

## ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ У БОЛЬНЫХ ОСТРЫМ И ХРОНИЧЕСКИМ ПАНКРЕАТИТОМ

Григорьева И.Н.<sup>1,2</sup>, Романова Т.И.<sup>1</sup>, Рагино Ю.И.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> НИИ терапии СО РАМН, Новосибирск

<sup>2</sup> ГОУ ВПО Новосибирский государственный медицинский университет Росздрава

Григорьева Ирина Николаевна

630089, Новосибирск, ул. Бориса Богаткова, 175/1

Тел.: 8 (383) 220 5855, 8 (913) 752 0702

E-mail: igrigorieva@ngs.ru

### РЕЗЮМЕ

**Цель** — оценить уровень продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в липопротеинах низкой плотности (ЛНП) у больных острым и хроническим панкреатитом (ОП и ХП) и изучить изменения устойчивости ЛНП к окислению при разных клинических вариантах течения заболевания.

**Материал и методы.** Были обследованы 39 больных ХП и 37 больных ОП различной этиологии, группа сравнения — 7 человек без патологии поджелудочной железы и сахарного диабета (СД). Все больные ХП были обследованы в стадию обострения, больные ОП — в первые 5 суток после поступления в стационар. Определение уровней продуктов ПОЛ в ЛНП и устойчивости ЛНП к  $\text{Cu}^{2+}$ -индуцированному окислению проводили собственным методом (Рагино, 1998).

**Результаты.** У больных ХП исходный уровень продуктов ПОЛ в ЛНП выше ( $8,9 \pm 1,5$  нмоль МДА/мг белка ЛНП), чем у лиц группы сравнения ( $5,3 \pm 0,8$ ) и у больных ОП ( $5,0 \pm 0,5$ ,  $p < 0,05$ ), а устойчивость ЛНП к окислению значительно ниже, чем у лиц группы сравнения. У больных ОП и ХП с устойчивым болевым синдромом в левом подреберье исходный уровень продуктов ПОЛ в ЛНП значительно выше ( $7,0 \pm 0,6$  и  $5,0 \pm 0,6$ ,  $p = 0,016$ ), а устойчивость ЛНП к окислению после 0,5, 1 и 2 часов их инкубации с ионами меди ( $31,7 \pm 1,8$  и  $23,2 \pm 1,9$ ,  $p = 0,002$ ) — ниже по сравнению с больными ОП и ХП с безболевым течением заболевания. При сравнении со всеми обследованными больными ОП и ХП без СД только у больных ХП с сопутствующим СД 2-го типа было выявлено снижение устойчивости ЛНП к окислению через 0,5, 1 и 2 часа их инкубации с ионами меди.

**Вывод.** Активность процессов ПОЛ в крови и ЛНП нарушена при ОП и ХП.

**Ключевые слова:** острый панкреатит; хронический панкреатит; перекисное окисление липидов в ЛНП; устойчивость ЛНП к окислению.

### SUMMARY

**Objective:** To assess the initial levels of lipid peroxidation (LPO) products in LDL and to study changes in oxidative resistance (OR) of precipitated LDL in acute and chronic pancreatitis patients (OP and CP).

**Methods:** were examined 39 CP patients and 37 OP patients, and the control group — 7 persons without pancreatic diseases and diabetes mellitus (DM). All CP patients were examined in the acute stage, OP patients — in the first 5 days after admission to hospital. Determination of LPO products in LDL and OR of LDL to  $\text{Cu}^{2+}$  — induced oxidation were carried out its own method (Ragino, 1998).

**Results:** In CP patients the initial level of LPO products in LDL was higher ( $8.9 \pm 1.5$  nmol MDA/mg LDL protein) than in those in control group ( $5.3 \pm 0.8$ ) and in OP patients ( $5.0 \pm 0.5$ ,  $p < 0.05$ ), and the OR of LDL is significantly lower than those in the control group. In AP and CP patients with permanent pain syndrome in the left hypochondrium initial level of LPO products in LDL is much higher ( $7.0 \pm 0.6$ , and  $5.0 \pm 0.6$ ,  $p = 0,016$ ), and OR of LDL after 0, 5, 1 and 2 h incubation with  $\text{Cu}^{2+}$  (2 h:  $31.7 \pm 1.8$  and  $23.2 \pm 1.9$ ,  $p = 0.002$ ) — much lower compared with AP and CP patients without pain. Only CP patients combined with DM type 2 were defined reducing the OR of LDL after 0.5, 1 and 2 h incubation with  $\text{Cu}^{2+}$ .

