

КЛИНИКО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ.

УДК 615.31.547.295/.015.2:615.356/.07

© Коллектив авторов

ДИНАМИКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПЕРОКСИДНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ И СОСТОЯНИЯ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ СЫВОРОТКИ КРОВИ ПРИ ОСТРОМ ДЕСТРУКТИВНОМ ПАНКРЕАТИТЕ

О.Б. ЛЮБИЦКИЙ, Б.В. ДАВЫДОВ¹, И.В. ЕЛЬШАНСКИЙ¹, А.В. ГРИШИН¹,
Ю.О. ТЕСЕЛКИН, И.В. БАБЕНКОВА, Г.И. КЛЕБАНОВ, П.А. ИВАНОВ,
П.П. ГОЛИКОВ¹, Ю.А. ВЛАДИМИРОВ.

Кафедра биофизики Российского государственного медицинского университета,
117869, Москва, ул. Островитянова, д. 1;

¹НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского, 129010, Москва,
Б.Сухаревская пл., д. 3.

Исследована динамика показателей пероксидного окисления липидов и состояния антиоксидантной системы сыворотки крови при остром деструктивном панкреатите. Обнаружено повышенное содержание в сыворотке крови диеновых конъюгатов и продуктов липидной пероксидации, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой. Показано, что уровень антиоксидантной активности сыворотки крови коррелировал с содержанием в ней мочевой кислоты ($r=+0.79$, $p<0.001$).

Ключевые слова: пероксидное окисление липидов, антиоксиданты сыворотки крови, антиоксидантная активность, острый деструктивный панкреатит, хемиллюминесценция.

ВВЕДЕНИЕ. Возникновение и развитие многих заболеваний организма человека сопровождается активацией процессов свободнорадикального окисления (СРО), в частности, пероксидного окисления липидов (ПОЛ) клеточных мембран и липопротеинов сыворотки крови [1]. Стационарный уровень процесса ПОЛ является суперпозицией по крайней мере двух факторов: изменений в окисленности липидов (за счет усиления образования свободных радикалов-инициаторов и каталитически активных ионов двухвалентного железа [1]) и активности антиоксидантной системы (АОС) защиты, состоящей из большого количества внутри- и внеклеточных антиоксидантов (АО) [2]. Среди внутриклеточных АО прежде всего следует назвать такие антиоксидантные ферменты, как супероксиддисмутаза, каталаза и глутатионпероксидаза. Существуют АО, которые входят в состав биологических мембран и липопротеинов, например, α -токоферол (ТФ). К внеклеточным относятся АО, входящие в состав плазмы крови: аскорбиновая кислота, мочевая кислота (МК), церулоплазмин (ЦП), трансферрин, белки, содержащие SH-группы и другие [2]. Для оценки состояния АОС в клинической и лабораторной практике широко используют определение антиоксидантной активности (АОА) сыворотки (плазмы) крови, которая отражает ее способность тормозить СРО какого-либо субстрата. Однако вклад каждого АО в АОА плазмы может быть различным в зависимости от применяемой модели окисления, то есть от того, какие радикалы-инициаторы

генерируются в модельной системе и какие молекулы выступают в качестве субстрата окисления [3].

В наших предыдущих работах был предложен способ оценки АОА плазмы крови, основанный на СРО л-аминола в присутствии гемоглобина и пероксида водорода (система гемоглобин-пероксид водорода-л-аминола) [4, 5]. Данный способ позволяет определять активность низкомолекулярных АО сыворотки крови и обладает рядом преимуществ. Одно из них заключается в том, что образующиеся в этой системе радикалы-инициаторы, в качестве которых рассматривают феррилрадикалы гемоглобина и гидроксильные радикалы, участвуют в иницировании СРО *in vivo* [6].

Одним из заболеваний, протекающих с выраженной активацией ПОЛ является острый панкреатит [7, 8]. Острое воспаление поджелудочной железы сопровождается выбросом в кровоток ряда панкреатических ферментов, что приводит к протеолизу белков и окислению липидов клеточных мембран. Окисление липидов клеточных мембран приводит к повышению их проницаемости и даже разрыву с выходом содержимого клетки [9]. Однако изменения со стороны АОС сыворотки крови в динамике этого заболевания изучены недостаточно. Применение подхода, основанного на определении АОА сыворотки крови с помощью системы гемоглобин-пероксид водорода-л-аминола и сравнение полученных результатов с изменением концентрации основных сывороточных антиоксидантов и окисленности липидов сыворотки крови может дать объективную информацию о свободнорадикальном статусе при остром панкреатите.

