

ДУ “ІНСТИТУТ ГАСТРОЕНТЕРОЛОГІЇ НАМН УКРАЇНИ”

На правах рукопису

МАКАРЧУК Вікторія Анатоліївна

УДК 611.88+612.015.348+616.37-002

**ОСОБЛИВОСТІ РОЗПОДІЛУ НЕЙРОСПЕЦИФІЧНИХ БІЛКІВ
ЦЕНТРАЛЬНОЇ ТА ПЕРИФЕРИЧНОЇ НЕРВОВОЇ СИСТЕМИ ПРИ
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ХРОНІЧНОМУ ПАНКРЕАТИТІ**

Спеціальність 03.00.04 – біохімія

Д и с е р т а ц і я

на здобуття наукового ступеня

кандидата біологічних наук

Науковий керівник:

Ушакова Г.О.

доктор біологічних наук, професор

Дніпропетровськ – 2015

ЗМІСТ

	Стор.
ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ.....	5
ВСТУП.....	7
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	13
1.1. Біохімічні механізми патогенезу хронічного панкреатиту.....	13
1.2. Енцефалопатія за умов порушення функції підшлункової залози....	31
1.3. Значення нейроспецифічних білків та гіалуронат-зв'язуючої активності білків міжклітинного матриксу за умов хронічного панкреатиту та ендотоксемії.....	36
РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	44
2.1. Матеріали дослідження.....	44
2.2. Моделювання хронічного панкреатиту у щурів.....	46
2.3. Методика тестування тварин у “відкритому полі”	48
2.4. Методи визначення біохімічних показників крові.....	49
2.4.1. Визначення активності ферментів підшлункової залози в плазмі крові.....	49
2.4.2. Визначення ліпідів в плазмі крові.....	50
2.4.3. Визначення глюкози в плазмі крові.....	51
2.4.4. Визначення показників окисного стресу та системи антиоксидантного захисту в крові.....	51
2.4.5. Визначення молекул середньої маси в плазмі крові.....	53
2.4.6. Визначення показників фіброзу підшлункової залози в плазмі крові.....	53
2.4.7. Визначення церулоплазмину в плазмі крові.....	55
2.5. Морфологічні методи дослідження підшлункової залози.....	55
2.6. Визначення загальної кількості білка за методом Бредфорд.....	66
2.7. Методика визначення нейроспецифічних білків.....	57
2.8. Методика визначення гіалуронат-зв'язуючої активності білків.....	58

2.9. Статистична обробка результатів.....	60
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	61
3.1. Зміни біохімічних показників крові у щурів за умов експериментального панкреатиту.....	61
3.1.1. Зміни активності ферментів підшлункової залози у крові щурів за умов експериментального панкреатиту.....	61
3.1.2. Зміни вмісту ліпідів у крові щурів за умов експериментального панкреатиту.....	62
3.1.3. Зміни вмісту глюкози у крові щурів за умов експериментального панкреатиту.....	64
3.1.4. Зміни показників ліпопероксидації та системи антиоксидантного захисту у крові щурів за умов експериментального панкреатиту.....	65
3.1.5. Зміни рівня ендогенної інтоксикації у крові щурів за умов експериментального панкреатиту.....	71
3.1.6. Зміни показників фіброзу підшлункової залози у крові щурів за умов експериментального панкреатиту.....	75
3.1.7. Зміни вмісту церулоплазмину у крові щурів за умов експериментального панкреатиту.....	78
3.1.8. Зміни поведінкових реакцій щурів за умов експериментального панкреатиту.....	79
3.1.9. Морфологічні зміни в підшлунковій залозі за умов експериментального панкреатиту.....	85
3.2. Розподіл нейроспецифічних білків і рівня гіалуронат-зв'язуючої активності білків головного мозку та підшлункової залози щурів з умов розвитку хронічного панкреатиту.....	91
3.2.1. Розподіл нейрональної молекули клітинної адгезії НМКА в головному мозку та підшлунковій залозі щурів за умов розвитку хронічного панкреатиту.....	91
3.2.2. Вміст астрогліальних білків в головному мозку та	

підшлунковій залозі за умов розвитку хронічного панкреатиту.....	94
3.2.3. Рівень гіалуронат-зв'язуючої активності білків головного мозку та підшлункової залози щурів за умов розвитку хронічного панкреатиту.....	98
РОЗДІЛ 4. УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ.....	104
ВИСНОВКИ.....	141
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	143

