

УДК 577.112.854:577.125:577.152.31

*Н. М. ЛИТВИНКО¹, Л. А. СКОРОСТЕЦКАЯ¹, Т. Г. ГУДКО¹, М. М. ТИМОХОВА¹,
В. С. КАМЫШНИКОВ², Е. И. ВИЖИНИС², член-корреспондент А. В. ВОРОБЕЙ²*

СУПРАМОЛЕКУЛЯРНЫЙ КОМПЛЕКС ЖИРНОЙ КИСЛОТЫ С ГЕМОГЛОБИНОМ КАК ИНДИКАТОР ФОСФОЛИПОЛИЗА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ПАНКРЕАТИТА

¹Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь
al_h@mail.ru; lydias@tut.by; tatsianagudko@gmail.com

²Белорусская медицинская академия последипломного образования, Минск, Беларусь
kafdiag@mail.ru; kafdiag@mail.ru; Varabeiproct@tut.by

Проведено изучение супрамолекулярного комплекса жирной кислоты с гемоглобином как индикатора фосфолиполиза на разных стадиях экспериментального острого некротизирующего панкреатита. Установлено, что амплитуда разностного спектра гемоглобина в присутствии миристиновой, олеиновой и пальмитиновой кислот или их смеси зависит от длины углеводородной цепочки жирной кислоты и наличия в ней двойных связей. Обнаружено полное соответствие динамики изменения активности панкреатической фосфолипазы (ФЛА₂) патоморфологической картины развития патологии поджелудочной железы и ее лечения. Показано, что тест-система определения активности ФЛА₂ по измерению дифференциального спектра гемоглобина в диапазоне волн 403–423 нм, возникающего при образовании его супрамолекулярного комплекса с жирными кислотами, может использоваться для диагностики тяжелых форм некротизирующего панкреатита в качестве информативного лабораторного теста.

Ключевые слова: фосфолиполиз, фосфолипаза А₂, тест-система для фотометрического определения активности, жирные кислоты, гемоглобин, экспериментальная модель острого некротизирующего панкреатита, поджелудочная железа.

*N. M. LITVINKO¹, L. A. SKOROSTETSKAYA¹, T. G. GUDKO¹, M. M. TSIMOKHOVA¹,
V. S. KAMYSHNIKOV², E. I. VIZHINIS², V. A. VOROBEY²*

SUPRAMOLECULAR COMPLEX OF FATTY ACID WITH HEMOGLOBIN AS AN INDICATOR OF PHOSPHOLIPOLYSIS TO IDENTIFY EXPERIMENTAL PANCREATITIS

¹*Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus
al_h@mail.ru; lydias@tut.by; tatsianagudko@gmail.com*

²*Belarusian Medical Academy of Post-Graduate Education, Minsk, Belarus
kafdiag@mail.ru; kafdiag@mail.ru; Varabeiproct@tut.by*

The study of the supramolecular complex of fatty acid with hemoglobin as an indicator of phospholipolysis at different stages of experimental acute necrotizing pancreatitis was carried out. It is found that the amplitude of the differential spectrum of hemoglobin in the presence of myristic, oleic and palmitic acids or mixtures thereof depends on the length of hydrocarbon chains of fatty acids and on the presence of double bonds. Full compliance of the dynamics of changes in the phospholipase A₂ activity with a pathomorphological picture of the development of pathology of the pancreas and its treatment is found. It is shown that the test system for determining the activity of phospholipase A₂ through the measurement of the differential spectrum of hemoglobin in the wavelength range 403–423 nm during the formation of the supramolecular complex of hemoglobin with fatty acids can be used for the diagnosis of severe forms of necrotizing pancreatitis as an informative laboratory test.

Keywords: phospholipolysis, phospholipase A₂, test-system for photometric determination activity, fatty acid, hemoglobin, experimental model of acute necrotizing pancreatitis, the pancreas.

