрішньочеревино вводили 1%-й розчин із розрахунку 50 мг/кг). Забір крові в тварин здійснювали вранці після голодування (12 год) із ретробульбарного венозного синуса ока. У день експерименту з периферичної крові піддослідних тварин отримували лейкоцити, які (після закінчення часу лізису наявних у фракції еритроцитів) осаджували центрифугуванням. Осад, двічі промитий фізіологічним розчином за центрифугування, ресуспендували до кінцевої концентрації – $5 \cdot 10^6$ кл/мл.

На сьогодні для оцінки оксидативного стресу в клітинах переважно використовують стандартні методи вимірювання, які базуються на здатності АФО окислювати субстрати з утворенням кольорових або флуоресцентних продуктів. Ефективнішим є метод протокової цитометрії, який дозволяє провести якісний та кількісний аналіз біологічних та фізичних властивостей клітин і субклітинних структур за кількома параметрами одночасно [14]. Тому в наших дослідженнях життєздатність лейкоцитів

крові та продукцію АФО оцінювали на потоковому цитометрі COULTER EPICS XL (Beckman Coulter, США) з аргонним лазером ($\lambda_{\text{збудж.}} = 488 \text{ нм}$). Продукцію АФО в лейкоцитах крові вимірювали, використовуючи 2',7'-дихлородигідрофлуоресцеїн діацетат у концентрації 50 мкмоль/л (Sigma-Aldrich, США), який після окислення перетворювався у флуоресціюючий 2',7'-дихлорфлуоресцеїн. Інтенсивність випромінювання досліджуваних зразків реєстрували за каналом FL1 (515–535 нм). Оцінку співвідношення між різними популяціями лейкоцитів проводили з використанням двох параметрів протокового цитометра: розміру (величина прямого світлорозсіювання FS) та гранулярності клітин (бічне світлорозсіювання SS). Життєздатність досліджуваних клітин оцінювали за каналом FL3 (620–630 нм), використовуючи ядерний флуоресцентний зонд пропідій йодид (Sigma-Aldrich) у кінцевій концентрації 10 мкг/мл, що проникає лише у мертві клітини та ті, у яких пошкоджена цитоплазматична мембрана. Було проаналізовано більше 10 тис. подій з кожного зразку. Обробку результатів проводили за допомогою програми FCS Express V3.

Для досліджень використовували також плазму крові та підшлункову залозу, яку швидко вилучали та готували 10%-ий гомогенат із 0,25 М сахарозою на 10 мМ трис-НСІ-буфері, рН 7,4, із внесенням 1 мМ ЕДТА. У відібраних зразках ПЗ визначали вміст ЖК, жирнокислотний склад загальних ліпідів, у плазмі крові – активність фосфоліпази A_2 (3.1.1.4, ФЛА $_2$) та активність α -амілази (3.2.1.1). Активність супероксиддисмутази (СОД, 1.15.1.1) у підшлунковій залозі визначали згідно з методом, який ґрунтується на відновленні барвника нітросинього тетразолію до формазану [15]. Активність каталази (КАТ, 1.11.1.6) оцінювали за методикою, що базується на реакції гідроген пероксиду з молібдатом амонію [16]. Рівень продуктів вільнорадикального окислення ліпідів встановлювали за вмістом дієнових кон'югатів (ДК) згідно з методом [17], а ТБК-активні продукти – за реакцією з тіобарбітуратом кислотою [18]. Ліпіди з гомогенату ПЗ екстрагували сумішшю хлороформ–метанол у співвідношенні 2 : 1 за методом Фолча [19]. Метилування жирних кислот у ліпідних екстрактах проводили метилатом натрію за кімнатної температури з наступним підкисленням сірчаною кислотою, після чого метилування продовжували при температурі 70 °С [20]. Жирнокислотний склад визначали методом газорідинної хроматографії на газовому хроматографі Hewlett Packard HP-6890

з полум'яно-іонізаційним детектором та капілярною колонкою Supelco SP-2380 (довжина капілярів 100 м). Програмували температуру термостата колонок в діапазоні від 40 до 260 °С. Температура дозатора – 280 °С, детектора – 290 °С. Газ-носії – гелій. Для ідентифікації хроматографічних піків та обрахунку хроматограм застосовували стандарти метилових ефірів жирних кислот (Supelco). У плазмі крові визначали згідно з [21] активність фосфоліпази A_2 , а α -амілази – методом Каравея із використанням стандартного набору (ТОВ НВП Філісіт-Діагностика, Україна) [22]. Статистичну обробку одержаних результатів здійснювали за допомогою комп'ютерної програми STATISTICA 10,0 із застосуванням непараметричного U-критерію Манна-Вітні.

Результати та обговорення

Оскільки оцінка активності α -амілази у плазмі крові людини чи тварин є переконливим діагностичним маркером функціонального стану підшлункової залози, а підвищення активності цього ензиму є критерієм розвитку панкреатиту, доцільно було оцінити активність α -амілази у плазмі крові досліджуваних груп тварин. Як показали результати проведених нами досліджень (рис. 1), активність α -амілази у плазмі крові в динаміці розвитку ГП, значно зростає вже через добу після введення аргініну і перевищує відповідний показник контрольної групи в 3,4 раза, що узгоджується з даними літератури [4, 23]. Це свідчить про те, що ГП у тварин розвивається досить швидко і зберігається протягом певного терміну, оскільки через три та сім діб експерименту активність α -амілази залишається підвищеною в 4,0 та 3,9 раза відповідно порівняно з такими показниками в контрольній групі.

За розвитку ГП важливо було оцінити вплив цього стану на життєздатність лейкоцитів крові та на продукцію АФО. Представлені на рис. 2 дані продемонстрували, що в залежності від розміру клітин та гранулярності їхніх ядер, що реєструється прямим та боковим світлорозсіюванням за допомогою цитофлуориметра, серед лейкоцитів крові можна виділити дві субпопуляції, а саме гранулоцити та агранулоцити. Їх життєздатність та продукцію АФО оцінювали за інтенсивністю флуоресценції пропідій йодиду та 2',7'-дихлорфлуоресцеїн відповідно. Як свідчать представлені на рис. 3 дані, не було виявлено зниження кількості живих клітин у крові тварин за ГП порівняно з контрольною групою. Застосування протягом тижня БАД