Таким образом, целью настоящей работы явилось изучение динамики показателей ПОЛ и состояния АОС при остром деструктивном панкреатите.

МЕТОДИКА. Обследовано 18 больных (10 мужчин и 8 женщин в возрасте от 32 до 72 лет) острым деструктивным панкреатитом на 1, 3, 7, 14 и 21 сутки от начала заболевания. В исследование были включены случаи тяжелого распространенного деструктивного панкреатита с выраженными явлениями панкреатогенной токсемии в 1-й фазе заболевания и с обширными зонами панкреатогенной деструкции во второй фазе заболевания. В фазе панкреатогенной токсемии у 15 из 18 больных наблюдались такие осложнения, как панкреатогенный интоксикационный делирий, острая сердечно-сосудистая, острая дыхательная, острая почечная недостаточность в различных комбинациях. Осложнения в фазе деструктивных изменений были у 16 больных из 18, в том числе асептически протекавшие - у 14, гнойно-деструктивные - у 2 больных. Кроме того, обследовано 23 здоровых донора (контрольная группа). Венозную кровь забирали из локтевой вены утром натощак. Для отделения сыворотки кровь инкубировали 15 мин при температуре 37°С и центрифугировали в течение 15 мин при 900g. Полученную сыворотку хранили при +4°С в течение 6-8 ч, либо в замороженном состоянии при -20°С не более суток.

Состояние процесса ПОЛ оценивали, измеряя в сыворотке крови содержания первичных (диеновые конъюгаты, ДК) и вторичных (продукты, реагирующие с тиобарбитуровой кислотой, ТБКАП) продуктов ПОЛ. Содержание ДК определяли спектрофотометрически и представляли в виде разности оптических плотностей между опытной и контрольной пробами при 233 нм, нормированной на содержание липидов в 1 мл гексанового экстракта [10]. Определение ТБКАП проводили спектрофлуориметрическим методом, используя в качестве стандарта 1,1,3,3-тетраметоксипропан ("Sigma", США) [11].

Состояние АОС оценивали путем определения АОА сыворотки крови и измерения в ней содержания ТФ, МК и ЦП. Уровень ТФ определяли спектрофлуориметрически и представляли в виде мкг на мл сывороточных липидов [12]. Определение содержания ЦП проводили по методу Ravin Н.А. [13] с использованием в качестве субстрата парафенилендиамина. Для определения концентрации МК использовали диагностический набор реактивов "Reanal" (Венгрия).

АОА сыворотки крови оценивали с помощью измерения хемилюминесценции (ХЛ) системы гемоглобин-пероксид водорода-люминол [5]. Реакционная среда общим объемом 5 мл содержала 0,21 мкМ гемоглобина ("Sigma", США) и 10 мкМ люминола ("Serva", Германия) в фосфатном буфере (50 мМ KH_2PO_4 , 100 мкМ EDTA, pH 7,4). Инициирование СРО люминола осуществляли введением 27 мкМ пероксида водорода. Все эксперименты проводились при 37° С и постоянном перемешивании на хемилюминометре ХЛМ-3 («Бикап», Москва). В качестве измеряемого параметра использовали латентный период, который определяли как время от момента инициирования СРО люминола до начала развития свечения. АОА сыворотки определяли по увеличению латентного периода модельной системы при добавлении к ней 10 мкл сыворотки крови и выражали через концентрацию (мМ) эквивалентного раствора аскорбата, который был выбран в качестве АО сравнения.

Полученные данные представлены в виде значений средней величины \pm стандартная ошибка среднего и обрабатывались методом вариационной статистики с использованием t-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Динамика содержания продуктов ПОЛ у больных острым деструктивным панкреатитом и группы здоровых доноров представлена в табл. Видно, что в первые сутки заболевания уровень ДК и ТБКАП был соответственно в 3,1 и 2,5 раза выше, чем в контрольной группе ($p < 0,001$). Высокие значения уровня продуктов ПОЛ сохранялись до 21 суток наблюдения. Минимальные значения регистрировались на 14 сутки заболевания, однако они в 1,8 раза превышали значения в контрольной группе ($p < 0,001$).

