

**КАБІНЕТ МІНІСТРІВ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

ПРИВРОЦЬКА ІРИНА БОГДАНІВНА

УДК 612.015.11–02:616.37–002)–085.32

**ОСОБЛИВОСТІ ОКСИДАТИВНОГО МЕТАБОЛІЗМУ ЗА
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ГОСТРОГО ПАНКРЕАТИТУ
ТА ШЛЯХИ КОРЕКЦІЇ**

03.00.04. – біохімія

Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2015

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України»

Науковий керівник доктор біологічних наук,
старший науковий співробітник
Кучмеровська Тамара Муратівна,
Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України,
провідний науковий співробітник
відділу біохімії вітамінів і коензимів

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор
Хижняк Світлана Володимирівна,
Національний університет біоресурсів і
природокористування України,
професор кафедри біохімії тварин, якості і безпеки
сільськогосподарської продукції імені академіка
М. Ф. Гулого

доктор біологічних наук,
старший науковий співробітник
Савчук Олексій Миколайович,
Київський національний університет
імені Тараса Шевченка,
Навчально-науковий центр «Інститут біології»,
професор кафедри біохімії

Захист відбудеться « _____ » 2015 року о _____ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.004.08 у Національному університеті біоресурсів і природокористування України за адресою: 03041, м. Київ – 41, вул. Генерала Родімцева, 19, навчальний корпус № 1, кімната 97.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Національного університету біоресурсів і природокористування України за адресою: 03041, м. Київ–41, вул. Героїв Оборони, 13, навчальний корпус 4, кімната 41а.

Автореферат розісланий « _____ » _____ 2015 р.

Учений секретар
спеціалізованої вченої ради

Є. А. Деркач

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. В останні роки в багатьох країнах, у тому числі Україні, спостерігається збільшення кількості хворих на гострий та хронічний панкреатит (Федорович А. О., 2006). Серед захворювань шлунково-кишкового тракту ця патологія становить 5,1–9 % (Христич Т. М. та ін., 2007; Складаров О. Я. та ін., 2010; Aghdassi A. A. et al., 2011) та часто супроводжується ускладненнями (Філіп С. С. та ін., 2009; Яремчук О. З., Посохова К. А., 2011), що є серйозною медико-соціальною проблемою. За гострого панкреатиту порушується метаболізм білків (Sandstrom P., Trullason L., 2008), вуглеводів і ліпідів, що супроводжується ускладненнями (Niederer C., Hippenstiel J., 2006; Шевчук А. Г., Боцюрко В. І., 2011), які досить часто призводять до розвитку його хронічної форми (Макарчук В. А. та ін., 2013).

Вважають, що розвиток гострого панкреатиту може бути як результатом інтенсифікації окисного стресу, що супроводжується підвищенням проникності ацинусів (Войтенко Г. М. та ін., 2002; Abu-Hilal M. et al., 2006), так і запальних процесів у клітинах підшлункової залози (Urunuela A. et al., 2002; Park B. K. et al., 2003; Миронов А. С., 2004; Барабой В. А., 2006). Слід зазначити, що порушення структурно-функціональної цілісності мембранних структур може супроводжуватись окисненням поліненасичених жирних кислот (Lee S. et al., 2007; Biradar S., Veeresh B., 2013). Крім того, зміни вмісту та співвідношення жирних кислот у мембранах можуть порушувати регуляцію біохімічних процесів у клітинах (Гула Н. М., 2009). У цьому контексті за гострого панкреатиту важливо оцінити і внесок прооксидантних процесів, а також відповідь системи антиоксидантного захисту, оскільки за багатьох захворювань шлунково-кишкового тракту спостерігається порушення про-антиоксидантного стану (Packer L., Cadenas E., 2007; Колісник М. І. та ін., 2009; Костюшова Н. В., 2010; Дворщенко К. О. та ін., 2013). Більше того, при деструктивних формах гострого панкреатиту розвиваються зміни в інших органах, зокрема у печінці (Browne G. W., Pitchumoni C. S., 2006; Zhang Xi-Ping et al., 2007; Яремчук О. З., Посохова К. А., 2011), причиною виникнення яких може бути порушення балансу між тромбоксаном A_2 і простагландіном та продукцією фактора активації тромбоцитів, цитокінів, ендотоксинів та активних форм кисню. Незважаючи на значну кількість досліджень щодо функціональних та морфологічних порушень у печінці за гострого панкреатиту (Герасименко А. В., 2006; Шимунов Г. Я., 2006; Переяслов А. А., 2007; Салий І. С., 2008; Зіненко Д. Ю., Береговенко І. М., 2008; Посохова К. А., Яремчук О. З., 2009), конкретні механізми, які призводять до їх виникнення, та шляхи корекції потребують більш глибокого розкриття.

На даний час для лікування панкреатитів використовуються препарати, які містять поліненасичені жирні кислоти ω -3 та інші сполуки, які володіють вираженою протизапальною дією (Weylandt K. H. et al., 2008). Це і послужило підґрунтям для застосування за гострого панкреатиту біологічно активної добавки «Альфа+омега» (« α + ω »), що є джерелом поліненасичених жирних кислот ω -3, вітамінів А та Е, мікроелементів Цинку і Селену, для корекції функціональних порушень за даної патології. Саме ці жиророзчинні вітаміни є компонентами ферментативної ланки антиоксидантного захисту організму та мають специфічну

спорідненість до мембранних ліпідів (Беленічев І. Ф. та ін., 2002), а мікроелементи Цинк і Селен входять до складу низки антиоксидантів, ензимів або активують їх.

У зв'язку з цим, дослідження особливостей оксидативного метаболізму в клітинах підшлункової залози та печінки щурів і можливих змін в обміні протеїнів за гострого панкреатиту є актуальними, оскільки вони не тільки розширяють уявлення щодо конкретних біохімічних механізмів, які лежать в основі розвитку та перебігу цього захворювання, але і сприятимуть пошуку нових ефективних препаратів для його ефективного лікування.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота є фрагментом комплексних науково-дослідних робіт кафедр фармацевтичної хімії, медичної біохімії та клініко-лабораторної діагностики ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України» «Дослідження механізмів впливу деяких токсикантів на білково-ліпідний обмін та антиоксидантно-імунний статус у експериментальних тварин і корекція викликаних порушень» (номер державної реєстрації 0109U002898, 2009–2011 рр.), «Біохімічні механізми токсичності наночастинок різної природи та інших антропогенних і біогенних токсикантів в біологічних системах» (номер державної реєстрації 112U000542, 2012–2015 рр.) і кафедр медицини катастроф, патологічної фізіології, гістології та ембріології «Медичні та інформаційні закономірності перебігу патологічних процесів при різних функціональних умовах та їх корекції» (номер державної реєстрації 0110U001937, 2010–2012 рр.).

Мета і задачі дослідження. Метою роботи було дослідження вільнорадикального окиснення та NAD- і NADP-залежних окисно-відновних процесів у підшлунковій залозі та печінці щурів у динаміці розвитку гострого панкреатиту, їх корекція біологічно активною добавкою «Альфа+омега».

Для досягнення мети досліджень були поставлені такі задачі:

- змоделювати експериментальний гострий панкреатит у щурів;
- дослідити рівень продукції активних форм кисню та життєздатність лейкоцитів у щурів за гострого експериментального панкреатиту та при застосуванні біодобавки «Альфа+омега»;
- дослідити процеси пероксидного окиснення ліпідів у крові, підшлунковій залозі та печінці щурів у динаміці гострого панкреатиту та при застосуванні біодобавки;
- дослідити активність системи антиоксидантного захисту в крові, підшлунковій залозі та печінці щурів у динаміці гострого панкреатиту та при застосуванні біодобавки;
- оцінити стан NAD- та NADP-залежних процесів у тканинах підшлункової залози, печінки та мозку щурів за умов досліду;
- дослідити рівень амінокислот у крові та печінці в динаміці розвитку гострого панкреатиту та за використання біологічно активної добавки «Альфа+омега»;
- охарактеризувати якісні та кількісні зміни ліпідного спектра, жирнокислотного складу загальних ліпідів крові, підшлункової залози та печінки щурів у динаміці розвитку гострого панкреатиту та при застосуванні біодобавки «Альфа+омега».

Об'єкт дослідження – про-антиоксидантний стан та енергетичні процеси в тканинах щурів за гострого експериментального панкреатиту, їх корекція біологічно активною добавкою «Альфа+омега».

Предмет дослідження – біохімічні показники крові, підшлункової залози та печінки; ліпідний і жирнокислотний профіль; активність процесів ліпопероксидації та антиоксидантної системи; амінокислотний склад сироватки крові та печінки за гострого панкреатиту та при застосуванні біодобавки «Альфа+омега».

Методи дослідження – метод протокової цитометрії, спектрофотометричний, колориметричний, хроматографічний та метод математичної статистики.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше проведено комплексне біохімічне дослідження щодо з'ясування функціональної ролі про-антиоксидантної системи у розвитку гострого панкреатиту. Показано активацію процесів пероксидного окиснення ліпідів (зростання вмісту дієнових кон'югатів і ТБК-активних продуктів), зміни активності супероксиддисмутази, каталази та вмісту відновленого глутатіону не лише в підшлунковій залозі, але і в печінці, що свідчить про посилення окисних процесів та відповідь на них антиоксидантної системи як результат гетерогенної природи розвитку цієї патології. Вперше встановлено надмірне продукування активних форм кисню лейкоцитами за гострого панкреатиту без змін їхньої життєздатності, що свідчить про інтенсифікацію окисного стресу та розвиток запальних процесів. Вперше виявлено зниження вмісту NAD в підшлунковій залозі, печінці та мозку, а також співвідношення вільних NAD(P)/NAD(P)H пар, що вказує на порушення метаболічних шляхів до яких вони залучені.