Введение. Проведение биохимических исследований на основе новых, принципиально отличающихся от традиционных, ферментативных средств тестирования воспалительных и деструктивных изменений в поджелудочной железе (ПЖ) при моделировании острого панкреатита (ОП) является актуальной задачей современной инженерной энзимологии, в частности энзимодиагностики [1]. Ее решение позволит своевременно выявлять степень структурно-функционального ущерба от феномена гиперферментемии, наблюдаемого в процессе развития ОП, и возможность

его компенсации; предотвратить формирование синдрома полиорганной недостаточности, при котором запускаются различные механизмы, реализующиеся на клиническом уровне в виде тяжелых, чаще всего гнойно-септических осложнений; непредсказуемый и зачастую неблагоприятный исход заболевания, его высокую летальность [2].

В Институте биоорганической химии НАН Беларуси разработана и предложена для диагностики воспалительных процессов желудочно-кишечного тракта оригинальная тест-система ФЛА₂-ФОА по выявлению липолитической активности в биологическом материале, основанная на реакции превращения гемоглобина в гемихром под действием жирной кислоты, отщепляемой фосфолипазой А₂ (КФ 3.1.1.4, ФЛА₂) от субстрата [3; 4]. Для проведения множественного анализа достаточно 50–100 мкл сыворотки крови [5]. Однако возможности тест-системы ФЛА₂-ФОА для оценки степени тяжести ОП не исследованы.

Цель работы – изучение супрамолекулярного комплекса жирной кислоты с гемоглобином как индикатора фосфолиполиза на разных стадиях экспериментального острого некротизирующего панкреатита (ОМП).

Выбор этой тест-системы в качестве индикатора ОМП обусловлен ее высокой специфичностью, быстротой проведения реакции, простотой в исполнении и небольшими объемами анализируемого материала [6].

Экспериментальная часть. Активность ФЛА₂ сыворотки крови крыс определяли по накоплению во времени продукта гидролиза экзогенно добавленного димиристоилфосфатидилхолина (ДМФХ, фирмы Sigma) – жирной кислоты, которая взаимодействовала с гемоглобином (Hb, фирмы Sigma) как индикатором фосфолиполиза. Об образовании супрамолекулярного комплекса жирной кислоты с гемоглобином судили по характерным изменениям его электронного спектра в области полосы Core.

Перед началом эксперимента на спектрофотометре Specord uv-vis (Германия) в режиме пропускания (T 75–125 %) в диапазоне 390–450 нм регистрировали нулевую линию, показывающую исходное состояние электронного спектра в момент полного тождества кювет с реакционной смесью, общим объемом по 2 мл в каждой, включающей 0,05 М трис-НСl-буферный раствор, 1 мМ CaCl₂, и сыворотку крови крыс (конечная концентрация – 10 мкл исходной сыворотки на 1 мл реакционной смеси). Для инициации реакции в опытную кювету спектрофотометра, содержащую сыворотку крови (в случае построения калибровочной кривой – жирную кислоту), соль кальция (кофактор) и Hb, добавляли 8 мМ раствор смешанных мицелл субстрата (ДМФХ) с дезоксихолатом натрия (ДОХ, соотношение 1/3,4 (моль/моль)). В контрольную кювету, также содержащую сыворотку крови, вместо субстрата добавляли буферный раствор. Кюветы на время реакции помещали в термостат (37 °С).

Дифференциальные спектры Hb характеризовали в единицах оптической плотности как разность поглощения (ΔD) в диапазоне длин волн 403–423 в опытной кювете против контрольной через 60 и 100 мин от начала реакции.

Активность ФЛА₂ выражали в международных единицах (МЕ/л) по формуле

$$\text{Акт (МЕ/л)} = 100\Delta D / kt \text{ (мин)},$$

где k – коэффициент линейного уравнения, найденный по калибровочному графику; t – время реакции (60 или 100 мин); ΔD – значение, полученное к этому времени; 100 – пересчет на 1 мл сыворотки.

По принятым критериям одна международная единица активности ФЛА₂ (МЕ/л) соответствует количеству мкмоль продукта (миристиновой кислоты), полученного при гидролизе субстрата (синтетического димиристоилфосфатидилхолина, ДМФХ) сывороточной ФЛА₂ за 1 мин.