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

CD	– кластер диференціації
Hb	– гемоглобін
RAGE	– рецептор до кінцевих продуктів глікірування
RHAMM	– рецептор для гіалуронат-опосередкованої рухливості
SH	– тіольна група
SS	– дисульфідний зв'язок
α -ГМА	– α -гладком'язовий актин (α -SMA)
A3KG2	– переносник аденозинтрифосфат-зв'язуючих касет субсімейства G член 2
АОЗ	– антиоксидантний захист
АФА	– активні форми азоту
АФК	– активні форми кисню
GSH	– відновлений глутатіон
ГАГ	– глікозаміноглікан
ГЕБ	– гематоенцефалічний бар'єр
ГЗАБ	– гіалуронат-зв'язуюча активність білків
ГК	– гіалуронова кислота
ГФКП	– гліальний фібрилярний кислий протеїн
ЗБ	– загальний білок
ЗФР	– забуферений фізіологічний розчин
ІкВ	– інгібіторний протеїн кВ
ІІ	– інтерлейкін
ІСПТК-1	– інгібітор серинової протеази типу 1 Kazal (SPINK)
КІФ	– комп'ютерний індекс фіброзу
МАПК	– мітоген-активована протеїнкіназа (МАРК)
ММП	– матриксна металопротеїназа
МСМ	– молекули середньої маси
НАДФН	– нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат

НМКА	– нейрональна молекула клітинної адгезії
НФ-кВ	– нуклеарний фактор транскрипції “каппа-бі”
ОПб/зв	– оксипролін білковозв’язаний
ОПв	– оксипролін вільний
ПЗК	– панкреатичні зірчасті клітини
ПОЛ	– пероксидне окиснення ліпідів
ТДС	– тіол-дисульфідне співвідношення
ТІМП	– тканинний інгібітор матричної металопротеїнази
ТФР- β	– трансформуючий фактор росту β
ЦНС	– центральна нервова система
ФНП- α	– фактор некрозу пухлин- α (TNF- α)
ФРТ	– фактор росту тромбоцитів

ВСТУП

На сьогоднішній день в Україні спостерігається поступове збільшення кількості хворих на хронічний панкреатит. В структурі захворювань органів травлення ця патологія становить 9%, приріст показника поширеності за останні 8 років склав 56,8% [58]. Біохімічні порушення метаболізму у підшлунковій залозі та організмі в цілому зумовлюють розвиток цього захворювання, його прогресування і викликають больові відчуття [86]. Незважаючи на численні дослідження, біохімічні механізми патогенезу панкреатиту потребують глибокого вивчення. Їх пояснення дасть можливість розробити нові рекомендації для покращення існуючих методів лікування цього захворювання [163, 197].

В результаті пошкодження клітин підшлункової залози (панкреатитів) відбувається активація панкреатичних зірчастих клітин, які відіграють важливу роль в фіброгенезі даного органу [86, 203].

Вивільнення при панкреатиті в системний кровоплин продуктів вільнорадикального окиснення та ендотоксинів зумовлює розвиток ендогенної інтоксикації, що є підґрунтям для розвитку панкреатичної енцефалопатії [1, 64, 107, 179, 198]. Зростання активності панкреатичних ферментів у крові при гострому панкреатиті призводить до зміни проникності гематоенцефалічного бар'єра (ГЕБ) та викликає пошкодження структур головного мозку [182]. Основна частина ендогенних токсинів належить до молекул середньої маси (МСМ), багато з яких мають нейротоксичну активність, викликають зміни проникності ГЕБ [23, 77]. Нейропатія пов'язана зі зміною гемодинаміки, метаболічного статусу, розладами водного чи електролітного балансу, виділенням прозапальних цитокінів та прямою нейротоксичною дією фосфоліпази А2 [82].

Дія ендотоксинів направлена на нейрони та астроцитарні клітини, викликаючи біохімічні та морфологічні зміни в них. Потребує дослідження розподіл нейрональної молекули клітинної адгезії (НМКА), астрогліального Ca^{2+} -зв'язуючого білка S-100b та гліального фібрилярного кислого протеїну

(ГФКП) у відділах мозку за умов хронічного панкреатиту. НМКА представляє собою глікопротеїн, що опосередковує гомофільну взаємодію між сусідніми клітинами і гетерофільну – між клітинами та компонентами позаклітинного матриксу [94]. S-100b – високочутливий біохімічний маркер ушкодження головного мозку і може сигналювати про активацію клітин глії, порушення функціонування нейронів [104, 164]. ГФКП – основний білок проміжних філаментів зрілих астроцитів, який регулює структуру їхнього цитоскелета [181, 217].

На сьогодні залишається нез'ясованим характер перерозподілу адгезивних, астрогліальних білків та загальної гіалуронат-зв'язуючої активності білків (ГЗАБ) міжклітинного матриксу в різних відділах головного мозку і підшлунковій залозі та їхня роль у процесах, що супроводжують розвиток енцефалопатії при хронічному панкреатиті.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконувалася в лабораторії біохімії ДУ “Інститут гастроентерології НАМН України” в межах науково-дослідної роботи “Вивчити механізми розвитку фібротичних процесів при хронічному панкреатиті та удосконалити технології їх хірургічної корекції” (номер державної реєстрації 0111U001065, 2011–2013 рр.) та відповідно до плану науково-дослідної роботи Дніпропетровського національного університету імені Олеся Гончара в рамках держбюджетної теми “Використання природних антиоксидантів та продуктів нанотехнологій в якості нейропротекторів за умов несприятливого впливу навколишнього середовища та метаболічних порушень” (номер державної реєстрації 0113U003041, 2013–2014 рр.).