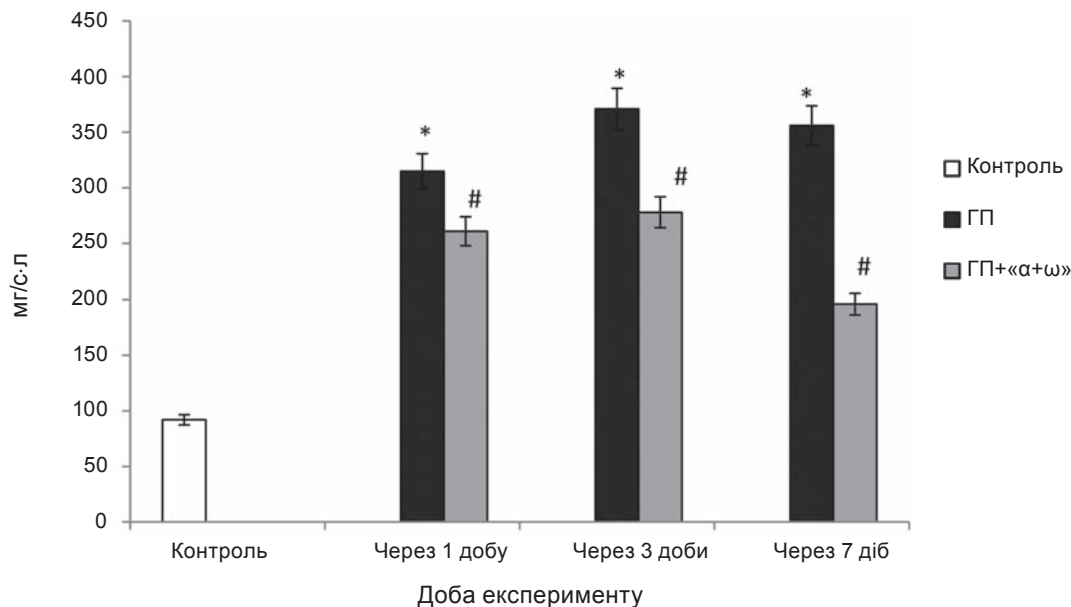


Рис. 1. Активність α -амілази в плазмі крові щурів за гострого панкреатиту та за введення БАД «Альфа+омега» ($M \pm m, n = 5$): контроль – 1 група; через 1 добу: 2 група – тварини з ГП, 3 група – тварини з ГП + « $\alpha + \omega$ »; через 3 доби: 4 група – тварини з ГП, 5 група – тварини з ГП + « $\alpha + \omega$ »; через 7 діб: 6 група – тварини з ГП, 7 група – тварини з ГП + « $\alpha + \omega$ »; * вірогідність відмінностей порівняно з контролем, $P < 0,05$; # вірогідність відмінностей порівняно з тваринами з ГП відповідних термінів, $P < 0,05$

«Альфа+омега», як виявилось, також не впливало на кількість мертвих клітин крові.

Через 1 добу після розвитку ГП життєздатність лейкоцитів крові та співвідношення між двома основними типами лейкоцитів не змінюється (рис. 4). Однак вже через 3 доби кількість гранулоцитів у крові зростає у 2,4 раза, що може бути обумовле-

но посиленням розвитку запальних процесів в організмі тварин [24]. Після введення щурам БАД «Альфа+омега» не спостерігається відновлення рівноваги між кількістю гранулоцитів та агранулоцитів через 3 доби прояву симптомів ГП до рівня контролю.

Під час оцінки окислювального стресу в лейкоцитах щурів виявлено, що базальний

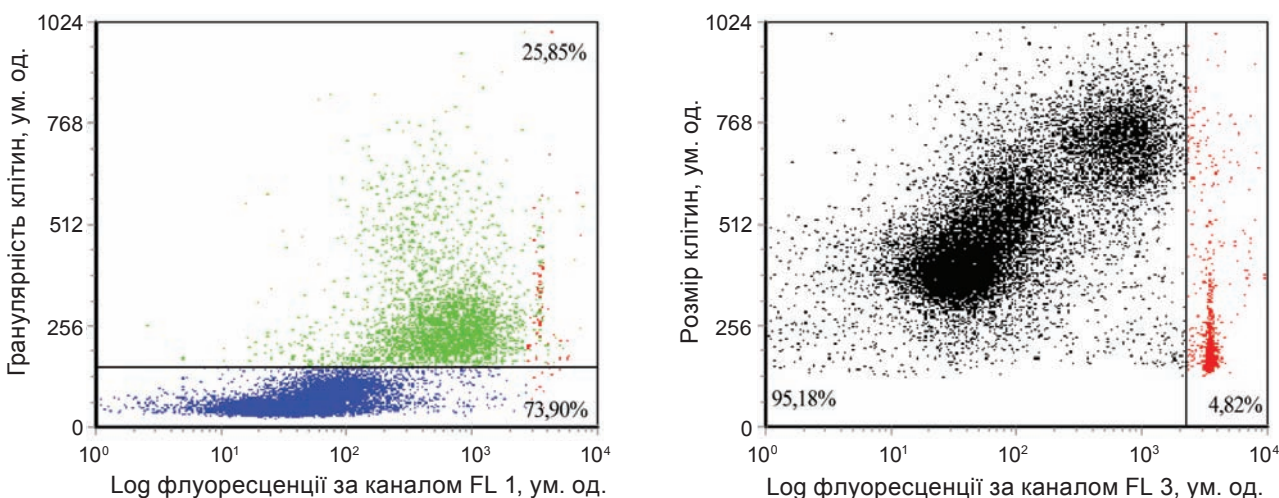


Рис. 2. Графічне зображення інтенсивності флуоресценції 2',7'-дихлорофлуоресцеїн діацетату (DCFH) та пропідій йодиду (PI) в препаратах лейкоцитів крові щурів. На рисунку зображено: гранулоцити – зеленим, агранулоцити – синім та мертві клітини – червоним кольором

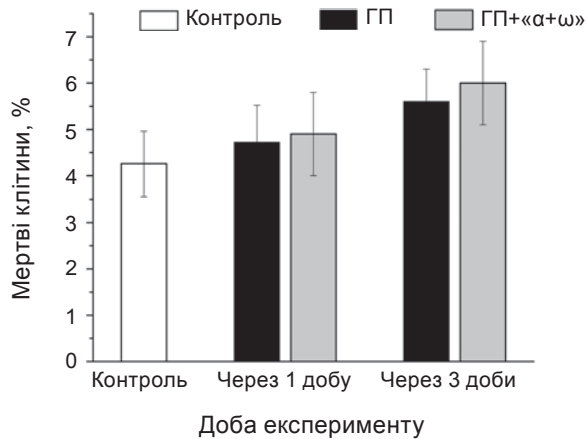


Рис. 3. Життєздатність лейкоцитів крові за гострого панкреатиту, ($M \pm m$, $n = 5$)

рівень продукування АФО у гранулоцитах через 1 добу після індукції ГП зростає більше ніж у 5 разів порівняно із контрольною групою, в той час як через три доби рівень АФО підвищується лише у 2 рази (рис. 5). При цьому вплив БАД «Альфа+омега» на цей показник є незначним. Рівень продукування АФО в агранулоцитах через 1 добу після розвитку ГП не змінюється порівняно з контрольною групою, але через три доби ГП продукування АФО збільшується в 1,5 раза, рис. 6. Ці дані також узгоджуються з даними щодо надмірного утворення АФО за інших патологічних станів, зокрема цукрового діабету, що призводить до розвитку окислювального стресу в клітинах [25].