**Conclusion:** The activity of LPO in the blood and LDL were affected in AP and CP patients.

**Keywords:** lipid peroxidation in LDL; oxidative resistance of LDL; acute pancreatitis; chronic pancreatitis.

В последнее десятилетие отмечается рост заболеваемости острым и хроническим панкреатитом (ОП и ХП) [1], увеличивается число дней временной нетрудоспособности, связанных с данной патологией [2]. Летальность после первичного установления диагноза ХП составляет до 20% в течение первых 10 лет, 15–20% больных ХП погибают от осложнений, связанных с атаками ОП, другие — вследствие вторичных нарушений пищеварения и инфекционных осложнений [1]. Все это делает ОП и ХП важной социальной и экономической проблемой современной медицины и обуславливает рост числа исследований в панкреатологии [1–5], в частности изучения роли перекисного окисления липидов (ПОЛ) в развитии и прогрессировании ОП и ХП [1; 2; 4–7].

Уровень продуктов ПОЛ (диеновых конъюгатов, малонового диальдегида (МДА) и др.) в свежевыделенных липопротеинах низкой плотности (ЛНП) исследуют с целью оценки степени окислительной модификации ЛНП *in vivo*, в частности в крови [8]. Однако основной процесс клеточного окисления ЛНП *in vivo* происходит в сосудистой стенке артерий в присутствии высокой концентрации ионов металлов переменной валентности ( $\text{Cu}^{2+}$  и  $\text{Fe}^{2+}$ ). Процесс окисления ЛНП *in vitro* также вызывается ионами меди. *In vitro* создается экспериментальная копия окисления ЛНП *in vivo* и оценивается, насколько быстро и значительно ЛНП способны окисляться в организме [8]. Н. Esterbauer (1993) предложил показатель для оценки «предрасположенности» ЛНП к окислению — устойчивость ЛНП к окислению, который отражает их прооксидантно-антиоксидантный потенциал [9]. Именно такой подход к оценке состояния активности процессов ПОЛ у больных ОП и ХП мы использовали при проведении настоящего исследования.

Цель — оценить уровень продуктов ПОЛ в ЛНП у больных ОП и ХП и изучить изменения устойчивости ЛНП к окислению у обследованных больных при различных клинических вариантах течения заболевания.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В ходе одномоментного клинического исследования были обследованы 39 больных ХП и 37 больных ОП различной этиологии (средний возраст обследованных больных составил  $52,6 \pm 1,9$  года; мужчин — 31, женщин — 45), а также группа сравнения — 7 человек без патологии поджелудочной железы и сахарного диабета (СД). По полу и возрасту все группы больных были сопоставимы. Исследование было выполнено с одобрения комитета биомедицинской этики НИИ терапии СО РАМН. От всех пациентов было получено письменное информированное согласие на участие в исследовании. Диагнозы ОП и ХП были верифицированы клинико-инструментальными методами. Все больные ХП были обследованы в стадии обострения, больные ОП — в первые 5 суток после поступления в стационар. Для оценки

течения заболевания был использован предложенный нами опросник, охватывающий наиболее значимые клинические признаки ОП и ХП. СД и его тип выявляли согласно рекомендациям ВОЗ (1999) [10], у всех больных с СД был выявлен 2-й тип.

Пробы крови брали из локтевой вены утром натощак через 12 часов после приема пищи. Определение уровней продуктов ПОЛ в ЛНП и устойчивости ЛНП к  $\text{Cu}^{2+}$ -индуцированному окислению проводили собственным способом (Рагино, 1998). ЛНП получали из сыворотки осаждением с гепарином, промывали и перерастворяли в 1-М растворе NaCl. В ЛНП определяли концентрацию белка по методу Лоури и исходный уровень продуктов ПОЛ флуориметрическим методом [11]. Окислительную модификацию ЛНП проводили в среде Дульбекко без  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$ , содержащей ионы  $\text{Cu}^{2+}$ . Пробы инкубировали при 37 °С на водяной бане. Степень окислительной модификации ЛНП оценивали после 0,5, 1 и 2 часов их инкубации, определяя концентрацию МДА флуориметрическим методом на флуориметре Hitachi F-300. Статистическая обработка данных проведена с помощью прикладных программ SPSS (10.0).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