Виявлено зміни концентрації амінокислот у сироватці крові, зокрема зростає рівень фенілаланіну, метіоніну, валіну, аланіну, проліну, аспарагінової та глутамінової кислот за гострого панкреатиту, що може свідчити як про порушення їх засвоєння за цієї патології, так і про розвиток структурно-функціональних модифікацій молекул протеїнів.

Показано, що за гострого панкреатиту на тлі інтенсифікації окисного стресу спостерігається зростання вмісту загальних ліпідів, триацилгліцеролів, холестеролу в плазмі крові, підшлунковій залозі та печінці щурів. Встановлений перерозподіл насичених та поліненасичених жирних кислот у бік зростання насиченості, що зумовлений підвищенням умісту стеаринової кислоти, а для поліненасичених жирних кислот (особливо родини ω -3) – зниженням умісту ліноленової, ейкозапентаєнової та декозагексаєнової кислот.

Застосування біодобавки «Альфа+омега» за гострого панкреатиту частково відновлює енергетичні процеси в досліджуваних тканинах щурів, особливо в підшлунковій залозі, та позитивно впливає на вміст амінокислот у сироватці крові й печінці. Крім того, встановлено коригуючу дію біодобавки на показники про-антиоксидантної рівноваги, відносний уміст жирних кислот загальних ліпідів плазми крові, підшлункової залози та печінки щурів.

Практичне значення одержаних результатів. Одержані результати мають не тільки фундаментальне значення, поглиблюючи існуючі уявлення щодо шляхів, які лежать в основі розвитку гострого панкреатиту, але й сприятимуть вдосконаленню методів корекції функціональних порушень у підшлунковій залозі та печінці, що

виникають за гострого ураження підшлункової залози. Завдяки антиоксидантній та мембранотропній дії складових біодобавки «Альфа+омега», її можна рекомендувати для використання в якості протизапального та антиоксидантного засобу, який сприятиме відновленню енергетичних процесів та корекції ліпідного і жирнокислотного вмісту в досліджуваних тканинах за умов ураження підшлункової залози, в тому числі за гострого панкреатиту.

На основі одержаних результатів отримано патент на корисну модель «Спосіб корекції ліпідного обміну при гострому панкреатиті» (Пат. України, № 70193. Бюл. № 10, 2012).

Результати досліджень використовуються в навчальному процесі кафедр медичної біохімії, фармакології з клінічною фармакологією ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України», загальної біології Тернопільського національного педагогічного університету імені В. Гнатюка, медичної хімії Вінницького національного медичного університету імені М. І. Пирогова, біологічної та медичної біохімії ДВНЗ «Івано-Франківський державний медичний університет».

Особистий внесок здобувача. Автором самостійно здійснено пошук та аналіз наукової літератури з досліджуваної проблеми, проведено експерименти, опрацьовано та теоретично обґрунтовано результати дослідження та проведено їх статистичну обробку. Планування експериментів та розроблення методичних підходів, обговорення результатів та формулювання висновків виконано разом із науковим керівником.

Апробація результатів дисертації. Основні результати досліджень, що включені в дисертаційну роботу, були представлені та обговорені на Всеукраїнській науково-практичній конференції «Досягнення і перспективи експериментальної і клінічної біохімії» (м. Тернопіль, 2009), X Українському біохімічному з'їзді (м. Одеса, 2010), Всеукраїнській науково-практичній конференції «Біохімічні основи патогенезу ураження внутрішніх органів різної етіології та способи їх фармакологічної корекції» (м. Тернопіль, 2011), II Науково-практичній конференції з міжнародною участю «Сучасні досягнення фармацевтичної технології» (м. Харків, 2011), Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених «Медична наука 2011» (м. Полтава, 2011), III науковому симпозіумі «Анатомо-хірургічні аспекти дитячої гастроентерології» (м. Чернівці, 2012), 7 Міжнародній конференції «Експериментальна і клінічна біохімія» (м. Львів–Люблін, 2013), Науково-практичній конференції з міжнародною участю «Бабенківські читання» (м. Івано-Франківськ, 2013), Науково-практичній конференції з міжнародною участю «Досягнення та перспективи експериментальної і клінічної ендокринології» (м. Харків, 2014), Науково-практичній конференції з міжнародною участю «Активные формы кислорода, оксид азота, антиоксиданты и здоровье человека» (м. Смоленськ, Росія, 2014), підсумковій Науково-практичній конференції «Здобутки клінічної та експериментальної медицини» (м. Тернопіль, 2014).

Публікації. За результатами досліджень опубліковано 19 наукових праць, з яких 6 статей у фахових наукових виданнях та 12 тез доповідей у матеріалах вітчизняних та міжнародних конференцій та з'їздів. Отримано 1 патент України на корисну модель.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається зі вступу, огляду наукової літератури, матеріалів і методів дослідження, результатів власних досліджень та їх обговорення, аналізу й узагальнення результатів дослідження, висновків, практичних рекомендацій, списку використаних джерел, що включає 274 найменування, з яких 125 – латиницею. Роботу викладено на 172 сторінках комп'ютерного тексту, проілюстровано 23 рисунками та 16 таблицями.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Огляд наукової літератури. В огляді наукової літератури висвітлено і проаналізовано сучасні наукові відомості щодо біохімічних механізмів, які лежать в основі розвитку гострого панкреатиту, а також охарактеризовано експериментальні моделі цієї патології. Розглянуто особливості метаболізму окремих класів ліпідів при панкреатитах різної етіології та стан про- і антиоксидантної рівноваги, роль їх порушень у розвитку гострого панкреатиту і сучасні підходи до методів корекції функціональних порушень.

Матеріали і методи дослідження. У дослідах використано білих безпородних щурів-самців масою 180–200 г. Експерименти проводили відповідно до «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених на Першому Національному конгресі України з біоетики (м. Київ, 2001). Тварин поділили на 7 груп (по 4–5 у кожній): 1 група – інтактні тварини (контроль), яким одноразово інтраперитонеально вводили по 0,5 мл ізотонічного розчину натрію хлориду; 2, 4, 6 групи – тварини з гострим панкреатитом (ГП), яких використовували для досліджень відповідно через 1, 3 і 7 діб після моделювання патології; 3, 5, 7 групи – тварини з експериментальним ГП, після моделювання якого кожній групі щурів вводили внутрішньошлунково біологічно активну добавку (БАД) «Альфа+омега» в дозі 0,5 мг/кг упродовж 7 діб.

ГП моделювали згідно з методом (Kubisch С. Н. et al., 2006) шляхом одноразового інтраперитонеального введення натщесерце L-аргініну гідрохлориду в дозі 4 г/кг, («Sigma», США). Запатентована БАД «Альфа+омега» (створена на основі природних джерел ω -3 поліненасичених жирних кислот (ПНЖК): риб'ячого жиру, що є джерелом ейкозапентаєнової і докозагексаєнової кислот, та лляної олії як джерела α -ліноленової кислоти. Також містить такі мікроелементи, як Цинк (у формі цинку сульфату) і Селен (у формі натрію селенату), а також вітаміни Е (токоферолу ацетат) і А (ретинолу ацетат). Концентрація α -ліноленової кислоти в БАД «Альфа+омега» становить 230 мг/мл, а ейкозапентаєнової та докозагексаєнової кислот – 28 і 27 мг/мл відповідно.

По закінченню відповідних термінів здійснювали забір крові натщесерце з ретробульбарного венозного синуса ока та швидко вилучали пішлункову залозу (ПЗ), печінку та мозок для подальших досліджень. Плазму отримували з відібраної крові, з використанням 0,2 мл розчину гепарину (5000 ОД/мл, «Фарма Лайф», Україна). Лейкоцити, які отримували з периферичної крові, після закінчення часу

лізису наявних у фракції еритроцитів осаджували центрифугуванням, а осад ресуспензували до кінцевої концентрації – $5 \cdot 10^6$ кл/мл.

Життєздатність лейкоцитів крові та продукцію активних форм кисню (АФО) визначали на протоковому цитометрі COULTER EPICS XL (Beckman Coulter, США), з використанням флуоресцентного зонда пропідій йодиду (P4170, Sigma–Aldrich Co. LLC.) у кінцевій концентрації 10 мкг/мл та 2',7'-дихлородигідрофлуоресцеїну діацетату (50 мкмоль/л) (35845, Sigma–Aldrich Co. LLC). Перерозподіл між різними популяціями лейкоцитів оцінювали за їх розміром та гранулярністю. Обробку результатів проводили за допомогою програми FCS Express V3. В позбавлених протеїнів кислоторозчинних екстрактах мозку, ПЗ та печінки визначали вміст окиснених NAD(P), а також вміст лактату, пірувату та малату, за концентраціями яких розраховували співвідношення вільних NAD(P)/NAD(P)H пар, з урахуванням констант рівноваги відповідних дегідрогеназ (Bergmeyer H. U., 1963).

Амінокислотний склад сироватки крові та тканин печінки щурів аналізували методом іонообмінної хроматографії на амінокислотному аналізаторі ААА–881 (Чеська Республіка) (Овчинников Ю. А., 1974).

З гомогенату печінки, ПЗ та плазми крові ліпіди екстрагували сумішню хлороформ-метанолу в співвідношенні 2:1 за методом Фолча (Folch J. et al., 1957), загальний холестерол (ХЛ), триацилгліцероли (ТАГ) визначали колориметричним методом (Камышников В. С., 2004). Жирнокислотний склад визначали методом газорідинної хроматографії на газовому хроматографі Hewlett Packard HP–6890 (США) (Cert A., 2001).

Вміст дієнових кон'югатів (ДК) визначали за інтенсивністю поглинання кон'югованих дієнових структур гідро пероксидів (Стальная И. Д., 1977), ТБК-активних продуктів згідно з (Гаврилов В. Б. и др., 1987), відновленого глутатіону (ВГ) – (Ellman G. L., 1957). Активність ензимів системи антиоксидантного захисту – каталази (КТ; КФ 1.11.1.6) і супероксиддисмутази (СОД; КФ 1.15.1.1) визначали згідно з (Чевари С. и др., 1985).