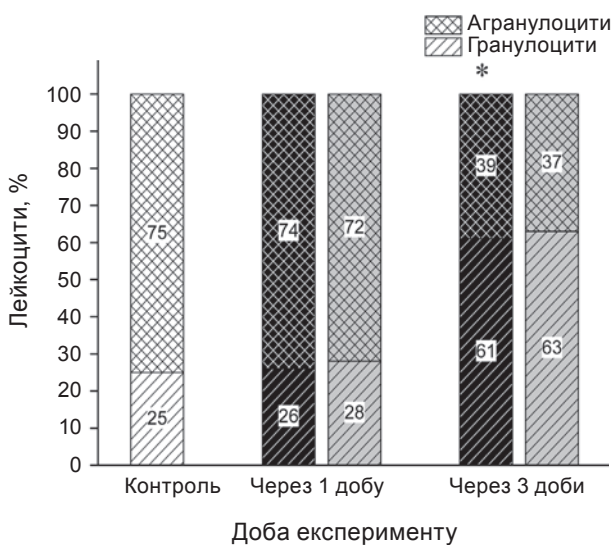


Рис. 4. Перерозподіл лейкоцитів крові в групах піддослідних тварин ($n = 5$), * відмінності вірогідні порівняно з контролем, $P < 0,05$

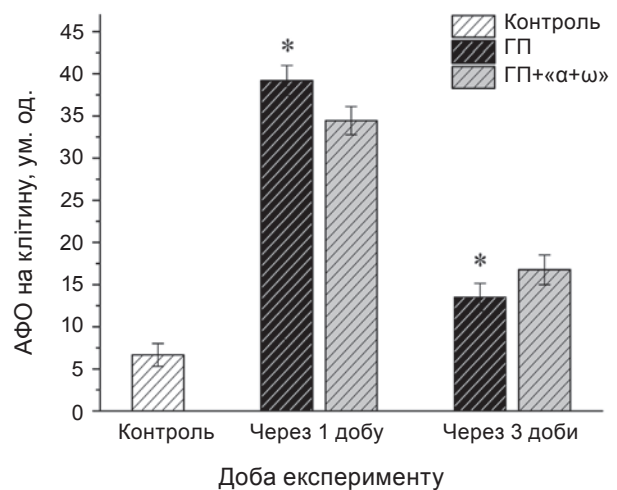


Рис. 5. Рівень АФО в гранулоцитах крові щурів із гострим панкреатитом, ($M \pm m$, $n = 5$), * вірогідні відмінності порівняно з контролем, $P < 0,05$

Для з'ясування ступеня прогресування патологічного процесу за ГП нами оцінено вміст продуктів пероксидації ліпідів у підшлунковій залозі. Як свідчать дані, представлені у табл. 1, вміст ДК у гомогенатах ПЗ щурів вже через 1 добу з моменту введення аргініну збільшується в 1,4, через 3 доби – у 1,7, а через 7 діб – у 2,1 раза. Вміст ТБК-активних продуктів у гомогенатах ПЗ щурів також зростає і вже через 1 добу після початку розвитку ГП є більшим у 1,4; через 3 доби – у 1,6; а через 7 діб – у 2,1 раза. Підвищення

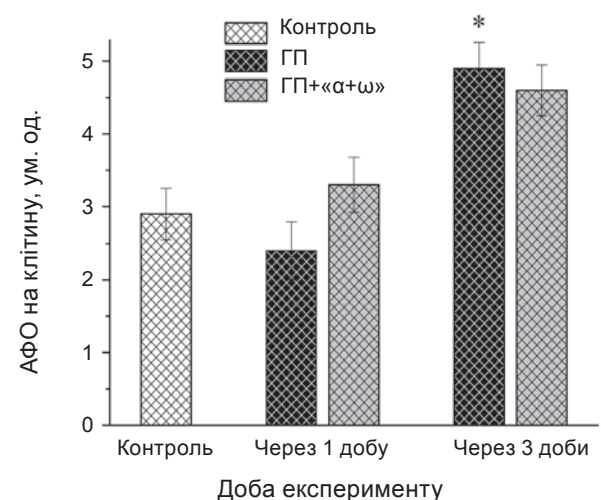


Рис. 6. Рівень АФО в агранулоцитах крові щурів із гострим панкреатитом, ($M \pm m$, $n = 5$), * відмінності вірогідні порівняно з контролем, $P < 0,05$

Таблиця 1. Показники про/антиоксидантної системи у підшлунковій залозі щурів за ГП та за введення БАД «Альфа+омега» ($M \pm m$, $n = 5$)

Показник	Група тварин						
	1	2	3	4	5	6	7
	Контроль	Через 1 добу		Через 3 доби		Через 7 днів	
	ГП	ГП+« α + ω »	ГП	ГП+« α + ω »	ГП	ГП+« α + ω »	ГП+« α + ω »
ДК, ум. од. на 1 г тканини	5,1 ± 0,3	7,3 ± 0,4*	6,9 ± 0,5*	8,6 ± 0,5*	8,1 ± 0,4*	10,7 ± 0,6*	8,3 ± 0,5*#
ТБК – АП, нмоль/г тканини	6,1 ± 0,4	8,4 ± 0,6*	7,9 ± 0,5*	9,9 ± 0,6*	8,6 ± 0,7*	12,8 ± 0,7*	9,0 ± 0,6*#
СОД, ум. од./хв-мг протеїну	42,0 ± 3,0	126,0 ± 9,0*	105,0 ± 8,0*	137,0 ± 13,0*	114,0 ± 9,0*	158,0 ± 12,0*	107,0 ± 6,0*#
Каталаза, мкмоль/хв-мг протеїну	5,51 ± 0,43	3,17 ± 0,16*	3,74 ± 0,25*#	2,89 ± 0,28*	3,36 ± 0,19*	2,31 ± 0,18*	3,82 ± 0,25*#

Тут і в табл. 3: контроль – 1 група; через 1 добу: 2 група – тварини з ГП, 3 група – тварини з ГП + « α + ω »; через 3 доби: 4 група – тварини з ГП, 5 група – тварини з ГП + « α + ω »; через 7 днів: 6 група – тварини з ГП, 7 група – тварини з ГП + « α + ω »; * відмінності вірогідні порівняно з контролем, $P < 0,05$; # відмінності вірогідні порівняно з тваринами з ГП відповідних термінів, $P < 0,05$.