Мета і завдання дослідження. Мета роботи – визначити розподіл нейроспецифічних білків та гіалуронат-зв'язуючої активності білків міжклітинного матриксу при енцефалопатії за умов експериментального панкреатиту.

Для досягнення поставленої мети були сформульовані наступні завдання:

1. Визначити у крові щурів з гострим та хронічним панкреатитом активність α -амілази, ліпази та трипсину, вміст тригліцеридів, холестеролу, глюкози, церулоплазміну, показників фіброзу, окисного стресу та антиоксидантного захисту, а також провести морфологічне дослідження структури підшлункової залози.
2. Визначити вміст молекул середньої маси як показника ендогенної інтоксикації у крові щурів за умов розвитку панкреатиту.
3. Дослідити розподіл нейрональної молекули клітинної адгезії у мозочку, гіпокампі та таламусі, а також у підшлунковій залозі щурів за умов розвитку панкреатичної енцефалопатії.
4. Проаналізувати розподіл S-100b та гліального фібрилярного кислого протеїну у мозочку, гіпокампі та таламусі, а також у підшлунковій залозі щурів за умов розвитку панкреатичної енцефалопатії.
5. Провести дослідження рівня гіалуронат-зв'язуючої активності білків міжклітинного матриксу у мозочку, гіпокампі та таламусі, а також у підшлунковій залозі щурів за умов розвитку панкреатичної енцефалопатії.

Об'єкт дослідження – біохімічні механізми патогенезу панкреатиту та їхня роль у розвитку панкреатичної енцефалопатії.

Предмет дослідження – біохімічні параметри крові (активність панкреатичних ферментів, вміст тригліцеридів, холестеролу, глюкози, церулоплазміну), показники фіброзу, ендогенної інтоксикації, окисного стресу та антиоксидантної системи, морфологічні зміни підшлункової залози, рівень нейрональних та гліальних білків і біохімічних компонентів міжклітинного матриксу.

Методи дослідження – біохімічні (фотоелектроколориметричні, спектрофотометричні, твердофазний імуно- та вуглевод-ферментний аналіз), морфологічні (гістохімічні, комп'ютерна морфометрія), патофізіологічні

(експериментальна модель панкреатиту шляхом хірургічної оклюзії), фізіологічні (тестування поведінкових реакцій) та статистичні методи дослідження.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше отримано дані щодо розподілу НМКА, білка S-100b, ГФКП та загальної ГЗАБ із різних відділів мозку та підшлункової залози щурів за умов панкреатичної енцефалопатії. Вперше встановлено, що розвиток даної патології за умов тривалої оклюзії панкреатичної протоки пов'язаний, по-перше, з підвищенням рівня S-100b в гіпокампі на 78%, в таламусі – на 60% і одночасним зниженням вмісту філаментної форми ГФКП (фГФКП) в мозочку на 18%, в гіпокампі – на 44% та в таламусі – на 42%; по-друге, з різноспрямованими змінами вмісту мембранної НМКА (мНМКА): зниженням в мозочку на 46% та підвищенням в таламусі на 34%; по-третє, зі зниженням гіалуронат-зв'язуючої активності мембранних білків у мозочку на 41% та у таламусі на 23% і зростанням у гіпокампі на 60%. При розвитку хронічного панкреатиту в екстракті із підшлункової залози встановлено підвищення рівня S-100b на 120%, зниження розчинної ГФКП (рГФКП) на 42%, а фГФКП – на 19% та підвищення гіалуронат-зв'язуючої активності мембранних білків на 35%, що вказує на порушення іннервації досліджуваного органу.

Практичне значення одержаних результатів. Отримані результати значно доповнюють сучасні уявлення щодо біохімічних механізмів розвитку панкреатичної енцефалопатії. Встановлені закономірності співвідношення адгезивних, астрогліальних білків та загальної гіалуронат-зв'язуючої активності білків міжклітинного матриксу в різних відділах мозку та підшлунковій залозі щурів мають загальнотеоретичне та практичне значення для визначення ролі НМКА, S-100b, ГФКП та ГЗАБ нервової тканини в механізмах патогенезу панкреатичної енцефалопатії. Сформульовані рекомендації щодо підвищення ефективності виявлення фіброзних змін в підшлунковій залозі: визначено інтервали коефіцієнтів співвідношення

оксипроліну білково зв'язаного (ОПб/зв) до оксипроліну вільного (ОПв; кОПб/зв / кОПв) для характеристики стадій панкреатиту (отримано патент України №90510, опублікований 26.05.14 р., бюлетень №10). Результати досліджень впроваджені в науково-дослідну діяльність студентів, аспірантів і здобувачів Дніпропетровського національного університету імені Олеся Гончара.