Таблица. Динамика содержания продуктов ПОЛ и ТФ в сыворотке крови больных острым деструктивным панкреатитом.

Сутки	Контроль- ная группа	Острый деструктивный панкреатит				
		1	3	7	14	21
ДК, Д ₂₃₃ /мг липидов	0,16 \pm 0,009	0,49 \pm 0,09***	0,38 \pm 0,07***	0,45 \pm 0,09***	0,28 \pm 0,04***	0,31 \pm 0,09*
ТБКАП, нмоль/мл	1,24 \pm 0,07	3,07 \pm 0,38***	2,31 \pm 0,30***	2,70 \pm 0,40***	2,20 \pm 0,29***	2,58 \pm 0,35***
ТФ, мкг/мг липидов	1,22 \pm 0,06	1,65 \pm 0,09**	1,86 \pm 0,12***	2,13 \pm 0,29***	1,68 \pm 0,17**	1,81 \pm 0,20***

Примечание: *, **, *** - $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ соответственно по сравнению со значениями данного показателя в контрольной группе.

При исследовании динамики показателей АОС сыворотки крови больных острым деструктивным панкреатитом выявлено, что в первые сутки заболевания уровень основного липидного АО ТФ (табл.) был в 1,4 раза выше, чем в контрольной группе ($p < 0,01$). Повышенное содержание ТФ в сыворотке крови сохранялось в последующие сроки наблюдения. Максимальное значение уровня ТФ было зарегистрировано на 7 сутки заболевания.

Для оценки состояния водорастворимой части АОС была измерена АОА сыворотки крови с помощью системы гемоглобин-пероксид водорода-люминол, концентрация МК и медь-содержащего белка сыворотки крови - ЦП. На рис. 1 (а) показано изменение АОА сыворотки крови у больных острым панкреатитом и контрольной группы. Видно, что в первые сутки уровень АОА был в 1,8 раза выше, чем в контрольной группе ($p < 0,001$). На 3-7 сутки у больных отмечалось снижение АОА сыворотки крови до нормальных значений. Однако на 14 сутки наблюдалось повторное повышение АОА (в 1,6 раза, $p < 0,001$) с последующим ее понижением до нормальных значений к 21 суткам лечения. Динамика содержания МК в сыворотке крови представлена на рис. 1 (б). Видно, что она в целом повторяет динамику АОА

сыворотки крови у больных острым панкреатитом. Отличие состоит в том, что содержание МК в сыворотке крови больных острым панкреатитом на протяжении всего периода наблюдения достоверно превышало ее содержание у здоровых доноров. На рис. 1 (в) показана динамика концентрации ЦП. В первые сутки острого панкреатита уровень ЦП был в 1,3 раза ниже, чем в контрольной группе ($p < 0,5$). На 3-7 сутки концентрация ЦП увеличивалась до уровня нормальных значений. К 14 суткам содержание ЦП повышалось в 1,3 раза по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$) и далее снижалось до нормальных значений к 21 суткам заболевания.