У больных ХП исходный уровень продуктов ПОЛ в ЛНП оказался практически в 1,5 раза выше, чем у лиц группы сравнения ( $p < 0,05$ ) и у больных ОП ( $p < 0,05$ ) (табл. 1). Также у больных ХП устойчивость ЛНП к окислению *in vitro* была в 1,2 раза ниже после 0,5 часа их инкубации с ионами меди по сравнению с соответствующими показателями у больных ОП ( $p < 0,05$ ). При анализе концентрации продуктов ПОЛ в ЛНП через 1 и 2 часа инкубации *in vitro* в присутствии ионов  $\text{Cu}^{2+}$  не было выявлено значимых различий между группами больных ОП и ХП, однако прослеживалась некоторая тенденция к увеличению всех показателей у больных ХП (табл. 1). Также у больных ХП устойчивость ЛНП к окислению после 0,5, 1 и 2 часов их инкубации с ионами меди была ниже, чем у больных группы сравнения ( $p < 0,01$ ).

Не было выявлено отличий в исходных уровнях продуктов ПОЛ в ЛНП и устойчивости ЛНП к окислению у лиц группы сравнения и у больных ОП и ХП различной этиологии (алкогольный, билиарный, идиопатический).

Нами была также проанализирована возможная ассоциация между интенсивностью болевого синдрома у всех обследованных больных ОП и ХП и активностью процессов ПОЛ. Было выявлено, что у больных ОП и ХП с частым или постоянным (2–4 раза в неделю) болевым синдромом в левом подреберье исходный уровень продуктов ПОЛ в ЛНП был значительно выше по сравнению с больными ОП и ХП с безболевым



формой течения ( $p < 0,012$ ) (табл. 2). Устойчивость ЛНП к окислению после 0,5, 1 и 2 часов их инкубации с ионами меди также была ниже у больных ОП и ХП с частым или постоянным болевым синдромом в левом подреберье ( $p < 0,01$ ) (табл. 2).

При оценке процессов ПОЛ у больных ОП и ХП с и без СД также были выявлены некоторые особенности (табл. 3). Исходный уровень продуктов ПОЛ в ЛНП не различался у всех обследованных больных ОП и ХП и в подгруппах больных ОП и ХП с и без СД. При этом устойчивость ЛНП к окислению была ниже у всех больных ОП и ХП с СД только через 2 часа их инкубации с ионами меди ( $p < 0,05$ ) по сравнению с группой больных ОП и ХП без СД. У больных ХП с СД устойчивость ЛНП к окислению после 0,5, 1 и 2 часов их инкубации с ионами меди была ниже по сравнению с соответствующими показателями у больных ОП и ХП без СД (во всех случаях  $p < 0,05$ ). Показатели устойчивости ЛНП к окислению у больных ОП с СД и у всех больных ОП и ХП без СД практически не различались (табл. 3).

Таким образом, избыточная активация реакций свободнорадикального окисления оказывает значительное влияние на возникновение воспалительных изменений в поджелудочной железе при ОП и ХП [1; 2; 7; 12]. Патогенетические механизмы воздействия свободных радикалов многообразны. При взаимодействии радикалов с липидами мембран формируются перекисные соединения с выраженной хемотактической активностью в отношении фагоцитов и других иммунокомпетентных клеток [1; 2], что поддерживает развитие возникшего воспалительного ответа [6; 7]. Также свободные радикалы как вторичные мессенджеры повышают экспрессию молекул адгезии в эндотелиальных клетках, приводя к тромбообразованию в капиллярах [13]. Показано значение увеличения активности процессов ПОЛ и истощения ресурсов антиоксидантной защиты при различных этиологических формах ОП и ХП [1; 2; 5; 7].

М. Podborska и соавт. (2009) оценили активность процессов ПОЛ у больных ХП различной этиологии и сравнили его с уровнем ПОЛ здоровых лиц и