Все полученные данные обрабатывали при помощи общепринятых методов вариационной биологической статистики с использованием критерия Стьюдента.

ОМП моделировали путем перевязки панкреатобилиарного протока у места впадения его в стенку двенадцатиперстной кишки крыс, производили забор крови для биохимического анализа степени фосфолиполиза через одни, двое и трое суток после лапаротомии и сравнивали с группой контрольных животных. Группу наблюдения составили 70 экспериментальных животных

(крысы). Три группы животных получали лечение ОП ксефокамом, лизином-эсцинатом, лейкоцимом [1].

Результаты и их обсуждение. Повышение уровня панкреатической фосфолипазы A_2 (КФ 3.1.1.4., ФЛА₂ IB) при патологии желудочно-кишечного тракта считается идеальным показателем деструктивных процессов ПЖ, поэтому определение в крови ее активности (концентрации) является объективным маркером диагностики панкреатитов [7].

Ранее нами показано, что во время образования супрамолекулярного комплекса гемоглобина с ЖК в процессе фосфолиполиза происходит превращение гемопротеина в окисленную низкоспиновую форму – гемихром, интенсивность возникающего дифференциального спектра которого прямо пропорциональна концентрации жирной кислоты в пробе и, следовательно, активности панкреатической ФЛА₂ [8].

Каждый дифференциальный спектр Нб характеризовался максимумом ($\lambda = 423$), минимумом ($\lambda = 403$) и расстоянием между ними (ΔT). Единицы пропускания ΔT переводили в единицы поглощения ΔD по формуле $\Delta D = 2 - \lg(100 - T / 3)$. Откладывая по оси абсцисс время взаимодействия гемоглобина с ЖК, отщепленной от субстрата ФЛА₂, а по оси ординат значение ΔD , получали кинетическую кривую, отражающую накопление продукта за единицу времени ($V_0 = \Delta P / \Delta t$), т. е. начальную скорость реакции, и характеризующуюся определенным тангенсом угла наклона. Повышение концентрации фермента в реакционной смеси приводило к возрастанию угла наклона кинетической кривой (тангенса), т. е. увеличению скорости реакции [5; 8] (рис. 1).

Имеются данные, что воспалительный процесс в желудочно-кишечном тракте, развивавшийся в результате экспериментального перитонита у крыс, сопровождается высвобождением из фосфолипидов под действием ФЛА₂, главным образом, миристиновой (МК, С14 : 0), пальмитиновой (ПК, С16 : 0) и олеиновой (ОК, 18 : 1) кислот [9]. Поэтому именно эти ЖК исследовали в качестве компонента супрамолекулярного комплекса с гемоглобином и стандарта для калибровочных кривых при создании оптимальных условий использования тест-системы ФЛА₂-ФОА для оценки воспалительного процесса при моделировании экспериментального ОНП.

Обнаруженные различия в величине тангенса угла наклона кривых, отражающих изменение ΔD ($D_{403-423} = D_{1(403)} + D_{2(423)}$) в ответ на внесение мицелл субстрата с разными встроенными жирными кислотами, свидетельствовали о том, что амплитуда разностного спектра Нб зависит от длины углеводородной цепочки ЖК и наличия в ней двойных связей (рис. 2, а).

До сих пор считалось, что наибольший эффект на спектральные изменения Нб оказывала ОК [10]. Однако это преимущество нивелировалось способностью ОК подвергаться перекисному окислению вследствие имеющейся ненасыщенной связи, что могло вносить фактор нестабильности в тест-систему. По полученным нами данным максимальное воздействие на спектральные изменения Нб оказывала смесь ОК и ПК в соотношении соответственно 60 и 40 % (моль/моль), характерном для природного ФХ (рис. 2, а). В случае использования ПК обнаружилась ее склонность к агрегированию. МК – кислота с самой короткой углеводородной цепочкой, хотя и характеризовалась меньшей величиной тангенса угла наклона кинетической кривой, но наблюдаемый