Особистий внесок здобувача. У всіх серіях досліджень дисертант безпосередньо брала участь, виконала весь обсяг експериментальної роботи, статистичну обробку результатів, здійснила пошук і аналіз джерел наукової літератури згідно з тематикою кандидатської дисертації. Автор приймала участь у підготовці публікацій до друку. Морфологічні дослідження виконано в лабораторії патофізіології ДУ “Інститут гастроентерології НАМН України” спільно із завідувачем лабораторії д.б.н. Ю.А. Гайдаром. Планування експериментальної роботи, аналіз та обговорення результатів, формулювання основних положень, які виносяться на захист, а також висновків проведено спільно з науковим керівником, завідуючою кафедри біофізики та біохімії Дніпропетровського національного університету імені Олеся Гончара, професором, д.б.н. Г.О. Ушаковою.

Апробація результатів дисертації. Матеріали, викладені в дисертаційній роботі, були представлені на III Міжнародній науково-практичній конференції “Современные проблемы биологии, экологии и химии” (м. Запоріжжя, 11–13 травня 2012 р.), X International Interdisciplinary Scientific Conference of Students and young Scientists “Shevchenkivska Vesna 2012: Life Sciences” (м. Київ, 19–23 березня 2012 р.), Науково-практичній конференції “Сучасні теоретичні та практичні аспекти клінічної медицини” (м. Одеса, 19–20 квітня 2012 р.), V Українському гастроентерологічному тижні (м. Дніпропетровськ, 19–21 вересня 2012 р.), Конференції молодих вчених, присвяченій 20-річчю НАМН України (м. Київ, 5 березня 2013 р.), XVI та XVII Міжнародних медичних конгресах студентів і молодих вчених (м. Тернопіль, 25–27 квітня 2012 р., 22–24 квітня 2013 р.), II Міжнародній

науковій конференції “Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології” (м. Дніпропетровськ, 24–25 вересня 2013 р.), VI Конгресі Українського товариства нейронаук (м. Київ, 4–8 червня 2014 р.), I і II Наукових сесіях ДУ “Інститут гастроентерології НАМН України” (м. Дніпропетровськ, 20–21 червня 2013 р., 19–20 червня 2014р.), XI Українському біохімічному конгресі (м. Київ, 6–10 жовтня 2014 р.).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 18 робіт, серед яких 7 статей (6 – у вітчизняних фахових виданнях, 1 – у зарубіжному виданні) та 10 тез доповідей у матеріалах наукових з’їздів, вітчизняних та міжнародних конференцій, а також отриманий патент на корисну модель.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається зі вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів дослідження, результатів дослідження та їхнього обговорення, узагальнення отриманих результатів, висновків, списку використаної літератури, що нараховує 218 посилань. Робота викладена на 168 сторінках комп’ютерного тексту, з них основна частина – 135 сторінок, містить 48 рисунків та 2 таблиці.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Біохімічні механізми патогенезу хронічного панкреатиту

За даними офіційної статистики МОЗ України у 2013 р. показник вперше встановлених діагнозів хронічного панкреатиту становив 195,7 випадків на 100 тис. населення [54]. За останні роки в Україні спостерігається поступове збільшення кількості таких хворих. В структурі захворювань органів травлення ця патологія становить 9%, приріст показника поширеності за останні 8 років (2006–2013 рр.) склав 56,8% [58].

Панкреатит проявляється в гострій або хронічній формі. Гострий панкреатит виникає раптово і є короткотривалим, в той час як хронічний панкреатит розвивається поступово і його перебіг погіршується з часом [101]. Хронічний панкреатит призводить до прогресуючої та незворотної деструкції тканини підшлункової залози. Біохімічні і морфологічні зміни відзначаються на кожній стадії захворювання. Періодичні епізоди гострого панкреатиту призводять до патологічного фіброзування із втратою екзокринної та ендокринної функцій органу, в результаті чого порушуються процеси травлення, розвивається діабет виникають сильні больові відчуття [142].

Фактори ризику для розвитку хронічного панкреатиту визначаються за системою класифікації TIGAR-O (Toxic Idiopathic Genetic Autoimmune Recurrent Obstructive system) як токсико-метаболічні, ідіопатичні, генетичні, аутоімунні, рецидиви гострого панкреатиту або обструктивні (рис. 1.1) [116, 123, 124].

В останні декілька десятиліть з'явилися чотири основні теорії для пояснення патогенезу хронічного панкреатиту: теорія токсичних метаболітів, теорія оксидативного стресу, теорія обструкції вивідних протоків, теорія некрозу-фіброзу [119, 196].