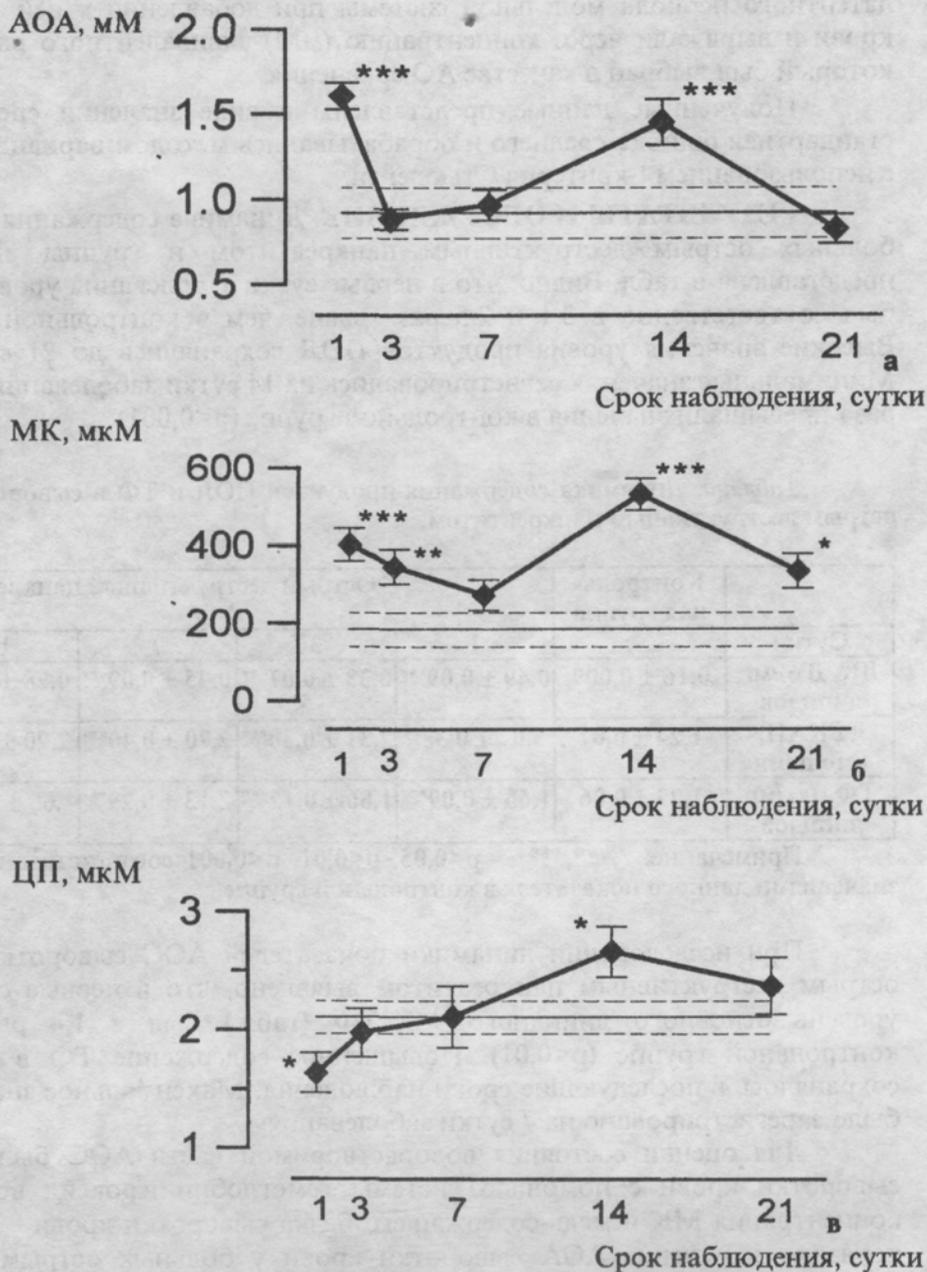


Рисунок 1.

Динамика АОА сыворотки крови (а) и содержания в ней МК (б) и ЦП (в) у больных острым деструктивным панкреатитом. Средние значения соответствующих показателей в контрольной группе показаны тонкой линией, границы их изменений пунктирными линиями. *, **, *** - $p < 0,05$, $p < 0,01$ и $p < 0,001$ соответственно по сравнению со значением данного показателя в контрольной группе.

Как видно из полученных результатов, острое воспаление поджелудочной железы сопровождается усилением реакций СРО липидов, что проявляется в увеличении в сыворотке крови больных как первичных, так и вторичных продуктов ПОЛ в течение всего периода наблюдения. Активация процесса ПОЛ может повлечь за собой усиление разрушения АО в реакциях со свободными радикалами. Нельзя исключить, что это имеет место для ЦП, пониженная активность которого в сыворотке крови больных острым панкреатитом зарегистрирована в первые сутки заболевания. В отличие от ЦП содержание ТФ, напротив, было повышено в течение всего периода пребывания больных в стационаре, что, вероятно, связано с мобилизацией эндогенного ТФ в ответ на развитие тканевого повреждения и стресса [14]. Так как АОА сыворотки крови является интегральным показателем, то изменение ее уровня у больных острым панкреатитом должно определяться колебаниями уровня отдельных АО. В качестве одного из таких АО следует рассматривать МК, поскольку коэффициент линейной корреляции между уровнем АОА сыворотки крови больных острым панкреатитом и содержанием в ней МК, рассчитанный с учетом всего периода наблюдения, составил +0,79 ($p < 0,001$). Что касается причины повышения содержания МК в сыворотке крови больных острым деструктивным панкреатитом на 1 и 14 сутки развития заболевания, то, вероятно, она связана с активацией в печени катаболизма пуриновых оснований, входящих в состав РНК и ДНК поврежденных клеток поджелудочной железы. В пользу этого предположения свидетельствует тот факт, что усиление синдрома цитолиза при остром панкреатите также наблюдается на 1 и 14 сутки [9].