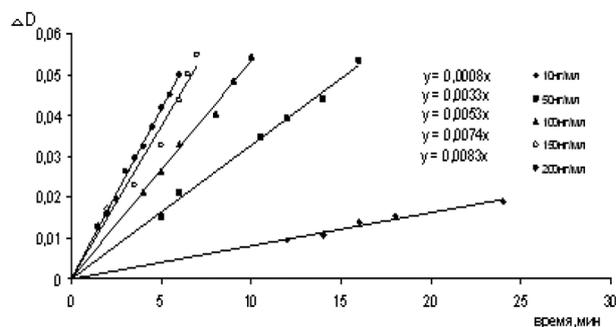


Рис. 1. Кинетика липолитической реакции при различных концентрациях фермента в условиях инициации реакции субстратом. Условия реакции: [ФХ] = 0,1 мМ; [ДОХ] = 0,3 мМ; [Нб] = 5 мкМ; [Ca²⁺] = 1 мМ; 0,05М Трис-НСl буферный раствор, pH 8,0, *t* комн.

линейный прирост ΔD охватывал более широкий диапазон концентраций, что обуславливало выбор в качестве субстрата ДМФХ.

При встраивании в межфазную поверхность смеси жирных кислот в соотношении 60 % ОК и 40 % ПК (моль/моль), наряду со значительным увеличением интенсивности разностного спектра Нб в области полосы Сор_e, в отличие от другого продукта фосфолиполиза – лизофосфатидилхолина (ЛФХ), наблюдается сдвиг частоты («голубой сдвиг»), что в совокупности является физической основой при обнаружении панкреатита, диагностируемого по спектрофотометрическому измерению уровня ФЛА₂ в крови (рис. 2, б).

Добавление липидных эффекторов (ФХ, ЛФХ, ЖК) к гемоглобину практически не сказывается на поглощении Нб в области минимума дифференциального спектра при $\lambda = 405$ нм (рис. 3, а).

Измерение поглощения Нб в области максимума при длине волны 423 нм обнаруживает существенное увеличение оптической плотности в присутствии жирной кислоты (рис. 3, б). Это позволяет перейти от использования импортного спектрофотометра Spesord uv-vis к однолучевому отечественному спектрофотометру Solar PV 1251 С – традиционному прибору клинических диагностических лабораторий для выявления образования супрамолекулярного комплекса Нб с ЖК.

Проведенные патоморфологические исследования свидетельствовали о поэтапном развитии ОНП подобно происходящему в организме больного человека: отек, инфильтрация, некроз (рис. 4).

Увеличение по сравнению с контролем (рис. 5, столбик 1) активности ФЛА₂ в крови крыс после лапаротомии (рис. 5, столбик 2), дальнейшее ее повышение при развитии ОНП (рис. 5, столбик 3) и снижение до исходных величин при действии лекарственных средств (рис. 5, столбики 4–6) обнаружили полное соответствие динамики изменения активности ФЛА₂ морфологической картине развития патологии ПЖ (рис. 4) и ее лечения [1].

Исследование активности ФЛА₂ показало, что, в среднем, статистически достоверная ($p < 0,05$) активация ФЛА₂ наблюдается на первые (47,7 МЕ/л) и вторые (53,4 МЕ/л) сутки после моделирования ОП при контрольных значениях – 15,2 МЕ/л. Сыворотка крови отдельных особей характеризовалась максимальным увеличением активности ФЛА₂ на вторые сутки до 97,4 МЕ/л, что соответствовало данным об увеличении в 2–20 раз активности панкреатической ФЛА₂ в крови крыс с экспериментальным ОП [11].