вмісту продуктів пероксидації ліпідів може бути свідченням розвитку окислювального стресу за ГП, що узгоджується з даними інших дослідників [1, 2, 6]. При дослідженні впливу БАД «Альфа+омега» за ГП встановлено часткове зниження інтенсивності процесів ПОЛ та активності ензимів АОС у підшлунковій залозі. Найвираженіший вплив БАД на досліджувані процеси спостерігали через 7 днів після введення аргініну (7-ма група). Вміст ДК у гомогенатах ПЗ щурів зменшувався у 1,3, а вміст ТБК-активних продуктів – в 1,4 раза порівняно з 6-ю групою тварин із ГП (табл. 1). Баланс між прооксидантами та компонентами системи антиоксидантного захисту (супероксиддисмутаза, каталаза, глутатіонпероксидаза тощо) зазнає суттєвих змін саме за інтенсифікації ПОЛ в організмі тварин [11]. У разі оцінки стану антиоксидантної системи за ГП виявлено підвищення активності СОД, одного з основних ензимів цієї системи, що може бути адаптаційним механізмом у відповідь на інтенсифікацію окислювального стресу в ПЗ. Так, у гомогенатах ПЗ щурів вже через 1 добу після введення аргініну активність СОД вища у 3,0, через 3 доби – у 3,3, а через 7 днів – у 3,8 раза порівняно з відповідними показниками контрольної групи. На відміну від СОД за ГП активність каталази в гомогенатах підшлункової залози щурів, навпаки, знижується через 1 добу ведення аргініну у 1,7, через 3 доби – у 1,9, а через 7 днів – у 2,3 раза порівняно із відповідними показниками тварин контрольної групи. Зниження активності каталази може бути обумовлено інгібуванням ензиму надлишком утворених гідропероксидів. Така спрямованість змін цього ензиму за розвитку запальних процесів узгоджується з даними літератури [6].

За введення БАД активність СОД у гомогенатах підшлункової залози щурів із ГП знижується на 32%, а активність каталази, навпаки, зростає – на 65% порівняно із 6-ю групою тварин. Виявлена нами коригуюча дія БАД «Альфа+омега» на показники окислювального стресу та антиоксидантної рівноваги у ПЗ щурів за ГП може бути обумовлена як прямою так і опосередкованою дією її складових.

Очікуваним було, що виявлені нами порушення в системі прооксидантно-антиоксидантної рівноваги за ГП у підшлунковій залозі призводять також до інших метаболічних змін за цієї патології.

Існують дані, що за розвитку ГП відбувається активація ліполітичних ензимів – фосфоліпази А₂ (ФЛА₂) та ліпази [26]. Не дивлячись на те, що за дії різних чинників, у

тому числі і окислювального стресу, активація ФЛА₂ може призводити до розвитку некрозу в підшлунковій залозі за ГП [27], зміни її активності в процесі розвитку ГП досліджені недостатньо. Нами було виявлено, що в умовах розвитку ГП активність ФЛА₂ у плазмі крові зростає. Як свідчать дані, представлені на рис. 7, вже через добу спостерігається зростання активності ензиму у 13,9 раза порівняно з показниками контрольної групи. Через три доби експерименту активність ФЛА₂ зростає у 16,9 раза, але через сім діб активність ензиму дещо знижується, хоча і у 15,4 раза є вищою показників контрольної групи. Активація ФЛА₂ може призводити до посиленого утворення лізофосфоліпідів та фактора агрегації тромбоцитів (ФАТ), що підвищує агрегацію тромбоцитів та призводить до звуження просвіту судин. Арахідонова кислота, що утворюється внаслідок активації ФЛА₂, метаболізується через ліпооксигеназний та циклооксигеназний шляхи до простаноїдів і лейкотрієнів [28].

Оскільки розвиток ГП супроводжується інтенсифікацією вільнорадикальних процесів у ПЗ та зростанням активності ФЛА₂ в плазмі крові за цих умов важливо було з'ясувати чи відбуваються зміни у жирнокислотному складі ліпідів у ПЗ, адже відомо, що збільшення вмісту неетерифікованих жирних кислот призводить до функціональних порушень у різних клітинах [29].

Аналіз жирнокислотного складу ліпідів ПЗ показав, що основними насиченими ЖК були пальмітинова (16:0), стеаринова (18:0), серед ненасичених – олеїнова (18:1ω-9) мононенасичена (МНЖК); серед поліненасичених (ПНЖК) – арахідонова (20:4ω-6) та лінолева (18:2ω-6). Відносний вміст ліноленової (18:3ω-3), ейкозопентаєнової (ЕПК) (22:5ω-3) та докозогексаєнової (ДГК) (22:6ω-3) кислот є нижчим (табл. 2).

Зміни відносного вмісту різних груп жирних кислот загальних ліпідів у підшлунковій залозі щурів за ГП є найвираженішими через 3 доби від початку експерименту (табл. 3). При цьому збільшується відносний вміст суми насичених жирних кислот та зменшується – ненасичених. Так, через 3 доби після введення аргініну відносний вміст суми НЖК у ПЗ щурів збільшується на 29%, а через 7 діб – на 38% у порівнянні із показниками тварин контрольної групи, в основному за рахунок зростання відносного вмісту C_{14:0} – міристинової та C_{16:0} – пальмітинової кислот на 22%; C_{18:0} – стеаринової кислоти на 39% через 3 доби, а через 7 діб на 33, 28 та 51% відповідно (табл. 2). Одночасно спостерігали зниження сумарного вмісту ПНЖК ω-3 у тканині підшлункової залози через добу на 20%, через 3 – на 33%, а через 7 діб – на 41% переважно за рахунок зниження відносного вмісту C_{18:3}(ω3) – ліноленової; C_{20:5}(ω3) – ейкозапентаєнової; C_{22:5}(ω6) – докозапентаєнової; C_{22:6}(ω3) –

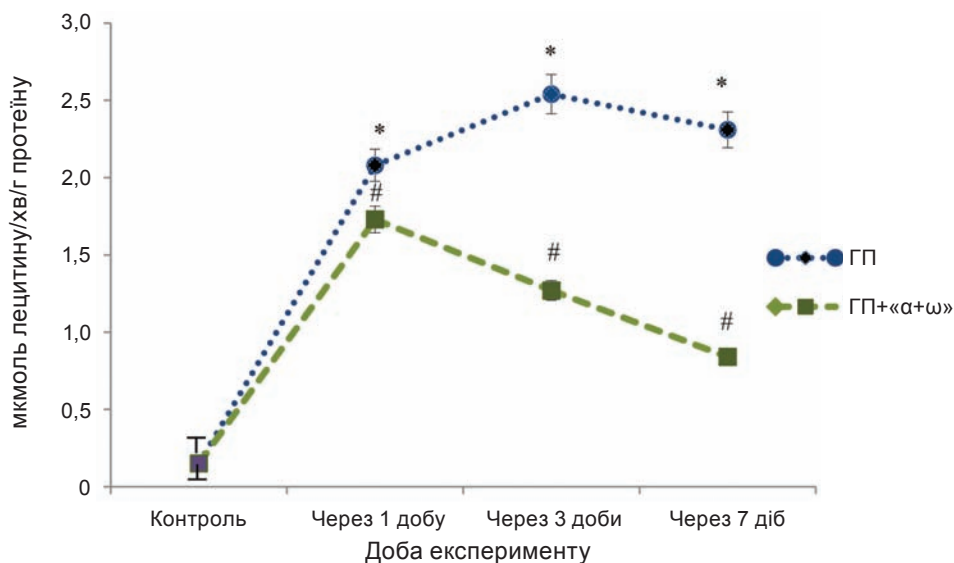


Рис. 7. Активність ФЛА₂ у плазмі крові щурів за гострого панкреатиту та за введення БАД «Альфа+омега», (M ± m, n = 5), * відмінності вірогідні порівняно з контролем, P < 0,05; # відмінності вірогідні порівняно з тваринами з ГП відповідних термінів, P < 0,05