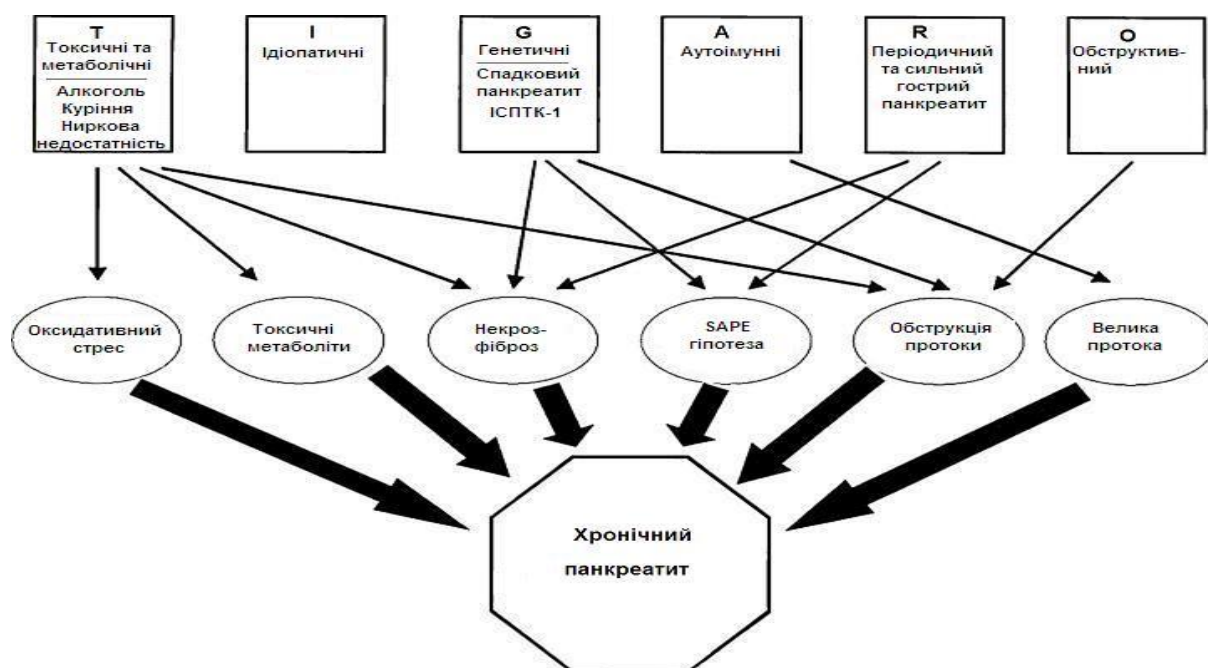


Рис. 1.1. Фактори ризику для розвитку хронічного панкреатиту за класифікацією TIGAR-O [196]

Примітки: ІСПТК-1 – інгібітор серинової протеази типу 1 Kazal; SAPE – гіпотеза “сигнального” нападу гострого панкреатиту

Теорія оксидативного стресу. Відповідно до цієї теорії, оксидативний стрес в ацинарних клітинах підшлункової залози виникає в результаті трьох взаємодіючих факторів: індукції цитохром P450-залежних ферментів, впливові хімічних речовин, що підлягають біоактивації, та дефіциту мікронутрієнтів, необхідних для підтримки запасів відновленого глутатіону. Цитохром P450-залежні ферменти активуються в присутності ксенобіотиків, які метаболізуються за допомогою трьохфазного процесу [124]. Механізми детоксикації пов’язані із переведенням токсикантів у більш полярний стан, що, таким чином, полегшує їхнє виведення. Фаза I метаболізму ксенобіотиків включає систему цитохром P450-залежних оксидаз і гідролітичні ферменти [97]. Не дивлячись на те, що у I фазі цього процесу беруть участь декілька ферментативних систем, але, мабуть, найбільш важливою в ній є функція монооксигенації, яка каталізується цитохромом P450. Він детоксидує та/або активує широкий спектр ксенобіотичних речовин і регулює наступні реакції: N- та O-деалкілювання, аліфатичне та ароматичне гідроксилювання, N- та S-

окиснення і дезамінування. Токсиканти, що метаболізуються за допомогою цієї системи, включають нікотин та ацетамінофен, а також прокарценогенні речовини, бензол та поліароматичні вуглеводні [170]. Таким чином, у фазі I метаболізму ксенобіотиків ферменти розщеплюють токсичні молекули в продукти, які стають менш токсичними [97].

Продукти фази I метаболізму ксенобіотиків володіють високою реакційною здатністю і у фазі II вони зв'язуються із зарядженими компонентами, такими як відновлений глутатіон, сульфат, гліцин і глюкуронова кислота [124]. Фаза II передбачає глюкуронізацію і кон'югацію глутатіону з ксенобіотиками. У цій фазі ендogenous молекули прикріплюються до змінених продуктів, що робить їх ще більш полярними і сприяє кращому виведенню [97]. Утворені метаболіти видаляються за допомогою мембранного транспорту. У деяких випадках кон'юговані метаболіти підлягають подальшій модифікації перед виведенням з організму [124].