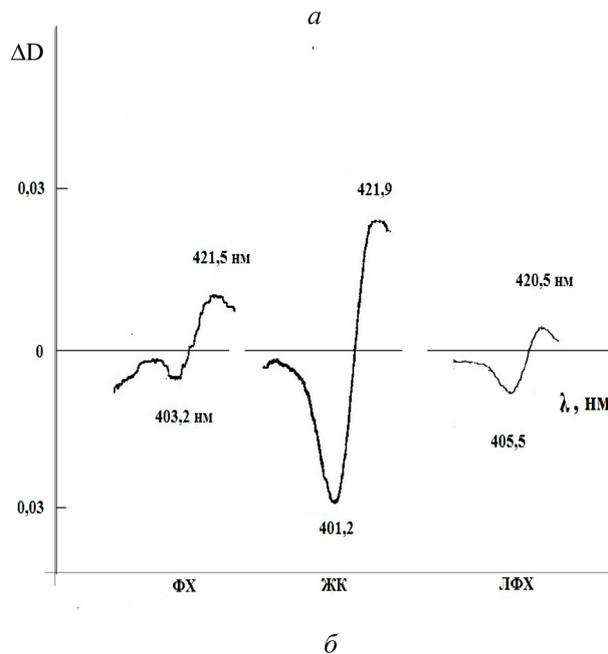
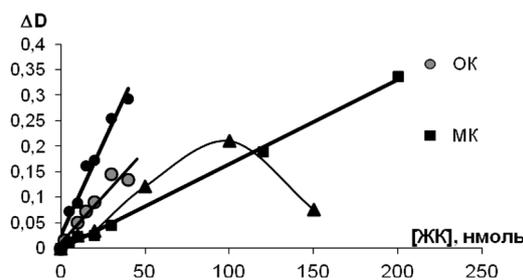
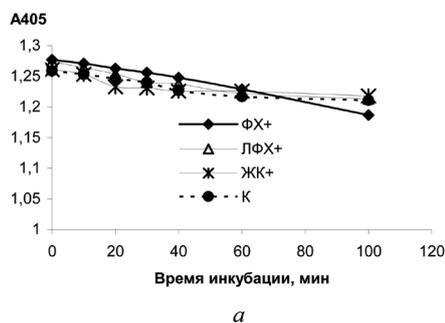


Рис. 2. Зависимость ΔD дифференциального спектра гемоглобина от концентрации жирной кислоты. Условия реакции: [ФХ] = 0,1 мМ, [ДОХ] = 0,3 мМ, [Нб] = 5 мкМ, $[Ca^{+2}] = 1$ мМ, $t = 37$ °С (а); «голубой сдвиг» (б) экстремума и увеличение интенсивности разностного спектра Нб в области полосы встраивания в межфазную поверхность смеси жирных кислот (ЖК = 60 % ОК + 40 % ПК, моль/моль) в соотношении, характерном для природного фосфатидилхолина (ФХ) яичного желтка

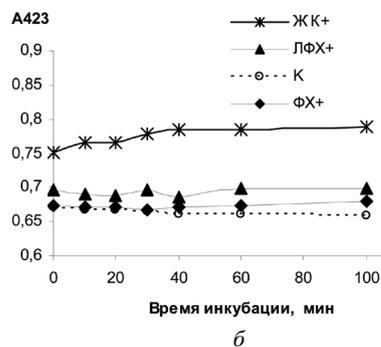


Рис. 3. Изменение интенсивности поглощения гемоглобина в области минимума (403 нм, а) и максимума (423 нм, б) дифференциального спектра под влиянием ФХ и продуктов его ферментативного гидролиза, измеренных на однолучевом отечественном спектрофотометре Solar PV 1251 С

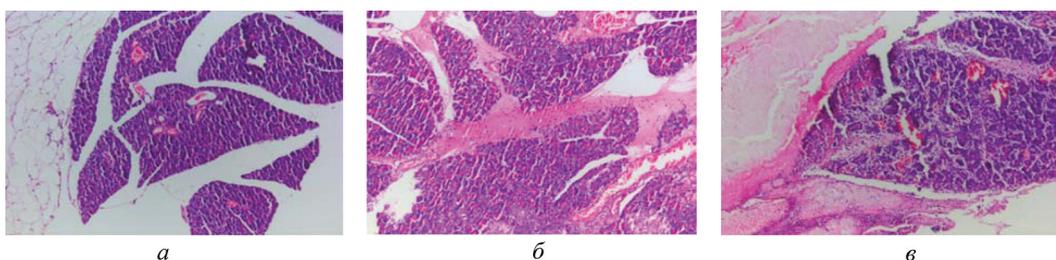


Рис. 4. Морфологическая картина неизменной ПЖ (*а*); после лигирования билиопанкреатического протока: через сутки (*б*) и трое суток (*в*). Имеется интерстициальный отек, лейкоцитарная инфильтрация, нарушение кровоснабжения. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение 200