Активність аспартатамінотрансферази (АсАТ; КФ 2.6.1.1), аланінамінотрансферази (АлАТ; КФ 2.6.1.2) та лужної фосфатази (ЛФ; КФ 3.1.3.1.) визначали за допомогою стандартних наборів фірми «Human» (Німеччина), альфа-амілази – використовуючи стандартний набір ТОВ НВП Філісіт-Діагностика (Україна), за методом Каравея (Камышников В. С., 2004). Активність фосфоліпази А2 (ФЛА2; КФ 3.1.1.4.) визначали шляхом титрування жирних кислот, що вивільняються з субстрату, згідно з (Тужилин С. А., Салуэнья А. И., 1975). Статистичну обробку отриманих результатів здійснювали за допомогою комп'ютерної програми STATISTICA 10,0, з використанням непараметричного U-критерію Манна–Уїтні.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Показано зростання активності α -амілази у плазмі крові щурів вже через добу після моделювання панкреатиту L-аргініном в 3,4 раза, що свідчить про досить швидкий розвиток ГП у тварин. Оскільки через 3 та 7 діб експерименту активність α -амілази залишалась підвищеною в 4,0 та 3,9 раза відповідно, порівняно з контролем, це свідчить про адекватність обраної моделі.

Через 1 добу розвитку ГП життєздатність та співвідношення між основними типами лейкоцитів – гранулоцитами й агранулоцитами не змінювались (рис. 1). Однак через 3 доби кількість гранулоцитів у крові зростала у 2,4 раза, що, можливо, зумовлено посиленням запальних процесів в організмі тварин.

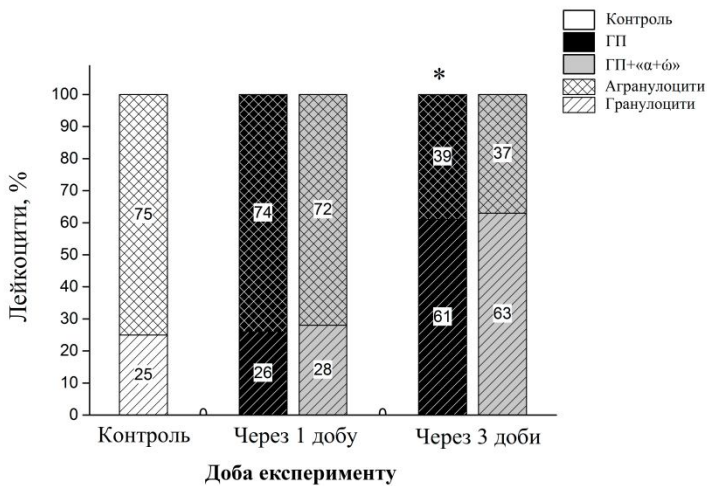


Рис. 1. Перерозподіл лейкоцитів крові у дослідних тварин (n=4)

Примітка: тут і на рис. 2–3

*- $P < 0,05$ щодо контролю

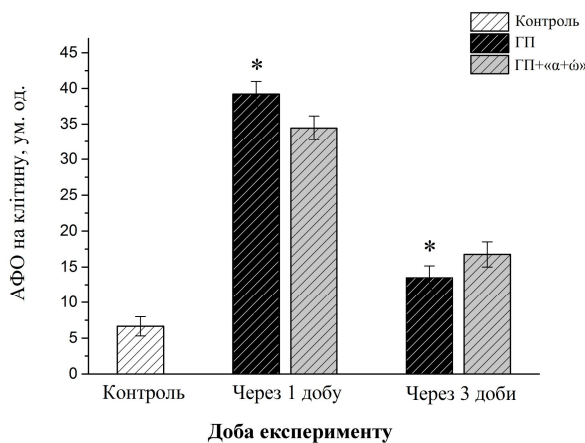


Рис. 2. Рівень АФО у гранулоцитах крові щурів з гострим панкреатитом ($M \pm m$, n=4), $P < 0,05$

При оцінці рівня окисного стресу в лейкоцитах щурів виявлено, що у гранулоцитах через 1 добу після індукції ГП базальний рівень продукування АФО зростав у 5,9 раза порівняно з контролем, а через три доби ГП рівень АФО був підвищений лише в 2 рази (рис. 2). Вплив БАД «Альфа+омега» на цей показник був незначним. Рівень продукування АФО в агранулоцитах через 1 добу ГП не змінювався порівняно з контрольною групою, але через три доби ГП продукування АФО групах збільшувалося в 1,5 раза (рис. 3).

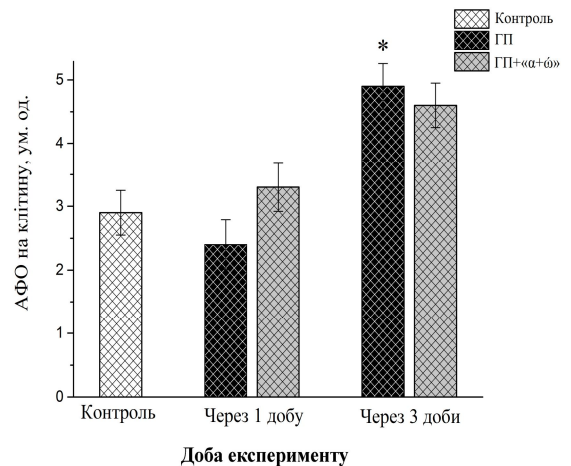


Рис. 3. Рівень АФО у агранулоцитах крові щурів з гострим панкреатитом ($M \pm m$, n=4), $P < 0,05$

У динаміці розвитку ГП з 1-ї до 7-ї доби вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) у досліджуваних тканинах щурів зростає, що є свідченням прогресування патологічного процесу (табл. 1).

**Показники про-антиоксидантної системи крові щурів за гострого панкреатиту та введення БАД «Альфа+омега»,
(M±m, n=5)**

Показник	Група тварин						
	1	2	3	4	5	6	7
	Контроль	Через 1 добу		Через 3 доби		Через 7 діб	
ГП		ГП+«α+ω»	ГП	ГП+«α+ω»	ГП	ГП+«α+ω»	
Плазма крові							
ДК, у.о./мл	5,50±0,30	6,50±0,40*	6,30±0,40	8,90±0,40*	7,60±0,50*#	11,80±0,70*	8,40±0,50*#
ТБК-АП, нмоль/мл	6,30±0,30	8,70±0,60*	7,80±0,40*	9,60±0,70*	8,40±0,50*	11,81±0,50*	8,70±0,70*#
СОД, у.о./мг протеїну за хв.	51,00±4,00	86,00±4,10*	74,90±5,00	98,00±7,20*	79,00±5,90*#	120,00±8,20*	85,00±5,10*#
КТ, мкмоль/мг протеїну за хв	4,81±0,33	3,42±0,26*	3,78±0,34	3,07±0,22*	3,85±0,25*#	2,89±0,21*	4,07±0,31*#
Підшлункова залоза							
ДК, у.о./г тканини	5,10±0,30	7,30±0,40*	6,90±0,50	8,60±0,50*	8,10±0,40	10,70±0,60*	8,30±0,50*#
ТБК-АП, нмоль/г тканини	6,10±0,40	8,40±0,60*	7,90±0,50	9,90±0,60*	8,60±0,70	12,80±0,70*	9,00±0,60*#
СОД, у.од/мг протеїну за хв.	42,00±3,00	126,00±9,00*	105,02±8,00*	137,00±13,00*	114,00±9,00*	158,00±12,00*	107,00±6,00*#
КТ, мкмоль/мг протеїну за хв	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*#
Печінка							
ДК, у.о./г тканини	6,40±0,40	7,00±0,50*	6,90±0,50	9,40±0,70*	8,80±0,40*	10,20±0,50*	8,00±0,30*#
ТБК-АП, нмоль/г тканини	7,50±0,50	9,20±0,70*	8,20±0,50	12,60±0,80*	8,90±0,60*#	13,20±0,80*	9,10±0,60*#
СОД, у.од/мг протеїну за хв.	64,00±5,00	78,90±6,00*	81,00±5,00*	106,10±8,00*	87,10±6,00*#	123,00±10,20*	82,00±7,10*#
КТ, мкмоль/мг протеїну за хв	5,74±0,43	4,12±0,35*	4,51±0,38*	3,75±0,26*	4,39±0,36*	3,27±0,28*	4,81±0,42*#

Примітки: тут і в наступній таблиці * – вірогідність відмінностей щодо 1-ї групи; # – вірогідність відмінностей 3-ї групи щодо 2-ї; 5-ї щодо 4-ї; 7-ї щодо 6-ї, P<0,05.

Так, у крові щурів 6-ї групи вміст ДК та ТБК-активних продуктів через 7 діб перевищував контрольні показники – у 2,1 та 1,9 раза відповідно. Про посилення прооксидантних процесів у печінці та, особливо, у ПЗ щурів цієї ж групи свідчить підвищення рівня ДК та ТБК-активних продуктів у 2,0 рази в ПЗ та в 1,6 та 1,8 раза відповідно в печінці щурів.

Активність СОД у плазмі крові та печінці за ГП підвищена в 1,9 раза, а у ПЗ – в 3,8 раза, що може бути проявом адаптаційного механізму у відповідь на інтенсифікацію окиснювального стресу в ПЗ. При цьому активність каталази в досліджуваних тканинах зменшувалась вже через 1 добу після моделювання патології, а через 7 діб була нижчою в середньому в 2,0 рази, що може бути пов'язано з інгібуванням зазначеного ензиму надлишком утворених гідроперекисів у результаті виснаження антиоксидантних резервів на тлі значного зростання вмісту продуктів ПОЛ. Крім того, вміст ВГ у плазмі крові знижувався на 28,0 % вже через 1 добу розвитку ГП та на 40,0 % через 3 доби від моменту моделювання патології (рис. 4). Динаміка зниження на 31,0–37,0 % вмісту ВГ у печінці (рис. 5) за умов розвитку ГП подібна до такої у крові, що свідчить про розвиток окиснювального стресу, який може призводити до інгібування ряду ензимів, у результаті окиснення сульфгідрильних груп, і порушення процесів клітинного метаболізму.