Як правило, за гідроксилюванням ксенобіотиків цитохром P450-залежними ферментами у I фазі метаболізму слідує фаза кон'югації та екскреції. Але метаболіти фази I можуть викликати пошкодження клітин перед кон'югацією, особливо коли ферменти фази II, що приймають участь у процесі кон'югації, повністю насичені субстратом. Ситуація ускладнюється при зниженій концентрації відновленого глутатіону, що є одним із компонентів, які підлягають кон'югації з ксенобіотиками у фазі II їхнього метаболізму. Сам метаболізм ксенобіотиків знижує клітинні запаси відновленого глутатіону, оскільки кон'югований глутатіон не може бути повернутий до відновленого стану і остаточно втрачається. Хоча підшлункова залоза активно синтезує відновлений глутатіон, синтез його знижується у випадку, якщо білка і мікроелементів недостатньо, як це часто буває у хворих на хронічний панкреатит [124].

Можливо, що в результаті порушення процесів транссульфування метіоніну, які призводять до продукції основної кількості метильних та тіолових груп, відбувається блокування екзоцитозу. Ця проблема також

виникає при гострому або гострому-хронічному панкреатиті [92]. Перешкоджає екзоцитозу, в свою чергу, здатність ацинарних клітин до компенсації за рахунок збільшення аутофагії та крінофагії; шляхом перенаправлення ферментів, продуктів вільнорадикального окиснення і фактора активації тромбоцитів (ФАТ) в інтерстицій; за рахунок виключення синтезу ферментів. Надходження продуктів вільнорадикального окиснення та ФАТ в інтерстиціальний простір викликає дегрануляцію опасистих клітин, що призводить до вивільнення широкого спектру медіаторів запалення [124]. Отже, значне збільшення активних форм кисню (АФК) як тригера панкреастазу і потенціатора запалення призводить до активації сигнальних каскадів, які перетворюють пошкоджену ацинарну клітину в осередок для хемокінів та цитокінів [92]. Запальна реакція в ацинусах посилюється, якщо блокування екзоцитозу не знято. Його продовження може відбуватися при дефіциті поживних речовин, що перешкоджає адекватному синтезу відновленого глутатіону, та/або при осередковій інфільтрації нейтрофілами, що посилює оксидативний стрес [124].

Без усунення основних причин блокування екзоцитозу і ацинарного запалення запаси відновленого глутатіону і метильних груп в ацинарних клітинах поступово виснажуються, що призводить до інтенсифікації вільнорадикального окиснення, яке посилює запальну реакцію. Крім того, атаки панкреатиту надалі можуть очікуватися частіше, оскільки кількість відновленого глутатіону і метильних групи надалі буде зменшуватися [124].

Окиснювальний стрес є потенційно важливим механізмом патогенезу гострого та хронічного панкреатиту. Численні ферментативні процеси призводять до утворення вільних радикалів, таких як АФК і активні форми азоту (АФА), які можуть окиснювати широкий спектр біомолекул. Крім своїх прямих шкідливих окиснювальних ефектів АФК та АФА можуть виступати в якості вторинних месенджерів у внутрішньоклітинній сигналізації. Ініціація прозапальних каскадів не тільки прямо впливає на клітини підшлункової залози, а й ініціює міграцію, адгезію і проникнення запальних клітин в

екзокринну частину органу. Гени, що беруть участь у міграції та адгезивних процесах, таких як хемотаксис цитокінів (хемокіни) і міжклітинна адгезія, регулюються окисно-відновними чутливими кіназами або транскрипційними факторами, такими як мітоген-активована протеїнкіназа (МАПК), нуклеарний фактор транскрипції “кВ” (НФ-кВ) і білок-активатор 1. Вивільнення хемокінів встановлює хемотаксичний градієнт, що полегшує міграцію запальних клітин до екзокринної частини підшлункової залози. Запальні клітини прикріплюються до судинної стінки за допомогою “rolling-and-adhesion” процесу і згодом поглинаються підшлунковою залозою. Отже, механізми пошкодження від вільних радикалів включають пряму атаку, пероксидне окиснення ліпідів (ПОЛ), модифікацію дезоксирибонуклеїнової кислоти (ДНК) і деградацію/інактивацію ферментів [97, 151].

АФК/АФА здатні викликати пошкоджуючий ефект у два етапи: по-перше, гостре пошкодження прямим впливом на клітинні компоненти і активація сигнальних каскадів, по-друге, тривала запально-клітинна інфільтрація і вторинне окисне пошкодження [151].

Процес генерації вільних радикалів викликає пошкодження ліпідного бішару мембран клітин, відбувається модифікація мембранних білків. У першу чергу негативному впливу підлягають сульфгідрильні групи білків (SH-групи) як безпосередньо в реакції SH-групи з вільними радикалами, так і ферментативним шляхом за участю глутатіонпероксидази та гідроперекису ліпідів. В результаті порушення рівноваги відбуваються “мозаїчні” зміни текучості ліпідної фази, утворюються канали проникності і мікророзриви в різних локусах мембран, а також змінюються властивості ферментів [14].

Таким чином, інтенсифікація ПОЛ, порушення адаптації глутатіонової ланки захисту підтримують локальний запальний процес, зумовлюють порушення мікроциркуляції та метаболічних процесів в організмі, пригнічення тканинного дихання, що, в свою чергу, визначає подальшу латентно протікаючу деструкцію тканини органу. Подальший етап – розвиток фіброзу, який ініціюється і підтримується цитокіновим механізмом.