Таблица 1

КОНЦЕНТРАЦИИ ПРОДУКТОВ ПОЛ В ЛНП СРАЗУ ПОСЛЕ ИХ ВЫДЕЛЕНИЯ ИЗ КРОВИ И ЧЕРЕЗ 1 И 2 ЧАСА ИНКУБАЦИИ <i>IN VITRO</i> В ПРИСУТСТВИИ ИОНОВ $Cu^{2+}$ В ГРУППЕ СРАВНЕНИЯ И У БОЛЬНЫХ ОП И ХП, $M \pm m$				
Группы пациентов	Продукты ПОЛ в ЛНП и устойчивость ЛНП к окислению, нмоль МДА/мг белка ЛНП			
	время инкубации ЛНП с ионами меди, часов			
	0	0,5	1	2
Сравнения ( $n = 7$ )	5,3 ± 0,8	16,8 ± 2,9	20,8 ± 3,7	22,1 ± 3,9
Хронический панкреатит ( $n = 39$ )	8,9 ± 1,5	21,8 ± 0,9	27,2 ± 1,1	29,4 ± 1,2
Острый панкреатит ( $n = 37$ )	5,0 ± 0,5	18,1 ± 1,5	24,7 ± 1,9	29,0 ± 1,9
$p_1$	< 0,05	< 0,1	< 0,1	< 0,1
$p_2$	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05
$p_3$	< 0,05	< 0,05	> 0,05	> 0,05

$p_1$  — достоверность различий между группами сравнения и больных ХП;

$p_2$  — достоверность различий между группами сравнения и больных ОП;

$p_3$  — достоверность различий между группами больных ОП и ХП.

Таблица 2

КОНЦЕНТРАЦИИ ПРОДУКТОВ ПОЛ В ЛНП СРАЗУ ПОСЛЕ ИХ ВЫДЕЛЕНИЯ ИЗ КРОВИ И ЧЕРЕЗ 1 И 2 ЧАСА ИНКУБАЦИИ <i>IN VITRO</i> В ПРИСУТСТВИИ ИОНОВ $Cu^{2+}$ У БОЛЬНЫХ ОП И ХП С РАЗЛИЧНЫМ КЛИНИЧЕСКИМ ТЕЧЕНИЕМ ЗАБОЛЕВАНИЯ, $M \pm m$				
Группы пациентов	Продукты ПОЛ в ЛНП и устойчивость ЛНП к окислению, нмоль МДА/мг белка ЛНП			
	время инкубации ЛНП с ионами меди, часов			
	0	0,5	1	2
Больные ОП и ХП с безболевым течением ( $n = 30$ )	5,0 ± 0,6	14,8 ± 1,5	19,1 ± 1,7	23,2 ± 1,9
Больные ОП и ХП с устойчивым болевым синдромом в левом подреберье ( $n = 46$ )	7,0 ± 0,6	22,0 ± 1,3	28,9 ± 1,7	31,7 ± 1,8
$p$	0,016	0,001	0,000	0,002

**КОНЦЕНТРАЦИИ ПРОДУКТОВ ПОЛ В ЛНП СРАЗУ ПОСЛЕ ИХ ВЫДЕЛЕНИЯ ИЗ КРОВИ  
И ЧЕРЕЗ 1 И 2 ЧАСА ИНКУБАЦИИ *IN VITRO* В ПРИСУТСТВИИ ИОНОВ  $\text{Cu}^{2+}$  У БОЛЬНЫХ ОП  
И ХП С И БЕЗ СД,  $M \pm m$**

Группы пациентов	Продукты ПОЛ в ЛНП и устойчивость ЛНП к окислению, нмоль МДА/мг белка ЛНП			
	время инкубации ЛНП с ионами меди, часов			
	0	0,5	1	2
Больные ОП и ХП без СД ( $n = 31$ )	$7,8 \pm 1,8$	$18,9 \pm 1,3$	$24,0 \pm 1,6$	$26,4 \pm 1,7$
Все больные ОП и ХП с СД 2-го типа ( $n = 45$ )	$6,3 \pm 0,5$	$20,6 \pm 1,2$	$27,3 \pm 1,4$	$31,1 \pm 1,4$
Больные ХП с СД 2-го типа ( $n = 21$ )	$7,7 \pm 0,6$	$22,7 \pm 1,1$	$28,8 \pm 1,3$	$31,4 \pm 1,3$
Больные ОП с СД 2-го типа ( $n = 24$ )	$5,1 \pm 0,7$	$18,8 \pm 2,0$	$26,1 \pm 2,4$	$30,8 \pm 2,4$
$p_1$	$> 0,05$	$> 0,05$	$> 0,05$	$< 0,05$
$p_2$	$> 0,05$	$< 0,05$	$< 0,05$	$< 0,05$
$p_3$	$> 0,05$	$> 0,05$	$> 0,05$	$> 0,05$

$p_1$  — достоверность различий между группами больных ОП и ХП с и без СД;

$p_2$  — достоверность различий между группами больных ХП с СД 2-го типа и больных ОП и ХП без СД;

$p_3$  — достоверность различий между группами больных ОП с СД 2-го типа и больных ОП и ХП без СД.