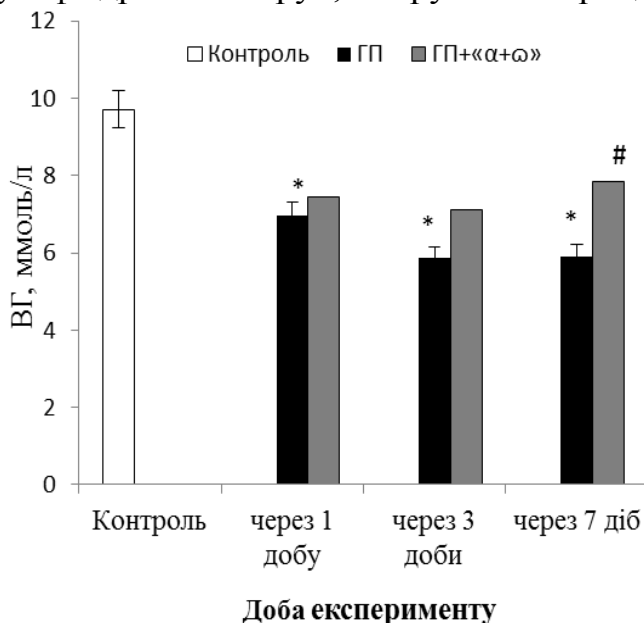


Рис. 4. Концентрація відновленого глутатіону в крові щурів за гострого панкреатиту і введення БАД «Альфа+омега», ($M \pm m$, $n=5$)

Примітки: * – вірогідність відмінностей щодо контролю, $P < 0,05$;

– вірогідність відмінностей щодо тварин за відповідних термінів ГП, $P < 0,05$.

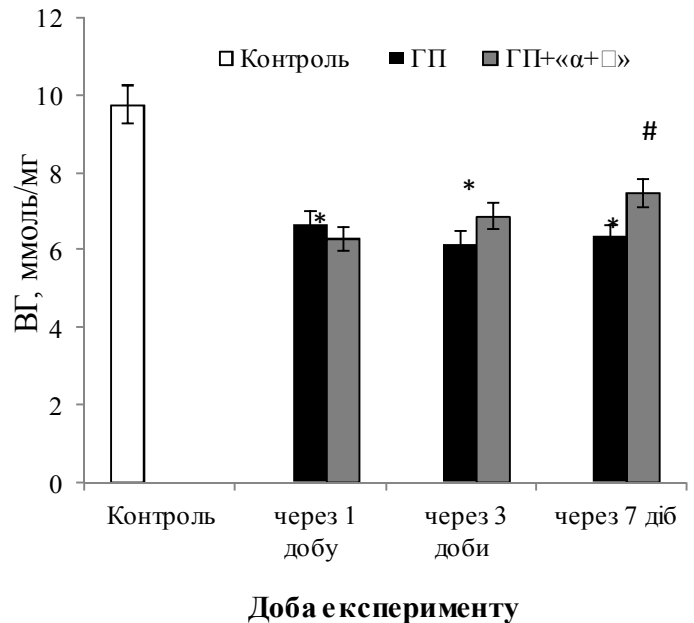


Рис. 5. Вміст відновленого глутатіону в печінці щурів за гострого панкреатиту і введення БАД «Альфа+омега», ($M \pm m$, $n=5$)

При дослідженні впливу БАД «Альфа+омега» за ГП, встановлено часткове зниження інтенсивності процесів ПОЛ та нормалізуючу дію на активність ензимів системи антиоксидантного захисту у досліджуваних тканинах (табл. 1). Так, встановлено, що вміст ДК та ТБК-активних продуктів у плазмі крові щурів 7 групи

зменшувався в 1,4 раза. За цього ж терміну введення біодобавки вміст ДК у гомогенатах ПЗ та печінки щурів зменшувався в середньому в 1,3 раза, а вміст ТБК-активних продуктів у ПЗ та печінці – в 1,4 та 1,5 раза порівняно з тваринами 6 групи з ГП.

Введення БАД «Альфа+омега» за ГП сприяє відновленню активності ензимів АОС плазми крові та печінки через 3–7 діб. Так, активність СОД у плазмі крові та печінці щурів 7 групи знижувалась на 29,2 та 33,3 %, відповідно, а активність каталази зростала на 40,8 та 47,0 % відповідно у порівнянні з тваринами 6 групи.

За введення БАД «Альфа+омега» протягом 7 діб активність СОД у ПЗ щурів знижувалася на 32,0 %, а активність каталази зростала – на 65,0 % у порівнянні з 6 групою тварин. Позитивний ефект БАД «Альфа+омега» на вміст ВГ був виявлений лише через 7 діб. Так, у крові щурів 7 групи цей показник знижувався на 33,0 % (рис. 4), а в печінці – на 18,0 % (рис. 5), у порівнянні з тваринами з ГП відповідного терміну. Підвищення вмісту відновленої форми глутатіону в цих тканинах через 7 діб свідчить про те, що його відновлення потребує більш тривалого часу дії біодобавки.

Відомо, що функціональна активність тканин визначається співвідношенням концентрацій окиснених та відновлених форм нікотинамідних динуклеотидів. Зміни рівноваги їх концентрацій згідно принципу стехіометричного контролю регулюють метаболічний стан клітин (Sun F. et al., 2012; Микуляк Т., Кучмеровська Т., 2013). Нами виявлено значні зміни вмісту нікотинамідних динуклеотидів у ПЗ, печінці та мозку тварин з ГП (табл. 2).

Так, для ПЗ через 1 та 3 доби розвитку ГП знижувався вміст NAD на 28,0 та 21,5 %; NADP – на 24,6 та 29,0 % відповідно. За цих умов вміст NAD та NADP у мозку через 1 добу знижувався на 24,5 та 27,0 %, а через 3 доби – на 39,1 та 39,9 % відповідно. У печінці вміст NAD через 1 добу розвитку ГП знижувався на 22,0 %, тоді як вміст NADP через 1 та 3 доби був нижчим від показників контрольних тварин на 25,0 та 36,0 % відповідно, що може свідчити про порушення їх обміну, функціонування NAD(P)-залежних ензимів та пригнічення енергетичного метаболізму мітохондрій.

Застосування БАД «Альфа+омега» було ефективним щодо досліджуваних показників у ПЗ лише у тварин 3 групи через 1 добу розвитку ГП у порівнянні з тваринами 2 групи з ГП. Так, вміст NAD зростав на 25,5 % у порівнянні з групою тварин з ГП відповідного терміну. У той же час у печінці застосування БАД «Альфа+омега» ефективно впливало на вміст NADP, який зростав на 26,5 % через 3 доби у порівнянні з тваринами з ГП відповідного терміну. На тлі зниження вмісту нікотинамідних динуклеотидів за ГП співвідношення вільних NAD/NADH пар знижувалось вже через 1 добу після розвитку ГП у ПЗ на 26,0 %, у печінці – на 36,6 %, тоді як співвідношення вільних NAD(P)/NAD(P)H пар знижувалося на 25,0 % лише у ПЗ, що свідчить про зростання їх відновних властивостей у результаті можливого пригнічення гліколізу, циклу трикарбонових кислот і синтезу жирних кислот – метаболічних шляхів, які продукують та використовують відновні еквіваленти NAD- та NADP-пар.

Виявлене зниження вмісту NAD у досліджуваних тканинах тварин за ГП очевидно відбувається за рахунок значного зростання вмісту лактату у ПЗ і печінці

на 81,0 % та у 1,5 раза відповідно, вже через 1 добу. Це може бути свідченням пригнічення гліколізу і, як наслідок, зниження утворення АТФ, в той час як зниження вмісту NADP може свідчити про гальмування реакцій пентозофосфатного шляху. Зниження вмісту NAD та NADP, а також співвідношень вільних NAD(P)/NAD(P)H пар обтяжує перебіг ГП, оскільки виснаження пулу NAD, опосередковане полі-(ADP-рибозо)полімеразою-1, призводить до загибелі клітин (Alano C. S. et al., 2004). З іншого боку, NADPH є ключовим фактором АОС: необхідний для функціонування системи глутатіону, а також активації каталази в еритроцитах, тому зниження його синтезу може бути причиною уповільнення процесів репарації і призводити до порушення функціонування клітинних мембран (Schreiber V. et al., 2006; Коржов В. И. и др., 2007; Xia W. et al., 2009).

При оцінці впливу БАД «Альфа+омега» на досліджувані процеси було виявлено її позитивну дію вже через 1 добу розвитку ГП, оскільки вміст NAD у ПЗ зростав на 25,5 %, вміст NADP зростав на 26,5 % у печінці, а в мозку знижувався на 22,5 % у тварин 5 групи. Співвідношення вільних NAD(P)/NAD(P)H пар вже через 1 добу розвитку ГП зростало у ПЗ, що обумовлено зниженням умісту в ній лактату, але залишалось без змін у печінці та мозку за впливу БАД «Альфа+омега».

За умов ГП відбувалися істотні зміни в амінокислотному складі сироватки крові тварин вже через 1 добу, тоді як у печінці – через 3 доби його розвитку

Так, у крові знижувався вміст лізину та лейцину, тоді як фенілаланіну, метіоніну і валіну зростав на 67,6 %, в 1,6 та 1,7 раза відповідно (рис. 6). Водночас у печінці вміст цих амінокислот та треоніну зростав лише через 3 доби (рис.7). Зміни вмісту фенілаланіну та метіоніну свідчать про ураження печінки, оскільки їх метаболізм відбувається в основному в печінці.