Фіброз підшлункової залози забезпечується через механізми, у яких задіяні фактор некрозу пухлин- α (ФНП- α)- і кластер диференціації-9 (CD-9)-залежного апоптозу [14].

Теорія токсичних метаболітів. Токсини, в тому числі алкоголь та його метаболіти, здійснюють шкідливий вплив на ациноси, викликаючи зміни клітинного метаболізму. Це може призвести до накопичення ліпідів у цитоплазмі ацинарних клітин підшлункової залози, сприяючи виникненню жирової дистрофії, некрозу клітин, що в кінцевому підсумку призводить до розвитку обширного фіброзу паренхіми органу. Етилові ефіри жирних кислот, побічні продукти метаболізму етанолу, можуть бути визначальними чинниками у цих “токсично-метаболічних” змінах [88, 196]. Не у всіх випадках при хронічному споживанні алкоголю розвивається гострий або хронічний панкреатит (10-20%). Вплив факторів навколишнього середовища і генетичних факторів посилюють дію алкоголю [123].

Вплив інших токсинів також пов'язаний з розвитком хронічного панкреатиту. Паління є дуже важливим незалежним фактором ризику, на відміну від споживання алкоголю. Р. Maisonneuve з колегами (2005) показали, що прогресування захворювання, особливо за умов кальцифікації та діабету, буде прискорюватися у курців, незалежно від споживання алкоголю. Курці з хронічним панкреатитом також мають вищі показники болю, ніж хворі, що не курять. Гіперкальціємія та хронічна ниркова недостатність є важливими причинами хронічного панкреатиту через “токсично-метаболічні” механізми [123].

Теорія обструкції панкреатичної протоки. Н. Sarles (1990) розглядав гострий та хронічний панкреатит як два різні захворювання з різними патологічними процесами. При гострому панкреатиті пошкодження тканини є результатом неконтрольованої активації трипсину, що призводить до самоперетравлення тканини підшлункової залози. Характер пошкодження тканини при цьому відрізняється від хронічного панкреатиту [123, 196].

Вважається, що деякі із збуджуючих агентів, відповідальних за розвиток хронічного панкреатиту, сприяють збільшенню концентрації білка в панкреатичному секреті. Це призводить до утворення в протоках білкових корків, які в протоках можуть кальцифікуватися, утворюючи камені, які випадають у вигляді карбонату кальцію, що, в свою чергу, може сприяти обструкції панкреатичної протоки і розвитку хронічного панкреатиту [88].

Теорія некрозу-фіброзу. Гіпотеза некрозу-фіброзу припускає розвиток фіброзу від рецидивуючого гострого панкреатиту [196], результатом якого є самоперетравлення підшлункової залози активованими панкреатичними ферментами, внаслідок чого відбувається некроз ацинарних клітин з наступними імунними реакціями, про що свідчить запальний інфільтрат. Було запропоновано, що гострий панкреатит ініціює розвиток перилобулярного фіброзу, викликає порушення в протоках та зміни секреції в підшлунковій залозі. Декілька таких епізодів може призвести до втрати паренхіми органу і заміни її фіброзною тканиною (рис. 1.2) [88].

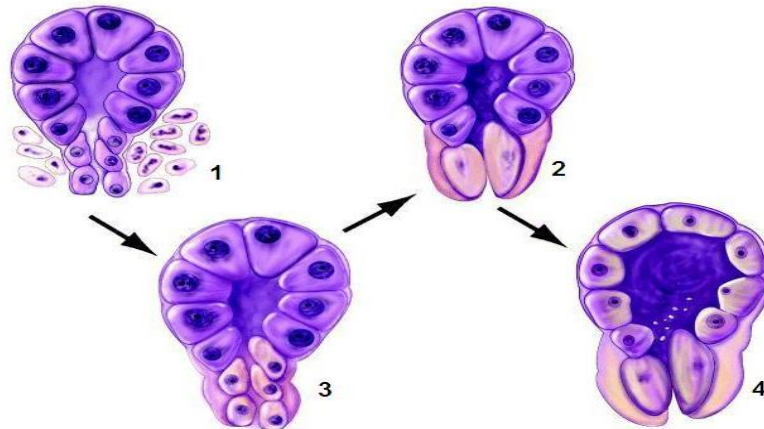


Рис. 1.2. Теорія некрозу-фіброзу [196]

Примітки: 1 – епізод гострого панкреатиту сприяє розвитку запальної клітинної інфільтрації в перидуктальній зоні; 2 – фаза гострого панкреатиту, пов’язана з рубцюванням, тобто відкладенням колагену в пошкоджених перидуктальних зонах; 3 – надлишкове здавлювання протоки сполучною тканиною, що розростається, ускладнює відтік від ацинарних комплексів; 4 – погіршення результатів обструкції в ацинарних клітинах – атрофія, застій та утворення каменів

Підтримку ця теорія отримала в роботі R.W. Ammann і B. Muellhaupt (1994), які досліджували проспективно 254 пацієнта після першого епізоду алкогольного панкреатиту. Розвиток хронічного панкреатиту був пов'язаний із важкістю і частотою подальших епізодів гострого панкреатиту. Генетичний механізм спадкового панкреатиту тепер став більш зрозумілим. Одна мутація гена, що кодує трипсиноген, означає, що активований білок не може бути інактивований. Самоперетравлення паренхіми підшлункової залози настає з подальшим нападом гострого панкреатиту. З повторними його нападами у більшості пацієнтів із спадковим панкреатитом розвивається хронічний панкреатит, що доводить правдивість теорії некрозу-фіброзу [123].