пришли к выводу, что окислительный стресс максимально выражен у больных ХП и может играть роль в иницировании и поддержании воспаления в ткани поджелудочной железы у больных ХП [5]. В исследовании R.S. Que и соавт. (2010) была продемонстрирована прямая корреляционная связь ( $r = 0,577$  соответственно;  $p < 0,001$ ) между уровнем окисления липидов крови с тяжестью течения ОП (по шкале АРАСНЕ II) [3]. По мнению S. Thareja и соавт. (2009), высокий уровень оксидативного стресса чаще всего выявляется на ранних фазах (первые 72 часа) ОП, поскольку затем включается мощная система антиоксидантной защиты, что значительно улучшает клиническое течение ОП [7]. В целом полученные данные свидетельствуют о том, что у больных ОП и ХП значительно нарушается антиоксидантный статус.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Маев И.В., Казюлин А.Н., Кучерявый Ю.А. Хронический панкреатит. — М.: Медицина, 2005. — 504 с.
2. Губергриц Н.Б., Христинич Т.Н. Клиническая панкреатология. — Донецк: Лебедь, 2000. — 416 с.
3. Que R.S., Cao L.P., Ding G.P. et al. Correlation of nitric oxide and other free radicals with the severity of acute pancreatitis and complicated systemic inflammatory response syndrome // *Pancreas*. — 2010. — Vol. 39, № 4. — P. 536–540.
4. Плеханов А.Н., Решетников Д.И., Товаришинов А.И. Роль интерлейкина-1 и продуктов перекисного окисления липидов в патогенезе острого панкреатита // *Мед. иммунол.* — 2009. — № 2–3. — С. 141–146.
5. Podborska M., Sevcikova A., Trna J. et al. Increased markers of oxidative stress in plasma of patients with chronic pancreatitis // *Neuro. Endocrinol. Lett.* — 2009. — № 30, Suppl. 1. — P. 116–120.
6. Escobar J., Pereda J., Arduini A. et al. Cross-talk between oxidative stress and pro-inflammatory cytokines in acute pancreatitis: a key role for protein phosphatases // *Curr. Pharm. Des.* — 2009. — Vol. 15, № 26. — P. 3027–3042.
7. Thareja S., Bhardwaj P., Sateesh J., Saraya A. Variations in the levels of oxidative stress and antioxidants during early acute pancreatitis // *Trop. Gastroenterol.* — 2009. — Vol. 30, № 1. — P. 26–31.

## ВЫВОДЫ

У больных ХП исходный уровень продуктов ПОЛ в ЛНП выше, чем у лиц группы сравнения и у больных ОП, а устойчивость ЛНП к окислению значительно ниже, чем у лиц группы сравнения.

У больных ОП и ХП с устойчивым болевым синдромом в левом подреберье исходный уровень продуктов ПОЛ в ЛНП значительно выше, а устойчивость ЛНП к окислению после 0,5, 1 и 2 часов их инкубации с ионами меди — ниже по сравнению с больными ОП и ХП с безболевым течением заболевания.

При сравнении со всеми обследованными больными ОП и ХП без СД только у больных ХП с сопутствующим СД 2-го типа было выявлено снижение устойчивости ЛНП к окислению через 0,5, 1 и 2 часа их инкубации с ионами меди.

8. Рагино Ю.И., Душкин М.И. Простой метод исследования резистентности к окислению гепариносажженных b-липопротеинов сыворотки крови // *Клин. лаб. диагн.* — 1998. — № 3. — С. 6–9.
9. Esterbauer H., Gebicki J., Puhl H., Jurgens G. The role lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL // *Free Radical Biol. Med.* — 1992. — Vol. 13. — P. 341–390.
10. WHO. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus // *Diab. Care.* — 1999. — Vol. 323, Suppl. 1. — S. 4–19.
11. Schuh J., Fairclough G.F., Haschemeyer R.H. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 1978. — Vol. 75. — P. 3173–3179.
12. Quilliot D., Walters E., Bonte J-P. et al. Diabetes mellitus worsens antioxidant status in patients with chronic pancreatitis // *Am. J. Clin. Nutr.* — 2005. — Vol. 81. — P. 1117–1125.
13. Fraticelli A., Serrano C.V., Bochner B.S. et al. Hydrogen peroxide and superoxide modulate leukocyte adhesion molecule expression and leukocyte endothelial adhesion // *Biochem. Biophys. Acta.* — 1996. — Vol. 1310. — P. 251–270.