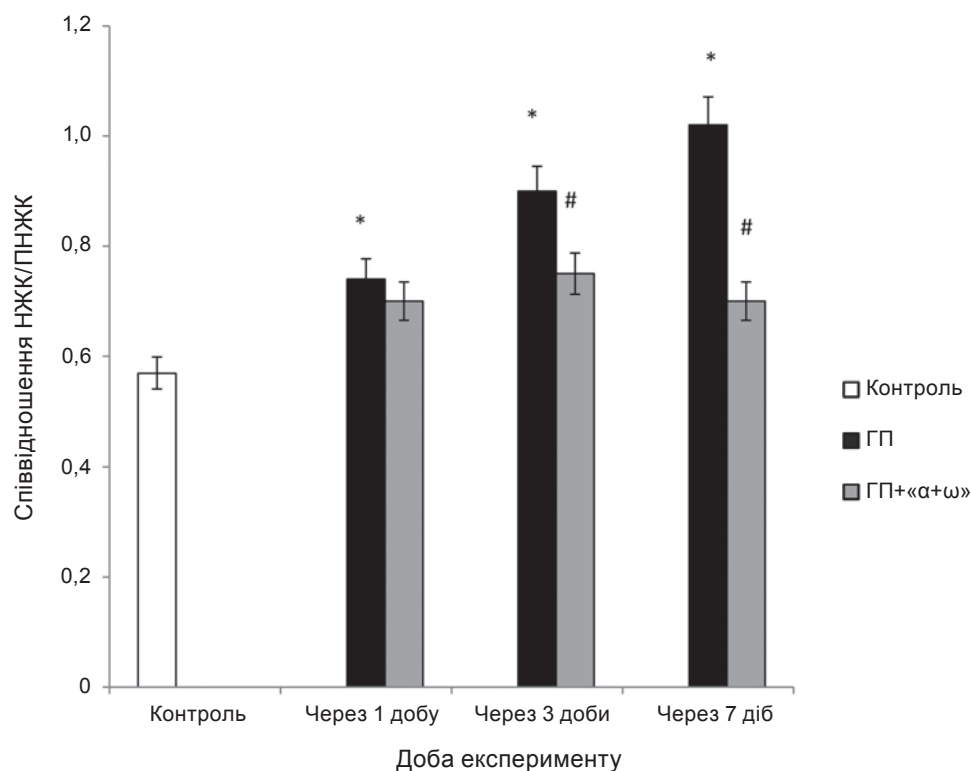


Рис. 8. Співвідношення НЖК/ПНЖК загальних ліпідів підшлункової залози за гострого панкреатиту та за впливу БАД «Альфа+омега», ($M \pm m$, $n = 5$), * відмінності вірогідні порівняно з контролем, $P < 0,05$; # відмінності вірогідні порівняно з показниками в тварин з ГП відповідних термінів, $P < 0,05$

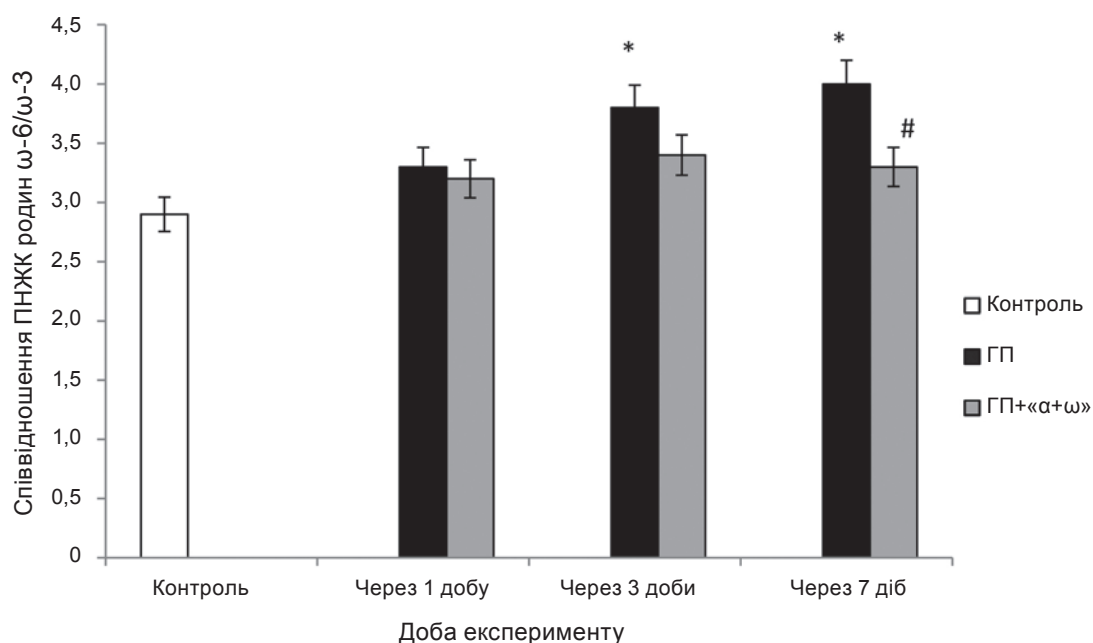


Рис. 9. Співвідношення ПНЖК родин ω-6/ω-3 загальних ліпідів підшлункової залози за гострого панкреатиту та за впливу БАД «Альфа+омега», ($M \pm m$, $n = 5$), * відмінності вірогідні порівняно з контролем, $P < 0,05$; # відмінності вірогідні порівняно з показниками в тварин з ГП відповідних термінів, $P < 0,05$

докозагексаєнової кислот через добу на 15, 19 і 21 та 24%, через 3 доби – на 27, 32, 35 та 41%, а через 7 діб – на 38, 39, 41 та 44% відповідно до показників контрольної групи. Відносний сумарний вміст ПНЖК родини ω -6 також зменшується через 3 доби на 13% , а через 7 діб на 16% внаслідок зниження відносного вмісту $C_{18:2}(\omega-6)$ – лінолевої кислоти на 21 та 25% у відповідні терміни. Відомо, що зниження вмісту лінолевої кислоти, попередника біосинтезу арахідонової кислоти, із послідуєчим циклооксигеназним її метаболізмом супроводжується утворенням прозапальних медіаторів: лейкотрієнів, зокрема LTB_4 , простагландинів E_2 та $F1\alpha$ [30]. Одержані дані свідчать про те, що у ПЗ за ГП відбуваються зміни жирнокислотного складу ліпідів.