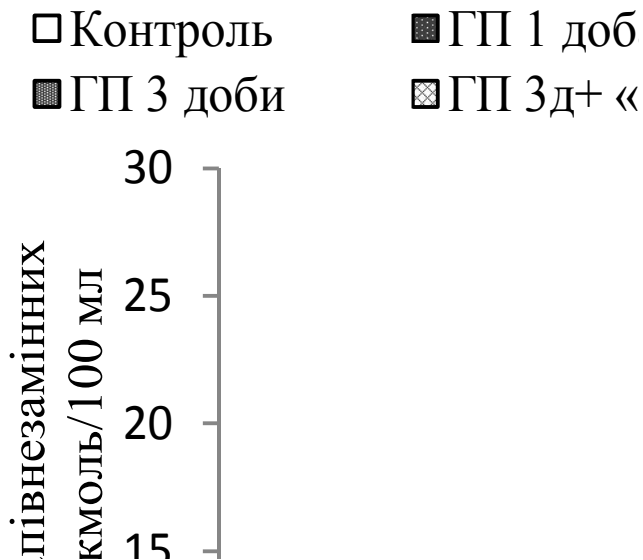


Рис. 6. Концентрація

напівнезамінних амінокислот у сироватці крові за гострого панкреатиту та впливу БАД «Альфа+омега», ($M \pm m$, $n=4$)

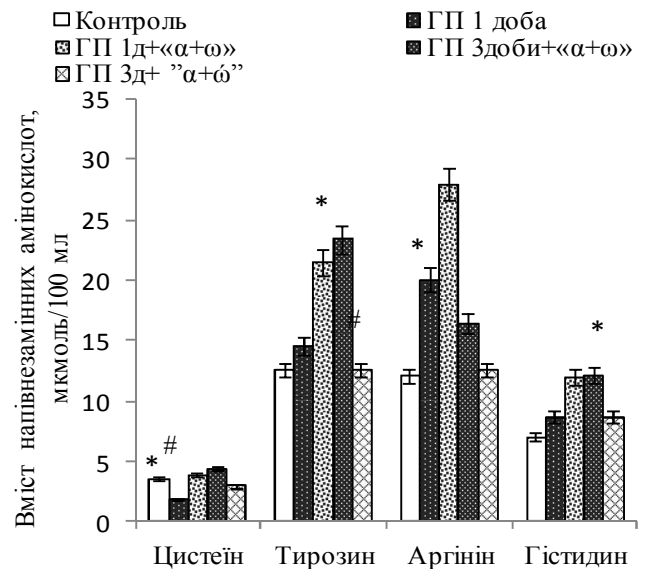


Рис. 7. Вміст напівнезамінних

амінокислот у печінці за гострого панкреатиту та впливу БАД «Альфа+омега», ($M \pm m$, $n=4$)

Примітки: * – вірогідність відмінностей щодо контролю, $P < 0,05$;

– вірогідність відмінностей щодо тварин за відповідних термінів ГП, $P < 0,05$.

Вміст NAD та NADP, вміст метаболітів і редокс-стан вільних NAD(P)/NAD(P)H пар у тканинах щурів за гострого панкреатиту та при застосуванні БАД «Альфа+омега», (M±m, n=4)

Група тварин Показник	1	2	3	4	5
	Контроль	Через 1 добу		Через 3 доби	
		ГП	ГП+«α+ω»	ГП	ГП+«α+ω»
Підшлункова залоза					
NAD, нмоль/г тканини	190,50±16,50	137,30±11,30 [*]	172,20±13,80 [#]	149,60±12,50 [*]	166,10±14,20
NADP, нмоль/г тканини	10,60±1,10	9,50±0,80 [*]	10,70±0,90	8,90±0,70 [*]	10,10±0,90
Лактат, мкмоль/г тканини	1,21±0,11	2,19±0,19 [*]	1,11±0,08 [#]	2,09±0,017 [*]	1,02±0,13 [#]
Малат, мкмоль/г тканини	0,22±0,02	0,38±0,03 [*]	0,26±0,02 [#]	0,34±0,03 [*]	0,25±0,02 [#]
Піруват, мкмоль/г тканини	0,13±0,02	0,18±0,03 [*]	0,10±0,02 [#]	0,17±0,03	0,09±0,02 [#]
NAD/NADH	991,00	732,40 [*]	841,300 [#]	730,80 [*]	843,70
NADP/NADPH	0,020	0,015 [*]	0,015	0,017	0,020
Печінка					
NAD, нмоль/г тканини	625,00±54,20	489,40±41,30 [*]	533,20 ± 49,40	523,00±48,50	543,00±48,90
NADP, нмоль/г тканини	15,40±1,40	11,50±1,10 [*]	11,70±1,00	9,80±0,90 [*]	12,40±1,30 [#]
Лактат, мкмоль/г тканини	1,72±0,15	4,32±0,37 [*]	3,41±0,31 [#]	4,86±0,45 [*]	3,21±0,32 [#]
Малат, мкмоль/г тканини	0,35±0,03	0,42±0,04	0,37±0,03	0,46±0,04 [*]	0,34±0,03 [#]
Піруват, мкмоль/г тканини	0,11±0,02	0,18±0,03 [*]	0,16±0,02	0,21±0,03 [*]	0,15±0,02
NAD/NADH	602,50	383,00 [*]	429,50	387,00 [*]	434,30
NADP/NADPH	0,011	0,015	0,013	0,015	0,013
Мозок					
NAD, нмоль/г тканини	202,00±19,00	153,00±11,00 [*]	175,00 ±16,00	123,20±10,10 [*]	151,00±12,00 [#]
NADP, нмоль/г тканини	22,90±2,00	16,70±1,40 [*]	17,50±1,60	13,70±1,10 [*]	15,80±1,30
Лактат, мкмоль/г тканини	3,55±0,28	4,60±0,31 [*]	3,85±0,29 [#]	5,20±0,43 [*]	3,65±0,35 [#]
Малат, мкмоль/г тканини	0,21 ±0,01	0,26±0,02 [*]	0,22±0,02	0,28±0,02 [*]	0,23±0,01 [#]
Піруват, мкмоль/г тканини	0,15±0,02	0,18±0,03	0,17 ±0,03	0,20±0,03 [*]	0,15±0,02 [#]
NAD/NADH	381,50	351,80	392,00 [#]	356,60	362,70
NADP/NADPH	0,024	0,023	0,025	0,024	0,022

У динаміці розвитку ГП у сироватці крові тварин уміст аргініну через 3 доби знижувався на 45,9 % (рис. 6), що може свідчити про його посилене використання в якості субстрату NO-синтази та продукування NO, який вступає в реакції пероксидного окиснення з утворенням низки вільнорадикальних сполук. Однак у печінці вміст аргініну через 1 добу ГП, а тирозину та гістидину через 3 доби навпаки зростав, у той час як уміст цистеїну знижувався вже через 1 добу на 51,0 % (рис. 7).

У сироватці крові за ГП виявлено значне підвищення вмісту аланіну, проліну, аспарагінової та глутамінової кислот у 1,5, 2,0, 3,6 та 1,8 раза, а гліцину та орнітину – на 30,5 та 50,1 % відповідно. Підвищений уміст орнітину може свідчити, що метаболізм аргініну відбувається переважно аргіназним шляхом, з можливим наступним використанням орнітину для синтезу поліамінів, які є інгібіторами NO-синтаз, забезпечуючи репарацію ушкоджених тканин, а з іншого боку, підвищений уміст орнітину в сироватці крові може проявляти більш токсичну дію на підшлункову залозу, ніж аргінін. У печінці за ГП уміст орнітину знижувався на 64,4 %, тоді як через 3 доби його вміст, як і аланіну, аспарагінової кислоти, гліцину та серину підвищувався на 51,9 %.

Застосування БАД «Альфа+омега» сприяло підвищенню вмісту лізину через 1 добу на 71,6 % у сироватці крові та через 3 доби зниженню в печінці на 33,0 %, а лейцину на 46,7 %. Через 3 доби вміст аспарагінової кислоти знижувався як у крові, так і в печінці на 54,0 та 21,0 % відповідно, що може пояснюватись її участю в процесах знешкодження аміаку. Через 3 доби вміст аргініну та ізолейцину зростав лише в сироватці крові на 45,0 та 59,0 % відповідно. Вплив біодобавки на вміст орнітину, гліцину та аланіну був різноспрямованим. Застосування БАД «Альфа+омега» вже через 1 добу призводило до збільшення в печінці вмісту цистеїну у 1,2 раза, а через 3 доби в сироватці крові аргініну та ізолейцину на 45,0 та 59,0 % відповідно, та зниження вмісту тирозину в печінці на 45,9 % у порівнянні з тваринами відповідних термінів ГП. Оскільки відомо, що цистеїн сприяє синтезу протеїнів плазми та знешкодженню токсичних продуктів обміну речовин (Артемова О. В., Лелевич В. В., 2006), то зростання його вмісту може бути свідченням відновлення цілісності мембран гепатоцитів та нормалізації перебігу метаболічних процесів.

У динаміці розвитку експериментального панкреатиту істотних змін зазнавав вміст ЗЛ і окремих їх класів у всіх досліджуваних тканинах, причому більшість показників ліпідного обміну були найвищими через 3 доби і залишалися на високому рівні й через 7 днів від початку моделювання ГП. Так, у плазмі крові щурів через 3 доби розвитку ГП суттєво зростав уміст ЗЛ, ХЛ та, особливо, ТАГ – у середньому в 1,3 раза, що може спричинювати підвищення рівня вільних жирних кислот та, у свою чергу, посилювати прогресування ГП. Тоді як у ПЗ уміст ЗЛ через 3 доби після моделювання ГП був більшим на 28,9 %, вміст ТАГ підвищувався через 3 та 7 днів, відповідно, на 62,1 та 69,0 % порівнянні з групою контролю, що свідчить про порушення ліпідного обміну в ПЗ щурів. Зміни у вмісті ліпідів спостерігали і в печінці щурів вже через 1 добу розвитку ГП, а через 3 доби виражені у більшій мірі. Так, уміст ЗЛ, ХЛ через 3 доби після моделювання ГП був

більшим, відповідно, на 51,8 % та 31,9 %, а вміст ТАГ – у 1,2 раза порівняно з тваринами контрольної групи.