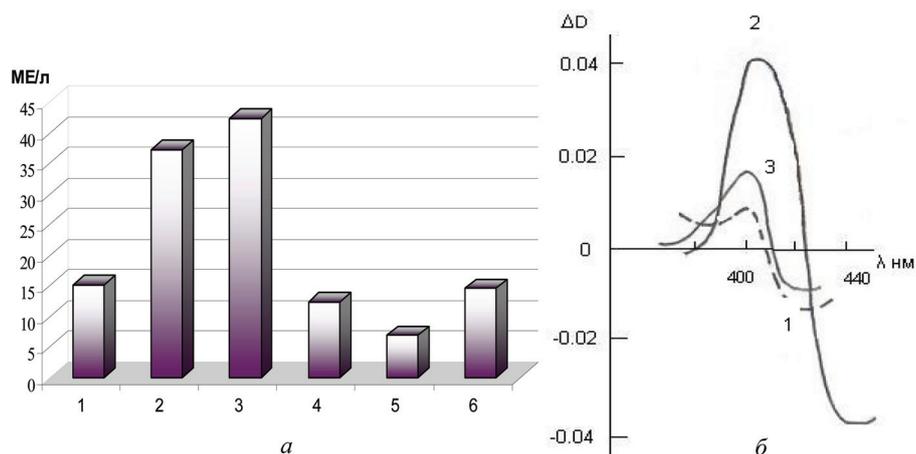


Рис. 5. *а* – Активность ФЛ_{А₂} в сыворотке крови крыс: интактные животные (*1*); в день лапаротомии (*2*); экспериментальный панкреатит (*3*); после лечения ксефокамом (*4*); лизином-эсцинатом (*5*); лейкоцимом (*6*). Представлены средние данные за трое суток. Изменения достоверны по отношению к контролю ($p < 0,05$);

б – Дифференциальные спектры, полученные для интактных животных (*1*), животных с экспериментальным панкреатитом (*2*) и после лечения ксефокамом (*3*). Условия реакции: [ДМФХ] = 0,039 мМ, [ДОХ] = 0,136 мМ, [Hb] = 5 мкМ, [Ca²⁺] = 1 мМ, 10 мкл сыворотки крови крыс/мл реакционной смеси, время реакции 100 мин, $t = 37^{\circ}\text{C}$

Полученные результаты позволили установить существенную особенность динамики изменения активности ФЛ_{А₂}, кардинально отличающую таковую от динамики изменения показателей других общепринятых лабораторных тестов диагностики острого панкреатита [1] и служащую научным обоснованием использования теста определения активности ФЛ_{А₂} для выявления процессов деструкции в поджелудочной железе. Панкреатическая ФЛ_{А₂} как фермент, гидролизующий фосфолипиды – основную составляющую биологической мембраны, при гиперактивации отражает поражение мембран клеток, вызванное некробиотическим процессом, тогда как все остальные ферментативные (и многие неферментативные) тесты – преимущественно общий отклик организма на развитие воспалительного процесса в поджелудочной железе [1]. В пользу данного объяснения свидетельствует и то, что положительный лечебный эффект оказали те испытанные в ходе настоящей работы лекарственные препараты, под влиянием которых у животных не наблюдалось увеличения активности ФЛ_{А₂} (рис. 5, столбики 4–6) в динамике развития некротизирующего панкреатита. Это служит научным обоснованием возможности дальнейшего использования в медицинской практике нового метода диагностики панкреатита – определения активности ФЛ_{А₂}, оказавшей выраженный эффект в опытах на животных.