Застосування БАД впродовж семи діб на тлі розвитку ГП призводить до зниження на 63% активності FLA_2 , яка бере участь у патогенезі ГП [27], а сумарного вмісту ЖК – на 11%. Гальмування активності FLA_2 , опосередковане ЖК, може бути одним із механізмів регуляції активності цього ензиму за принципом негативного зворотного зв'язку, яке призводитиме до пригнічення ліполізу [31], що ймовірно і відбувається в умовах наших експериментів.

У щурів із ГП (7 діб) введення БАД «Альфа+омега» також нормалізує жирнокислотний склад ліпідів ПЗ, при цьому вміст ПНЖК зростає на 19% переважно за рахунок лінолевої, ейкозапентаєнової, докозапентаєнової та докозагексаєнової кислот на – 33, 31, 35 та 47% відповідно. Відносний вміст НЖК родини ω -6 відновлюється меншою мірою. Сумарний вміст НЖК знижується на 18% за рахунок пальмітинової та стеаринової ЖК. Наявні у БАД «Альфа+омега» ПНЖК родини ω -3, з одного боку, можуть відновлювати їх дефіцит у мембранах клітин ПЗ, а з іншого, бути джерелом синтезу біологічно активних сполук із протизапальною дією на клітинному рівні – ейкозаноїдів, простагландинів, тромбоксанів та низки інших. Більше того, вітаміни А та Е, які входять до складу БАД та в обраних концентраціях виявляють антиоксидантну дію [11, 29], мікроелементи цинк і селен, які входять до складу БАД, а також до складу антиоксидантних ензимів сприяють знешкодженню вільних радикалів, запобігаючи надпродукції АФО. Вітамін А наявний у складі БАД «Альфа+омега» ще і сприяє засвоєнню селену [11].

Внаслідок проведених досліджень встановлено, що у тварин із ГП зростає співвідношення

насичених до ненасичених ЖК, що може бути адаптивною відповіддю організму на окислювальний стрес, який розвивається за ГП (рис. 8). Застосування БАД «Альфа+омега» на тлі ГП знижує це співвідношення за рахунок зростання відносного вмісту есенціальних ПНЖК та призводить до часткової нормалізації співвідношення між ПНЖК родин ω -3 і ω -6 (рис. 9), метаболізм яких тісно пов'язаний між собою, так як ПНЖК ω -3 здатні інгібувати метаболізм ПНЖК ω -6, особливо їх десатурацію [32]. Зміна співвідношення ПНЖК родини ω -6 та ω -3 на користь ПНЖК ω -3 сприятиме їх нормалізуючому впливу на рівень прозапальних цитокінів та на нейтрофільну інфільтрацію панкреатоцитів, що може призводити до пригнічення розвитку некротичних процесів у тканині ПЗ. Ці дані узгоджуються з даними [33], одержаними під час застосування препаратів риб'ячого жиру: спостерігається зростання протизапальних цитокінів та зменшення системної відповіді організму.

Загалом, виявлений нами дефіцит ПНЖК ω -3 за ГП може сприяти розвитку запальних процесів, які індукуються ендогенними чинниками, зокрема ЛПНЩ, які після втрати ПНЖК ω -3 зазнають фагоцитозу моноцитами і макрофагами. Окрім цього, ПНЖК родини ω -3 впливають на рецептори активатора проліферації пероксисом (PPARs), які є ліганд-активованими факторами транскрипції та беруть участь у регуляції багатьох біологічних процесів, у тому числі ліпідного і вуглеводного обмінів [34].

Таким чином, одержані результати свідчать про те, що за експериментального ГП життєздатність лейкоцитів крові не змінюється. Проте через 1 добу спостерігається значне підвищення рівня АФО у гранулоцитах, але цей показник не змінюється в агранулоцитах. Через 3 доби рівень продукування АФО у гранулоцитах знижується, а в агранулоцитах зростає. У підшлунковій залозі щурів відбуваються порушення ліпідного та жирнокислотного складу ліпідів, що виявляється підвищенням сумарного вмісту НЖК, зокрема міристинової, пальмітинової та стеаринової кислот, з одночасним зниженням сумарного вмісту ПНЖК переважно за рахунок есенціальних жирних кислот родини ω -3. Крім того, накопичуються продукти пероксидного окислення ліпідів та змінюється активність антиоксидантних ензимів і підвищується активність FLA_2 . Застосування БАД «Альфа+омега» на тлі ГП не впливає на

Таблиця 2. Сумарний вміст жирних кислот загальних ліпідів у тканині підшлункової залози щурів за гострого панкреатиту та за введення БАД «Альфа+омега», % від загальної кількості жирних кислот ($M \pm m$, $n = 5$)