Виявлене підвищення активності АЛАТ та АсАТ у крові та гомогенаті печінки в умовах дослідження можна розцінювати як прояв цитолітичного синдрому (Васильєв А. А., 2010), що свідчить про морфологічні зміни структурної організації мембран ацинарних клітин, а через 3 доби і гепатоцитів під впливом утворених метаболітів ПОЛ, що посилює патологічні зміни в печінці за умов ГП. Не виключено, що в умовах дослідження спостерігаються два типи ушкодження мембран гепатоцитів: цитолітичний та холестатичний.

Введення щурам БАД «Альфа+омега» за ГП вже через 3 доби знижувало вміст ТАГ у всіх досліджуваних тканинах, а ХЛ – лише у крові, а через 7 діб уміст ЗЛ у крові та печінці, а також знижувало активність маркерів пошкодження клітин – АЛАТ, АсАТ вже через 3 доби, а лужної фосфатази лише через 7 діб застосування біодобавки. Ці результати можуть свідчити про позитивний коригуючий ефект біодобавки на структурно-функціональний стан, у першу чергу, гепатоцитів.

У динаміці розвитку ГП достовірно змінювався відносний уміст жирних кислот (ЖК) загальних ліпідів плазми крові щурів, найбільш виражений через 3 і 7 діб від початку експериментів. При цьому змінювався рівень насиченості загальних ліпідів у плазмі крові щурів. Так, відносний уміст суми насичених жирних кислот (НЖК) у плазмі крові збільшувався вже через 1 добу після моделювання ГП, а через 7 діб був більшим на 24,1 %, порівняно з тваринами контрольної групи за рахунок вірогідного зростання пальмітинової (16:0) та стеаринової кислот (18:0) на 30,0 і 34,1 % відповідно, що, очевидно, має компенсаторний характер і свідчить про збільшення ригідності мембран та зниження їх здатності до деформації. Подібні зміни НЖК виявлені також у ПЗ та печінці за рахунок зростання вмісту міристинової (14:0), пальмітинової (16:0) та стеаринової (18:0) кислот. Підвищення рівня пальмітинової кислоти може свідчити про активацію ПОЛ та утворення лізоформ лецитину.

Поряд з цим спостерігалось зниження сумарного вмісту поліненасичених жирних кислот (ПНЖК) у всіх досліджуваних тканинах. Так, для загальних ліпідів плазми крові їх сумарний уміст через 1, 3 та 7 діб після моделювання ГП зменшувався на 13,5–18,3 % щодо контролю. Найбільші зміни відмічено серед ПНЖК родини ω -3, відносний уміст суми яких через 1, 3 та 7 діб після моделювання ГП зменшувався на 54,0–61,0 % щодо контролю, що зумовлено змінами ліноленової (18:3), ейкозопентаєнової (22:5) та докозогексаєнової (22:6) кислот. Зниження в крові щурів через 1, 3 та 7 діб ГП відносного вмісту лінолевої (18:2) кислоти на 31,9, 36,2 та 36,1 %, на тлі підвищення вмісту арахідонової (20:4) кислоти на 31,0, 31,9 та 24,0 % відповідно, зумовлене активацією ПОЛ та вказує на використання попередника лінолевої кислоти для синтезу арахідонової, яка «вимивається» з біомембран під дією ФЛА₂, оскільки через 1 добу розвитку ГП спостерігали зростання активності зазначеного ензиму в 13,9 раза порівняно з показниками контрольної групи. Через 3 доби розвитку ГП активність ФЛА₂ зросла у 16,9 раза, а через 7 діб залишалась у 15,4 раза вищою щодо контрольної групи.

У тканинах ПЗ та печінки теж спостерігали зниження сумарного вмісту ПНЖК ω -3 вже через 1 добу, а через 7 діб – на 41,0 та 40,1 % відповідно,

переважно за рахунок зниження відносного вмісту ліноленової (18:3), ейкозапентаєнової (20:5), докозапентаєнової (22:5), докозагексаєнової (22:6) кислот, яке через 7 діб ГП для ПЗ було нижчим на 38,1, 39,0, 41,0 та 43,9 %, а печінки на 68,9, 32,0, 43,1 та 42,0 % відповідно, щодо контролю. Відносний сумарний уміст ПНЖК родини ω -6 ПЗ через 7 діб зменшувався на 15,9 %, в результаті зниження відносного вмісту лінолевої кислоти (18:2) на 25,0 % у відповідний термін. У печінці зміни сумарного вмісту ПНЖК родини ω -6 були достовірними через 1 добу, хоча відносний уміст лінолевої (18:2) через 1 та 3 доби вірогідно знижувався на 17,2 та 22,1 %, а вміст арахідонової (20:4) навпаки – збільшувався через 3 доби на 20,0 %. Змінювався також відносний уміст олеїнової (18:1) кислоти в печінці через 1, 3 та 7 діб, який зменшувався на 19,5, 26,0 та 15,5 % відповідно. Такі зміни ЖК зумовлювали зростання співвідношення НЖК/ПНЖК на користь насичених ЖК та співвідношення ПНЖК ω -6/ ω -3 на користь ПНЖК ω -6 у всіх досліджуваних тканинах.

За введення БАД «Альфа+омега» щурам із ГП, спостерігали часткову нормалізацію жирнокислотного профілю загальних ліпідів плазми крові, ПЗ та печінки вже через 3 доби, яка зберігалась і через 7 діб розвитку патології. Це також стосується відновлення вмісту НЖК, ПНЖК та їх співвідношення до показників тварин інтактної групи.

Отримані результати свідчать, що в основі біохімічних механізмів виникнення та розвитку гострого панкреатиту лежать порушення обміну ліпідів та протеїнів, зміни співвідношення вільних NAD(P)/NAD(P)H пар, активація ПОЛ та модифікація функціонального стану АОС, що вказує на інтенсифікацію окисного стресу та порушення енергетичних процесів у клітинах ПЗ, печінки та крові. Встановлено, що застосування БАД «Альфа+омега» пригнічує розвиток цих порушень та сприяє нормалізації метаболічних процесів.

ВИСНОВКИ

На основі теоретичного узагальнення результатів наукової літератури та аналізу власних експериментальних досліджень вирішено нову наукову задачу щодо встановлення конкретних біохімічних порушень які призводять до розвитку гострого панкреатиту, а також експериментально обґрунтовано доцільність застосування БАД «Альфа+омега» з метою корекції виявлених метаболічних та функціональних змін.

1. Розвиток гострого панкреатиту супроводжується підвищенням рівня продукування активних форм Оксигену в 5,9 раза у гранулоцитах та в 1,5 раза в агранулоцитах. Через 3 доби після розвитку ГП змінювалось співвідношення цих типів лейкоцитів на користь гранулоцитів, що вказує на посилення розвитку окисних і запальних процесів.

2. Показано, що за експериментального гострого панкреатиту відбувається інтенсифікація окисних процесів, підтвердженням чого є активація ПОЛ за підвищенням у крові, підшлунковій залозі та печінці вмісту дієнових кон'югатів у 2,1, 2, 0 та 1,6 раза та ТБК-активних продуктів відповідно у 1,9, 2,0 та 1,8 раза через 7 діб моделювання гострого панкреатиту. Застосування БАД «Альфа+омега»

протягом 7 діб призводило до зниження зазначених показників у крові та підшлунковій залозі у 1,4 та 1,3 раза, а в печінці – у 1,3 та 1,5 раза відповідно.

3. Встановлено, що за розвитку гострого панкреатиту інтенсифікація окисних процесів супроводжується підвищенням активності СОД у плазмі крові, підшлунковій залозі та печінці в 2,1, 3,8 та 1,9 раза відповідно, водночас активність каталази пригнічувалась в 1,7, 2,3 та 1,8 відповідно, вміст ВГ знижувався на 33,0 та 18,0 % у крові та печінці. Через 7 діб застосування БАД «Альфа+омега» спостерігалось наближення зазначених показників до рівню контролю.

4. Виявлено, що за умов гострого панкреатиту знижується вміст нікотинамідних динуклеотидів у підшлунковій залозі та печінці щурів, а також співвідношення вільних NAD/NADH пар на 26,0 та 36,6 % відповідно, а співвідношення вільних NAD(P)/NAD(P)H пар знижується на 25,0 % у підшлунковій залозі вже через 1 добу розвитку патології. Використання БАД «Альфа+омега» частково відновлювало ці показники у всіх досліджуваних тканинах щурів, особливо у підшлунковій залозі вже через 1 добу її застосування.

5. За умов гострого панкреатиту в сироватці крові та печінці щурів виявлено достовірні зміни вмісту більшості амінокислот, у тому числі аргініну та орнітину, що може свідчити як про порушення засвоєння протеїнів, так і про їх можливі структурні та функціональні зміни. Застосування БАД «Альфа+омега» на тлі гострого панкреатиту нормалізувало вміст метіоніну, аргініну, тирозину, глутаміну, серину, орнітину та глутамінової кислоти в сироватці крові, а також лізину, лейцину, гліцину та фенілаланіну в печінці.

6. Розвиток гострого панкреатиту призводить до перерозподілу вмісту жирних кислот, що входять до складу загальних ліпідів плазми крові, підшлункової залози та печінки, з одночасним зростанням частки НЖК (особливо пальмітинової та стеаринової) та зниженням ПНЖК родини ω -6, ω -3 (особливо ліноленової, ейкозапентаєнової, докозапентаєнової та докозагексаєнової кислот), тоді як уведення БАД «Альфа+омега» призводило до зниження співвідношення НЖК/ПНЖК та ω -6/ ω -3 у всіх досліджуваних тканинах.