Таким образом, показано, что развитие острого деструктивного панкреатита сопровождается активацией процесса ПОЛ. Обнаружено, что увеличение активности АОС сыворотки крови больных острым деструктивным панкреатитом в значительной степени определяется уровнем МК. Полученные результаты свидетельствуют о необходимости проведения антиоксидантной терапии у больных острым деструктивным панкреатитом и использовании показателей ПОЛ и АОС в оценке ее эффективности.

ЛИТЕРАТУРА.

1. *Vladimirov Yu.A.* (1986) In: *Free Radical Aging, and Degenerative Diseases*. N-Y-London, Alan Liss Inc. pp. 141-195.
2. *Halliwell B., Gutteridge J.M.C.* (1990) *Arch. Biochem. Biophys.*, **280**. 1-8.
3. *Halliwell B., Gutteridge J.M.C.* (1995) *Free Radic. Biol. Med.* **18**. 125-126.
4. *Теселкин Ю.О., Бабенкова И.В., Любицкий О.Б. и др.* (1997) *Вопр. мед. химии*, **43**, 87-93.
5. *Теселкин Ю.О., Бабенкова И.В., Любицкий О.Б. и др.* (1998) *Вопр. мед. химии*, **44**, 70-76.
6. *Purpo A., Halliwell B.* (1988) *Biochem. J.* **249**. 185-190.
7. *Guyan P.M., Uden S., Braganza J.M.* (1990) *Free Radic. Biol. Med.* **8**. 347-354.
8. *Лобода Д.И., Бобров О.Е., Земскова М.В., Лигоненко А.Н.* (1991) *Врач. дело.* № 11. 59-60.
9. *Арутюнян В.М., Григорян Р.А.* (1995) *Диагностика и патогенетические основы лечения панкреатита*. Ереван, "Айастан".
10. *Recknagel R., Glende E.A.* (1984) *Method. Enzymol.* **105**. 331-337.
11. *Гаврилов В.Б., Гаврилова А.Р., Мажуль Л.М.* (1987) *Вопр. мед. химии*. **33**, № 1. 118-122.
12. *Duggan D.E.* (1959) *Arch. Biochem. Biophys.* **84**. 116-122.

13. *Ravin H.A.* (1961) *J. Lab. Clin. Med.* **58**. 161-168.
14. *Голиков П.П., Давыдов Б.В., Матвеев С.Б.* (1987) *Вопр. мед. химии.* **33**, № 1. 47-50.

THE CHANGES OF LIPID PEROXIDATION PARAMETERS AND STATE OF SERUM BLOOD ANTIOXIDANT SYSTEM IN ACUTE DESTRUCTIVE PANCREATITIS

O.B. LYUBITSKY, B.V. DAVIDOV¹, I.V. ELSHANSKY¹, A.V. GRISHIN¹, YU.O. TESELKIN, I.V. BABENKOVA, G.I. KLEBANOV, P.A. IVANOV¹, P.P. GOLIKOV¹, YU.A. VLADIMIROV

Department of Biophysics, Russian State Medical University, Ostrovityanova ul. 1, Moscow, 117869, Russia

¹Biochemical Laboratory of Urgent Methods of Investigations N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine, Sucharevskaya pl., 3B, Moscow, 129010, Russia

The changes of lipid peroxidation parameters and state of blood serum antioxidant system in acute destructive pancreatitis were investigated. The increased content of blood serum diene conjugates and thiobarbituric acid reactive substances was found. It was shown that the blood serum antioxidant activity had correlated with concentration of urate ($r=+0.79$, $p<0.001$).

Key words: lipid peroxidation, blood plasma antioxidants, antioxidant activity, acute destructive pancreatitis, chemiluminescence.