Жирні кислоти	Група тварин													
	1	2		3		4		5		6		7		
	Контроль	Через 1 добу		Через 3 доби		Через 7 днів		Через 3 доби		Через 7 днів		Через 7 днів		
	ГП	ГП	ГП+«α+ω»	ГП	ГП	ГП+«α+ω»	ГП	ГП	ГП+«α+ω»	ГП	ГП	ГП+«α+ω»	ГП	ГП+«α+ω»
C _{14:0}	0,8 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,8 ± 0,1	1,1 ± 0,1*	1,1 ± 0,1*	1,0 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1,0 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1,2 ± 0,1	0,9 ± 0,1	1,2 ± 0,1	0,9 ± 0,1
C _{16:0}	19,8 ± 1,5	22,0 ± 1,6	21,8 ± 1,7	24,1 ± 1,4*	24,1 ± 1,4*	22,3 ± 1,3	25,4 ± 1,7*	25,4 ± 1,7*	22,3 ± 1,3	25,4 ± 1,7*	25,4 ± 1,7*	22,0 ± 1,5#	25,4 ± 1,7*	22,0 ± 1,5#
C _{17:0}	1,2 ± 0,1	1,4 ± 0,1	1,4 ± 0,1	1,5 ± 0,2*	1,5 ± 0,2*	1,4 ± 0,1#	1,6 ± 0,1*	1,6 ± 0,1*	1,4 ± 0,1#	1,6 ± 0,1*	1,6 ± 0,1*	1,4 ± 0,1	1,6 ± 0,1*	1,4 ± 0,1
C _{18:0}	14,7 ± 1,3	18,2 ± 1,3	17,5 ± 1,2	20,5 ± 1,3*	20,5 ± 1,3*	18,4 ± 1,5#	22,3 ± 1,8*	22,3 ± 1,8*	18,4 ± 1,5#	22,3 ± 1,8*	22,3 ± 1,8*	17,0 ± 1,3#	22,3 ± 1,8*	17,0 ± 1,3#
C _{18:1 ω-9}	15,7 ± 1,5	14,6 ± 1,3	14,9 ± 1,4	13,6 ± 1,0	13,6 ± 1,0	14,8 ± 1,3	12,2 ± 1,1*	12,2 ± 1,1*	14,8 ± 1,3	12,2 ± 1,1*	12,2 ± 1,1*	15,4 ± 1,2#	12,2 ± 1,1*	15,4 ± 1,2#
C _{18:2 ω-6}	19,1 ± 1,5	17,1 ± 1,5	17,9 ± 1,5	15,7 ± 1,3*	15,7 ± 1,3*	17,6 ± 1,5	15,2 ± 1,6*	15,2 ± 1,6*	17,6 ± 1,5	15,2 ± 1,6*	15,2 ± 1,6*	18,0 ± 1,5	15,2 ± 1,6*	18,0 ± 1,5
C _{18:3 ω-3}	3,4 ± 0,2	2,9 ± 0,2*	3,0 ± 0,2	2,5 ± 0,2*	2,5 ± 0,2*	2,9 ± 0,1#	2,1 ± 0,2*	2,1 ± 0,2*	2,9 ± 0,1#	2,1 ± 0,2*	2,1 ± 0,2*	2,8 ± 0,1#	2,1 ± 0,2*	2,8 ± 0,1#
C _{20:4 ω-6}	16,4 ± 1,2	15,9 ± 1,6	15,4 ± 1,4	15,3 ± 1,2	15,3 ± 1,2	14,9 ± 1,0#	14,8 ± 1,1	14,8 ± 1,1	14,9 ± 1,0#	14,8 ± 1,1	14,8 ± 1,1	15,3 ± 1,0	14,8 ± 1,1	15,3 ± 1,0
C _{20:5 ω-3}	2,6 ± 0,1	2,1 ± 0,1*	2,1 ± 0,1	1,8 ± 0,1*	1,8 ± 0,1*	2,0 ± 0,2#	1,6 ± 0,1*	1,6 ± 0,1*	2,0 ± 0,2#	1,6 ± 0,1*	1,6 ± 0,1*	2,1 ± 0,1#	1,6 ± 0,1*	2,1 ± 0,1#
C _{22:5 ω-3}	2,9 ± 0,2	2,3 ± 0,1*	2,4 ± 0,1	1,9 ± 0,1*	1,9 ± 0,1*	2,1 ± 0,1#	1,7 ± 0,1*	1,7 ± 0,1*	2,1 ± 0,1#	1,7 ± 0,1*	1,7 ± 0,1*	2,3 ± 0,1#	1,7 ± 0,1*	2,3 ± 0,1#
C _{22:6 ω-3}	3,4 ± 0,2	2,6 ± 0,1*	2,8 ± 0,1	2,0 ± 0,2*	2,0 ± 0,2*	2,6 ± 0,1#	1,9 ± 0,2*	1,9 ± 0,2*	2,6 ± 0,1#	1,9 ± 0,2*	1,9 ± 0,2*	2,8 ± 0,2#	1,9 ± 0,2*	2,8 ± 0,2#

Примітка: C_{14:0} – міристинова; C_{16:0} – пальмітинова; C_{17:0} – маргарінова; C_{18:0} – стеаринова; C_{18:1 ω-9} – олейнова; C_{18:2 ω-6} – лінолева; C_{18:3 ω-3} – ліноленова; C_{20:4 ω-6} – арахідонова; C_{20:5 ω-3} – ейкозапентаєнова; C_{22:5 ω-3} – докозагексаєнова; C_{22:6 ω-3} – докозагексаєнова кислота; * відмінності вірогідні порівняно з контролем, $P < 0,05$; # відмінності вірогідні порівняно з тваринами з ГП відповідних термінів, $P < 0,05$.

Таблиця 3. Розподіл жирних кислот загальних ліпідів у тканині підшлункової залози щурів за гострого панкреатиту та за впливу БАД « $\alpha+\omega$ », % від загальної кількості жирних кислот ($M \pm m$, $n = 5$)

Сумарний вміст жирних кислот	Група тварин						
	1	2	3	4	5	6	7
	Контроль	Через 1 добу		Через 3 доби		Через 7 діб	
ГП		ГП+« $\alpha+\omega$ »	ГП	ГП+« $\alpha+\omega$ »	ГП	ГП+« $\alpha+\omega$ »	
Σ НЖК	36,5	42,5	41,5	47,2*	43,1 [#]	50,5*	41,3 [#]
Σ ω -3	12,3	9,9*	10,3	8,2*	9,6 [#]	7,3*	10,0 [#]
Σ ω -6	35,5	33,0	33,3	31,0*	32,5	30,0*	33,3 [#]
Σ ω -9	15,7	14,6	14,9	13,6	14,8	12,2	15,4
Σ ПНЖК	63,5	57,5	58,5	52,1*	56,9 [#]	49,5*	58,7 [#]

Примітка: НЖК – насичені жирні кислоти, : ПНЖК – поліненасичені жирні кислоти.

життєздатність лейкоцитів крові, але частково знижує рівень АФО в цих клітинах, сприяє нормалізації жирнокислотного складу ліпідів у ПЗ та рівноваги ПОЛ-АОС, а також змінює відсоткове співвідношення ПНЖК ω -3/ ω -6 в загальних ліпідах.

ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС В ЛЕЙКОЦИТАХ КРОВИ, ПРО/АНТИОКСИДАНТНЫЙ СТАТУС И ЖИРНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ ЛИПИДОВ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ОСТРОМ ПАНКРЕАТИТЕ У КРЫС

И. Б. Привроцкая¹, Т. М. Кучмеровская²

¹ГВНУ «Тернопольский государственный медицинский университет им. И. Я. Горбачевского МЗО Украины»;
²Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины, Киев;
 e-mail: irina.privrotska@yandex.ua

На экспериментальной модели острого панкреатита (ОП) у крыс методом проточной цитометрии выявлено, что жизнеспособность лейкоцитов крови не изменяется по сравнению с такой в контрольной группе животных. Через сутки после индуцирования ОП образование активных форм кислорода в гранулоцитах увеличивается более чем в 5 раз, однако через трое суток ОП их уровень уменьшается.

Обнаружены нарушения проантиоксидантного статуса в поджелудочной железе и специфические изменения в спектре жирных кислот этой ткани. С развитием ОП интенсифицируются процессы липопероксидации и изменяется активность ферментов антиоксидантной системы защиты, что является свидетельством развития воспалительных процессов в поджелудочной железе. В этих условиях происходит увеличение активности фосфолипазы А₂, которое сопровождается значительным изменением жирнокислотного состава общих липидов поджелудочной железы. При этом повышается относительное суммарное содержание насыщенных жирных кислот, в частности миристиновой, пальмитиновой и стеариновой, с одновременным снижением суммарного содержания полиненасыщенных жирных кислот в основном за счет эссенциальных жирных кислот семейства ω -3 (линоленовой, эйкозапентаеновой, докозапентаеновой, докозагексаеновой). Использование препарата содержащего ω -3 полиненасыщенные жирные кислоты способствовало частичной нормализации липидного и жирнокислотного состава, а также прооксидантно-антиоксидантной системы.

Ключевые слова: жирнокислотный состав, пероксидное окисление липидов, антиоксидантная система, острый экспериментальный панкреатит, поджелудочная железа, ω -3 жирные кислоты.