7. Встановлено порушення окисно-відновних процесів за експериментального гострого панкреатиту, які частково або повністю нормалізуються за використання БАД «Альфа+омега», коригуюча дія якої може бути пов'язана як із безпосереднім впливом на них в якості скавенджера активних форм Оксигену, так і опосередковано – шляхом нормалізації енергетичних та інших метаболічних процесів за рахунок змін рівня їх інтермедіатів.

СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у фахових наукових виданнях:

1. Привроцька І. Б. Стан енергетичних процесів у тканинах та вміст амінокислот у сироватці крові та печінці щурів за умов гострого панкреатиту / І. Б. Привроцька, Л. В. Яніцька, Т. М. Кучмеровська // Проблеми ендокринної патології. – 2014. – № 1. – С. 38–48. *(Здобувачем проаналізовано наукові джерела, здійснено відбір зразків для дослідження, узагальнено одержані результати та підготовлено статтю до друку).*

2. Привроцька І. Б. Окислювальний стрес у лейкоцитах крові,

про/антиоксидантний статус та жирнокислотний склад ліпідів підшлункової залози за експериментального гострого панкреатиту в щурів / І. Б. Привроцька, Т. М. Кучмеровська // Український біохімічний журнал. – 2013. – Т. 85, № 5. – С. 124–136.

(Здобувачем проаналізовано наукову літературу, здійснено відбір зразків для дослідження, обробку та узагальнення одержаних результатів, підготовлено статті до друку).

3. Привроцька І. Б. Динаміка показників про- та антиоксидантної рівноваги при гострому панкреатиті та її корекція / І. Б. Привроцька, О. С. Покотило // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. – 2011. – № 2 (54). – С. 42–47.

(Здобувачем виконано експериментальні дослідження, статистичну обробку, взято участь у написанні статті та підготовці до друку).

4. Привроцька І. Б. Жирнокислотний склад ліпідів печінки за умов гострого аргінінового панкреатиту в щурів / І. Б. Привроцька, О. С. Покотило // Медична хімія. – 2011. – № 3 (48). – С. 85–90. *(Здобувачем проведено аналіз літератури, здійснено відбір зразків для дослідження, аналіз отриманих даних, взято участь у написанні статті та підготовці до друку).*

5. Привроцька І. Б. Жирно-кислотний склад ліпідів крові за гострого аргінінового панкреатиту у щурів / І. Б. Привроцька, О. С. Покотило // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. – 2011. – № 4 (56). – С. 19–24. *(Здобувачем проведено аналіз літератури, здійснено відбір зразків для досліджень та аналіз отриманих даних, взято участь у написанні статті та підготовці до друку).*

6. Привроцька І. Б. Зміни ліпідного обміну у щурів на тлі гострого L-аргінінового панкреатиту та при введенні БАД «Альфа+омега» / І. Б. Привроцька, О. С. Покотило, В. М. Привроцький // Здобутки клінічної та експериментальної медицини. – 2011. – № 2 (13). – С. 104–107. *(Здобувачем виконано експериментальні дослідження, здійснено відбір зразків, виконано біохімічні дослідження, обробку і узагальнення одержаних результатів).*

Патенти:

7. Патент 70193. UA, МПК G 09 В 23/28. Спосіб корекції ліпідного обміну при гострому панкреатиті / І. Б. Привроцька, О. С. Покотило, В. М. Привроцький; – заявл. 26.12.2011; опубл. 25.05.2012, бюл. № 10. *(Здобувачем самостійно проведено патентний пошук, виконано експерименти, оформлено заявку на патент).*

Матеріали і тези конференцій:

8. Привроцька І. Б. Стан енергетичних процесів у тканинах щурів та амінокислотний вміст у сироватці крові та печінці за умов гострого панкреатиту. / І. Б. Привроцька, Т. М. Кучмеровська // Досягнення та перспективи експериментальної і клінічної ендокринології (Тринадцяті Данилевські читання): науково-практична конференція з міжнародною участю, 13–14 березня 2014 р.: матеріали конф. – Харків, 2014. – С. 133–134. *(Здобувачем проведено відбір зразків для досліджень, узагальнено одержані результати та підготовлено тези до друку).*

9. Привроцкая И. Б. Оксидативный метаболизм при остром экспериментальном панкреатите / И. Б. Привроцкая, Т. М. Кучмеровская // Активные формы кислорода, оксид азота, антиоксиданты и здоровье человека: VIII Национальная научно-практическая конференция с международным участием, 25–29 мая 2014 г.: материалы конф. – Смоленск, 2014 – С. 173–175. *(Здобувачем проведено аналіз літератури, здійснено відбір зразків для досліджень, узагальнення одержаних результатів, підготовлено тези до друку).*

10. Привроцька І. Б. Окислювальний стрес в лейкоцитах крові за гострого панкреатиту / І. Б. Привроцька, Т. М. Кучмеровська // Здобутки клінічної та

експериментальної медицини: підсумкова науково–практична конференція, 21 травня 2014 р.: матеріали конф. – Тернопіль, ТДМУ, 2014. – С. 131. *(Здобувачем здійснено відбір зразків для досліджень, узагальнення одержаних результатів, підготовлено тези до друку).*

11. Pryvrotska I. B. Alteration of fatty acids composition of lipids and activity of antioxidant enzymes of pancreas in acute experimental pancreatitis / I. B. Pryvrotska, T. M. Kuchmerovska // Сучасні аспекти експериментальної та клінічної біохімії: 7-а Львівсько-Люблінська наукова конференція, 23–24 травня 2013 р.: матеріали конф. – Львів, 2013. – С. 154. *(Здобувачем здійснено експериментальні дослідження, обробку та узагальнення результатів, підготовлено тези до друку).*

12. Привроцька І. Б. Амінокислотний вміст сироватки крові щурів за умов експериментального гострого панкреатиту / І. Б. Привроцька, Т. М. Кучмеровська // Бабенківські читання присвячена пам'яті академіка Г. О. Бабенка: Науково–практична конференція з міжнародною участю, 24–25 жовтня 2013 р.: матеріали конф. – Івано-Франківськ, 2013. – С. 82. *(Здобувач провела експериментальні дослідження, відбір зразків для дослідження, статистичну обробку, підготувала тези до друку).*

13. Привроцька І. Б. Вплив БАД «Альфа+омега» на вміст ненасичених жирних кислот у тканині печінки за умов гострого аргінінового панкреатиту у щурів / І. Б. Привроцька, О. С. Покотило // Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів: IV Науково–практична конференція з міжнародною участю, 29–30 вересня 2011 р.: матеріали конф. – Тернопіль. – 2011. – С. 222–223. *(Здобувач провела дослідження, підготувала тези до друку).*

14. Привроцька І. Б. Активність ферментів цитолізу у плазмі крові в динаміці гострого l-аргінінового панкреатиту в експерименті / І. Б. Привроцька, О. С. Покотило // Анатомо-хірургічні аспекти дитячої гастроентерології: матеріали 3-го наукового симпозиуму, 20 квітня 2012 р. – Чернівці, 2012. – С. 159–160. *(Здобувач провела дослідження, підготувала тези до друку).*

15. Привроцька І. Б. Особливості ліпідного обміну на тлі гострого панкреатиту та при введенні БАД «Альфа+омега» / І. Б. Привроцька, О. С. Покотило // Біохімічні основи патогенезу ураження внутрішніх органів різної етіології та способи їх фармакологічної корекції: Всеукраїнська науково-практична конференція, 3–4 листопада 2011 р.: матеріали конф. // Медична хімія. – 2011. – Т. 13, № 4 (49). – С. 224. *(Здобувач провела дослідження, підготувала тези до друку).*

16. Привроцька І. Б. Вплив БАД «Альфа+омега» на вміст окремих класів ліпідів у плазмі крові білих щурів на тлі гострого l-аргінінового панкреатиту / І. Б. Привроцька, О. С. Покотило // Медична наука 2011: Всеукраїнська науково-практична конференція молодих учених, 29–30 листопада 2011 р.: матеріали конф. – Полтава, 2011. – С. 69–70. *(Здобувач провела дослідження, підготувала тези до друку).*

17. Вплив температурних умов і тривалості зберігання на жирнокислотний склад БАД «Альфа+омега» / О. С. Покотило, О. О. Покотило, Х. Ю. Недошитко, І. Б. Привроцька // Сучасні досягнення фармацевтичної технології: II Науково–практична конференція з міжнародною участю, 17–18 листопада 2011 р.: матеріали конф. – Харків, 2011. – С. 165–166. *(Здобувачем проведено аналіз літератури, підготовку зразків для досліджень)*

18. Вміст омега-3 ПНЖК у тканинах білих щурів різної статі та віку за умов інтоксикації ксенобіотиками / О. С. Покотило, Х. Ю. Недошитко, М. І. Коваль,

І. Б. Привроцька // *Х Український біохімічний журнал: Матеріали з'їзду // Укр. біохім. журн.* – 2010. – Т. 82, № 4 (додаток 2). – С. 154. *(Здобувачем проведено аналіз літератури, відбір зразків для досліджень)*

19. Стабілізація Ω -3 поліненасичених жирних кислот БАД «Альфа+Омега» природними антиоксидантами / М. І. Коваль, Х. Ю. Недошитко, І. Б. Привроцька, О. С. Покотило // *Досягнення і перспективи експериментальної і клінічної біохімії: Всеукраїнська науково-практична конференція: матеріали конф. // Медична хімія.* – 2009. – Т. 11, № 3. – С. 117–119. *(Здобувачем проведено аналіз літератури, підготовку зразків для досліджень)*

АНОТАЦІЯ

Привроцька І. Б. Особливості оксидативного метаболізму за експериментального гострого панкреатиту та шляхи корекції. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія. – Національний університет біоресурсів і природокористування України, Київ, 2015.

Дисертація присвячена дослідженню особливостей перебігу метаболічних процесів у крові, підшлунковій залозі та печінці щурів за умов гострого експериментального панкреатиту та можливості використання БАД «Альфа+омега» для корекції змін, що виникають.