Заключение. Результаты экспериментальных исследований показали реальную возможность использования разработанной тест-системы определения активности ФЛ_{А₂}, реализуемого с применением созданного набора реагентов ФЛ_{А₂}-ФОА, в клинко-лабораторной практике в процессе дифференциальной диагностики тяжелых форм некротизирующего панкреатита в качестве информативного лабораторного теста.

Уникальный принцип работы набора реагентов ФЛ_{А₂}-ФОА – развитие дифференциального спектра гемоглобина в диапазоне волн 403–423 нм, возникающего при образовании его супрамо-

лекулярного комплекса с жирными кислотами, отщепляемыми под действием ФЛА₂ от субстрата (мицеллы димиристоилфосфатидилхолина и дезоксихолата натрия), позволяет регистрировать спектральные изменения не только на двухлучевом приборе Specord uv-vis, но и адекватно при одной длине волны 423 нм в области максимума на однолучевом спектрофотометре Solar отечественного производства, что значительно облегчит проведение биохимического анализа и обеспечит раннюю диагностику ОП.

Список использованной литературы

1. Значимость исследования активности фосфолипазы А₂ как биомаркера процессов деструкции поджелудочной железы при остром некротизирующем панкреатите / В. А. Воробей [и др.] // Лаб. диагн. – 2015. – № 3–4 (15–16). – С. 104–113.
2. Острый панкреатит: пособие для врачей / М. И. Филимонов [и др.]; под ред. акад. РАН и РАМН В. С. Савельева. – М., 2000.
3. Способ определения активности фосфолипазы А₂ в сыворотке крови: пат. 12552 Республики Беларусь: МПК (2006) С 12Q 1/34 / Н. М. Литвинко, Л. А. Скоростецкая, С. В. Кучуро, Г. Н. Рахуба, дата публ.: 30.10.2009.
4. Способ диагностики панкреатита по уровню А₂ фосфолипазной активности сыворотки крови: пат. 13143 Республики Беларусь: МПК (2009), А 61В 5/145, С 12Q 1/34 / Н. М. Литвинко, Л. А. Скоростецкая; дата публ.: 30.04.2010.
5. Разработка отечественных тест-систем нового поколения для фотометрического определения активности панкреатической фосфолипазы А₂ в крови / Н. М. Литвинко [и др.] // ARS Medica. – 2011. – № 13(49). – С. 66–75.
6. Разработка и освоение новой биохимической тест-системы для выявления воспалительных процессов желудочно-кишечного тракта с использованием ключевых ферментов-маркеров / Н. М. Литвинко [и др.] // Наука – инновационному развитию общества / Нац. акад. наук Беларуси; редкол.: В. Г. Гусаков [и др.]. – Минск: Беларуская навука, 2014. – С. 218–228.
7. Nevalainen, N. J. The role of phospholipase A₂ in human acute pancreatitis / N. J. Nevalainen // Klin. Wochenschr. – 1989. – Vol. 67. – P. 180–182
8. Апробация новой тест-системы в модельных экспериментах на клиническом материале / Н. М. Литвинко [и др.] // Лаб. диагн. – 2014. – № 4 (12). – С. 49–56.
9. Осочук, С. С. Изменения липидной композиции микросом печени крыс при экспериментальном перитоните / С. С. Осочук, Н. Ю. Коневалова // Новости хирургии. – 2006. – Т. 14, № 2. – С. 2–6.
10. Андреев, Г. М. Превращение гемоглобина в гемихром при взаимодействии со свободными жирными кислотами: автореф. дис. ... канд. хим. наук: (02.00.10) / Г. М. Андреев; АН БССР, Ин-т биорган. химии. – Минск, 1988.
11. Pathophysiological role of secretory type I and II phospholipase A₂ in acute pancreatitis: an experimental study in rats / W. Uhl [et al.] // Gut. – 1997. – Vol. 40, N 3. – P. 386–392.

Поступило в редакцию 31.12.2015