**OXIDATIVE STRESS IN BLOOD
LEUKOCYTES, PRO/ANTIOXIDANT
STATUS AND FATTY ACIDS
COMPOSITION OF PANCREAS
LIPIDS AT EXPERIMENTAL ACUTE
PANCREATITIS IN RATS**

I. B. Pryvrotska¹, T. M. Kuchmerovska²

¹I. Horbachevsky Ternopol State
Medical University, Ukraine;

²Palladin Institute of Biochemistry, National
Academy of Science of Ukraine, Kyiv;
e-mail: irina.privrotska@yandex.ua

In an experimental model of acute pancreatitis (AP) in rats no alteration in leukocyte's viability was found by flow cytometry as compared to control. After 1 day of AP production of reactive oxygen forms in granulocytes was increased more than 5 times, but after 3 days their level was decreased. Alterations of pro/antioxidant status and specific changes in the fatty acid composition in the pancreas were established. With the development of AP, the processes of lipids peroxidation were intensified while antioxidant system was altered, that was evidenced by inflammation in the pancreas. In these conditions, the increase of phospholipase A₂ activity was accompanied by significant changes of fatty acid composition of the total lipids in the pancreas. This increased relative total content of saturated fatty acids, in particular myristic, palmitic and stearic acid increased, while the total content of polyunsaturated essential fatty acids ω-3 (linolenic, eicosapentaenoic, dokozapentayenoic, docosahexaenoic) decreased. The preparation containing ω-3 polyunsaturated fatty acids partially normalized the lipid and fatty acids composition as well as prooxidant-antioxidant system.

Key words: fatty acid composition, lipid peroxidation, antioxidant system, acute experimental pancreatitis, pancreas, ω-3 fatty acids.

1. Яремчук О. З., Посохова К. А. // Укр. біохім. журн. — 2011. — **83**, № 4. — С. 57–66.
2. Макаруч В. А., Ушакова Г. О., Крилова О. О. // Укр. біохім. журн. — 2013. — **85**, № 1. — С. 71–78.
3. Molteni R., Fabbri M., Bender J. R., Pardi R. // *Curr. Opin. Cell Biol.* — 2006. — **18**. — P. 491–498.
4. Войтенко Г. М., Горчакова Н. О., Шевченко Л. Ю. та ін. // Доповіді НАН України. — 2002. — **7**. — С. 174–177.
5. Abu-Hilal M., McPhail M. J., Marchand L., Johnson. C. D. // *J. Pancreas.* — 2006. — **7**, N 2. — P. 185–192.
6. Sandeep Biradar, B. Veeresh // *Ind. J. Exper. Biology.* — 2013. — **51**. — P. 256–261.
7. Lee Y. S. // *Hepatology.* — 2007. — **45**, N 4. — P. 841–845.
8. Когтева Г. С., Безуглов В. В. // *Биохимия.* — 1998. — **63**. — С. 6–15.
9. Гула Н. М., Маргітуч В. М. Жирні кислоти та їх похідні при патологічних станах. — К.: Наук. думка, 2009. — 336 с.
10. Weylandt K. H., Nadony A., Kahlke L. et al. // *Biochim. Biophys. Acta.* — 2008. — **1782**, N 11. — P. 634–641.
11. Бєленічев І. Ф., Левицький Е. Л., Губський Ю. І. та ін. // *Соврем. проблемы токсикологии.* — 2002. — **3**. — С. 24–31.
12. Kubisch C. H., Sans M. D., Arumugam T. et al. // *Am. J. Phy. Gas. Liv. Phy.* — 2006. — **291**, N 2. — P. 238–245.
13. Пат. України № 14794. Біологічно активна харчова добавка “Альфа+Омега” / Покотило О. С. — № 200611181; заявл. 23.10.2006; опубл. 10.06.2007, Офіційний бюлетень “Промислова власність” № 8.
14. Bass A., Parce J., Dechatelet L., Szejz P., Seeds M., Thomas M. // *J. Immunol.* — 1983. — **130**. — P. 1910–1917.
15. Чевари С., Чаба І., Секей Й. // *Лаб. дело.* — 1985. — **1**. — С. 678–681.
16. Королюк М. А., Иванова Л. И., Майорова И. Г. и др. // *Лаб. дело.* — 1988. — **1**. — С. 16–19.
17. Стальная И. Д. / *Современные методы в биохимии.* — М.: Медицина, 1977. — 391 с.
18. Андреева Л. И., Кожемякин Л. А., Кушкун А. А. // *Лаб. дело.* — 1988. — № 11. — С. 41–43.
19. Folch J, Lees M., Sloane-Stanley G. // *J. Biol. Chem.* — 1957. — **226**. — P. 497–509.
20. Cert A, Moreda W., Pérez-Camino M. C. // *Grasas y Aceites.* — 2000. — **51**, N 6. — P. 447–456.
21. Тужилин С. А., Салуэнья А. И. // *Лаб. дело.* — 1975. — № 6. — С. 334–335.
22. Камышников В. С. *Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике.* — М.: МЕДпресс-информ. — 2004. — 920 с.
23. Hardman J., Shields C., Schofield D. et al. // *Pancreatology.* — 2005. — **5**. — P. 380–386.
24. Darbaz Awla, Aree Abdulla, Su Zhang et al. // *Br. J. Pharmacol.* — 2011. — **163**. — P. 413–423.
25. Гузик М. М., Дякун К. О., Яницька Л. В., Кучмеровська Т. М. // *Укр. біохім. журн.* — 2013. — **85**, № 1 — С. 61–70.
26. Ruthenbürger M., Mayerle J., Brandt-Nedelev B. et al. // *Pancreas.* — 2006. — **33**, N 4. — P. 493.

27. *Jaroscakova I., Brandt-Nedelev B., Wartmann T. et al.* // HPB (Oxford). – 2005. – 7, N 1. – P. 58–68.
28. *Takeo M. M., Sonoshita M.* // Biochim. Biophys. Acta. – 2002. – 1585, N 2–3. – P. 72–76.
29. *Сілонов С. Б., Донченко Г. В., Морозова Р. П.* // Укр. біохім. журн. – 2008. – 80, № 1. – С. 26–32.
30. *Kilian M., Gregor J. I., Heukamp I. et al.* // Pancreas. – 2009 – 38, N 4. – P. – 436–441.
31. *Panek J., Sztefko K., Drozd W.* // Med. Sci. Monit. – 2001. – 7, N 5. – P. 894–898.
32. *Simopoulos A. P.* // Exp. Biol. Med. – 2008. – 233, N 6. – P. 674–688.
33. *Foitzik T., Eibl G., Schneider P. et al.* // JPEN J. Parenter Enteral Nutr. – 2002. – 26, N 6. – P. 351–356.
34. *Шуш А. М., Каплінський С. П., Нагібін В. С. та ін.* // Патологія. – 2011. – 8, № 3. – P. 74–77.

Отримано 07.06.2013