У результаті проведених досліджень встановлено, що хоча життєздатність лейкоцитів не змінювалася за розвитку ГП, рівень продукування АФО у гранулоцитах крові зростав уже через 1 добу, тоді як їх кількість зростала на 3 добу. В агранулоцитах збільшення продукування активних форм кисню спостерігалось через 3 доби після індукції ГП. Одночасно з цими змінами виявлено порушення про-антиоксидантої рівноваги: накопичення продуктів перекисного окиснення ліпідів (ТБК-АП, ДК), що супроводжувалося змінами активності ферментів антиоксидантної системи (СОД, каталази) та рівня відновленого глутатіону в крові, підшлунковій залозі та печінці, що є свідченням розвитку окисних та запальних процесів у підшлунковій залозі.

Інтенсифікація окисних процесів та зростання активності фосфоліпази A_2 за розвитку ГП супроводжується достовірними змінами у вмісті ЖК загальних ліпідів крові, підшлункової залози та печінки. Встановлено підвищення відносного сумарного вмісту насичених жирних кислот, зокрема міристинової, пальмітинової та стеаринової, з одночасним зниженням сумарного вмісту поліненасичених жирних кислот, насамперед есенціальних жирних кислот родини ω -3 (ліноленової, ейкозапентаєнової, докозапентаєнової, докозагексаєнової). Застосування БАД «Альфа+омега», що містить ω -3 поліненасичені жирні кислоти сприяло частковій нормалізації життєздатності лейкоцитів, ЖК спектра ліпідів та про-антиоксидантної системи крові, підшлункової залози і печінки.

Встановлено зниження вмісту нікотинамідних динуклеотидів у підшлунковій залозі, печінці та мозку, а також порушення динамічної рівноваги співвідношення вільних NAD(P)/NAD(P)H пар у підшлунковій залозі і печінці. За таких умов у

сироватці крові та печінці змінювався вміст більшості незамінних та замінних амінокислот, тоді як серед напівзамінних найбільше – вміст аргініну та орнітину. Застосування препарату БАД «Альфа+омега» частково відновлювало динамічну рівновагу нікотинамідних динуклеотидів у досліджуваних тканинах щурів та сприяло нормалізації вмісту амінокислот у сироватці крові та печінці.

Ключові слова: гострий панкреатит, щури, кров, підшлункова залоза, печінка, лейкоцити, активні форми кисню, система антиоксидантного захисту, NAD, NADP, амінокислоти, жирні кислоти, БАД «Альфа+омега».

АННОТАЦІЯ

Привроцкая И. Б. Особенности окислительного метаболизма при экспериментальном остром панкреатите и пути коррекции. – На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.04 – биохимия. – Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины, Киев, 2015.

Диссертация посвящена исследованию особенностей протекания метаболических процессов в крови, поджелудочной железе и печени крыс в условиях острого экспериментального панкреатита и возможности использования БАД "Альфа+омега" для коррекции возникающих изменений.

Доказательством развития экспериментального острого панкреатита (ОП) у крыс, индуцированного внутрибрюшинным введением L-аргинина, является повышение активности α -амилазы, аминотрансфераз в плазме крови (1-е, 3-и, 7-е сутки).

Для исследования возможного вовлечения окислительного стресса, а также воспалительных процессов в развитии ОП был оценен уровень продукции АФК в лейкоцитах крови, а также их жизнеспособность. Впервые было выявлено перераспределение субпопуляций лейкоцитов и обнаружено, что количество гранулоцитов крови увеличивается через 3 суток, а через 1 сутки – продукция АФК. Увеличение продукции АФК в агранулоцитах наблюдалось только через 3 суток после индукции ОП. Несмотря на то, что жизнеспособность лейкоцитов не изменялась, интенсификация в них окислительного стресса может свидетельствовать о развитии воспалительных процессов. Одновременно с этими изменениями выявлено нарушение про-антиоксидантного равновесия, о чем свидетельствует накопление продуктов перекисного окисления липидов (ТБК–АП, ДК), содержание которых возрастало в крови и поджелудочной железе крыс в 2,0 раза, а в печени в – 1,6 и 1,8 раза соответственно, что является свидетельством интенсификации окислительных и воспалительных процессов в поджелудочной железе. Интенсификация окислительного стресса сопровождалась изменениями активности ферментов системы антиоксидантной защиты. Так, активность каталазы снижалась уже через сутки после развития острого панкреатита, а через 7 суток была ниже в 2,3 раза в поджелудочной железе, тогда как в плазме крови и печени – в 1,7 и 1,8 раза соответственно. Содержание восстановленного глутатиона

снижалось через 3 и 7 суток развития ОП в плазме крови на 28,0 и 40,0 %, а в печени на – 31,0 и 37,0 % соответственно. При этом, активность СОД возрастала в плазме крови и печени крыс и, особенно, в поджелудочной железе – в 3,8 раза, что может быть адаптационным механизмом в ответ на интенсификацию окислительного стресса.

В результате развития острого панкреатита впервые установлено снижение содержания никотинамидных динуклеотидов в поджелудочной железе, печени и мозге, а также значительные нарушения динамического равновесия соотношения свободных NAD(P)/NAD(P)H пар в поджелудочной железе и печени. В условиях развития ОП в сыворотке крови и печени обнаружены значительные изменения содержания большинства аминокислот, тогда как среди условно незаменимых аминокислот только содержание аргинина и орнитина изменялось в большей степени. Применение БАД "Альфа+омега" частично восстанавливало содержание никотинамидных динуклеотидов и их динамическое равновесие в исследуемых тканях крыс, особенно в поджелудочной железе, путем увеличения их содержания и соотношения свободных NAD(P)/NAD(P)H пар, а также способствовало нормализации содержания большинства аминокислот в сыворотке крови и печени.

Развитие острого панкреатита, сопровождающееся интенсификацией окислительного стресса, приводило к существенным изменениям в содержании жирных кислот общих липидов. В этих условиях увеличивалась активность фосфолипазы A₂, а также были обнаружены значительные изменения жирнокислотного состава общих липидов крови, поджелудочной железы и печени. При этом установлено повышение относительного суммарного содержания насыщенных жирных кислот в динамике экспериментов, в частности миристиновой, пальмитиновой и стеариновой, с одновременным снижением суммарного содержания полиненасыщенных жирных кислот, в первую очередь – эссенциальных жирных кислот семейства ω -3 (линоленовой, эйкозапентаеновой, докозапентаеновой, докозагексаеновой). Относительное суммарное содержание полиненасыщенных жирных кислот семейства ω -6 в поджелудочной железе и печени подвергалось меньшим изменениям. Это способствовало увеличению соотношения насыщенных / полиненасыщенных жирных кислот, с преобладанием насыщенных и соотношения полиненасыщенных жирных кислот семейства ω -6/ ω -3, с преобладанием кислот семейства ω -6 во всех исследуемых тканях по сравнению с контрольной группой животных.

БАД "Альфа+омега", содержащая ω -3 полиненасыщенные жирные кислоты, частично нормализовала жизнеспособность лейкоцитов, про-антиоксидантную систему крови, поджелудочной железы и печени, что приводило к восстановлению функционирования системы антиоксидантной защиты. Более того, наблюдалась частичная нормализация содержания жирных кислот общих липидов плазмы крови, поджелудочной железы и печени, особенно через 7 суток применения биодобавки, что сопровождалось восстановлением содержания насыщенных и полиненасыщенных жирных кислот, а также их соотношения.

Ключевые слова: острый панкреатит, крысы, кровь, поджелудочная железа, печень, лейкоциты, активные формы кислорода, система антиоксидантной защиты, NAD, NADP, аминокислоты, жирные кислоты, БАД «Альфа + омега».

SUMMARY

Pryvrotska I. B. Features of oxidative metabolism on experimental acute pancreatitis and the ways of their correction. – Manuscript.

Dissertation for scientific degree of the Candidate of Biological Sciences in speciality 03.00.04 – Biochemistry. – National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Kiev, 2015.

It was demonstrated the elevation of ROS production in granulocytes and their number in the blood after 1 and 3 days of acute pancreatitis induction respectively. At the same time in agranulocytes the increase of ROS production was observed in 3 days after the induction of AP, which in general did not alter the viability of leukocytes. As a result of the studies was found an impairment of prooxidant-antioxidant balance in blood, pancreas and liver, as well as essential changes in the fatty acid composition of these tissues. The development of AP resulted in the intensification of lipid peroxidation and antioxidant system's enzyme activity changes in dynamic of experiments, which is the evidence of the oxidative stress and the inflammation in the pancreas. Under these conditions increased activity of phospholipase A₂, which is accompanied by significant changes of the fatty acid composition of total lipids in blood, pancreas and liver was observed. It was established the relative increase in the total content of saturated fatty acids, in particular myristic, palmitic and stearic, with a simultaneous decrease in the total content of polyunsaturated fatty acids, primarily ω -3 essential fatty acids (linolenic, eicosapentaenoic, dokozapentayenoic, docosahexaenoic). The usage of the dietary supplements "Alpha + Omega" containing ω -3 polyunsaturated fatty acids contributed to the partial normalization of oxidative stress in leukocytes and their viability, fatty acid composition and prooxidant-antioxidant balance in blood, pancreas and liver. The decrease of nicotinamide adenine dinucleotides content in the pancreas, liver and brain and substantial impairment of dynamic equilibrium of free NAD(P)/NAD(P)H couples with the shift to reduced state in pancreas and liver was revealed in AP. Under these conditions, it was shown that the content of non-essential and essential amino acids in serum and liver was significantly changed. Among semi-essential amino acids the contents of arginine and ornithine were more altered. The usage of the BAS "Alpha + omega" partially restored the content and dynamic equilibrium of nicotinamide adenine dinucleotides in investigated rat tissues, especially in the pancreas, and facilitated the normalization of serum and liver amino acids content.

Keywords: acute pancreatitis, rats, blood, pancreas, liver, leukocytes, reactive oxygen species, antioxidant system's enzyme activity, NAD, NADP, amino acids, fatty acids, BAS "Alpha + omega."