Різні патологічні механізми призводять фактично до однотипного пошкодження клітин залози [67]. Але те, що відбувається на субклітинному рівні, які процеси відповідальні за розвиток важких форм хронічного панкреатиту та призводять до позаорганних ускладнень, залишається недостатньо вивчено.

В літературі описано декілька моделей хронічного панкреатиту на тваринах (переважно на мишах та щурах), які найбільш часто використовуються в експерименті. Всі ці моделі можна розділити на неінвазивні або нехірургічні та інвазивні або хірургічні моделі [162, 208]. Більшість із них були розроблені з метою активації панкреатичних зірчастих клітин (ПЗК) як основного джерела фіброзу [69].

До неінвазивних моделей хронічного панкреатиту відносяться наступні: модель, пов'язана з повторними ін'єкціями церулеїну та характеризується високою надійністю та відтворюваністю; модель, що включає повторні ін'єкції L-аргініну і пов'язана з поступовим заміщенням фіброзної тканини жировою; модель, пов'язана зі застосуванням алкоголю для запуску хронічного панкреатиту (паралельне споживання алкоголю та ін'єкції церулеїну ускладнюють протікання панкреатиту і, отже, посилюють фіброзні зміни в підшлунковій залозі та сприяють втраті паренхіми органу) [171, 216]; генетична модель, пов'язана із визначення ролі одного

конкретного гена в патогенезі хронічного панкреатиту; імунологічна модель, пов'язана із дослідженням ролі лейкоцитів у розвитку фіброзу [79].

До інвазивних моделей хронічного панкреатиту відносяться наступні: ретроградна інфузія таурохолату натрію в протоку підшлункової залози викликає панкреатит, але структура тканини органу повертається до майже нормального стану після 14 діб експерименту; ретроградна інфузія олеїнової кислоти або в'язкого розчину зеїну, або суміші зеїн-олеїнової кислоти в протоку підшлункової залози сприяє розвитку атрофії органу з нерівномірним фіброзом і заміною фіброзної тканини на жирову протягом 6 місяців. Ці моделі панкреатиту значно відрізняються від такого в організмі людини [171, 216]. До інвазивних моделей хронічного панкреатиту відноситься також повна обструкція панкреатичної протоки, неповна лігатура панкреатичної протоки і оклюзія різними тканинними клеями. Ці моделі призводять до розвитку хронічного панкреатиту в одній частині підшлункової залози, тоді як структура іншої її частини залишається в нормі. Моделі хронічного панкреатиту на основі протокової обструкції не є загальними, тому мало досліджені морфологічні та біохімічні зміни підшлункової залози в цих умовах [197, 216].

У ранній фазі після протокової лігатури ацинуси перетворюються на невеликі дуктальні (тубулярні) комплекси. На наступному етапі ацинарні клітини зникають, можливо, внаслідок апоптозу. Ці зміни пов'язані із запальною та фіброзною реакцією за участю численних макрофагів. Вони є потенційним джерелом цитокінів, які стимулюють фіброгенез фібробластами, що набувають властивостей міофібробластів. Руйнування клітин підшлункової залози під час моделювання оклюзії панкреатичної протоки викликає у відповідь запальну реакцію, яка, в свою чергу, ініціює активацію ПЗК та розвиток фіброзу в цих областях [147].

Біохімічний механізм ушкодження ацинарних клітин. При фізіологічних умовах функція ацинарних клітин підшлункової залози полягає в секретії гідролітичних ферментів, які приймають участь у розщепленні

великих молекул їжі, в дванадцятипалу кишку. Багато із цих ферментів синтезуються та зберігаються у вигляді неактивних проферментів (зимогенів), і лише коли вони досягають дванадцятипалої кишки, то активуються ентерокиназою. Проте при гострому панкреатиті активація зимогенів відбувається в ацинарних клітинах, що призводить до самоперетравлення підшлункової залози [106, 173]. Гострий панкреатит виникає в результаті зростання внутрішньопотокового тиску або прямого пошкодження ацинарних клітин внаслідок впливу метаболічних або токсичних подразників [207]. Шкідлива стимуляція ацинарних клітин призводить до ряду важливих ефектів за допомогою різних сигнальних шляхів. Спочатку аномальне вивільнення Ca^{2+} в цитозоль із ендоплазматичного ретикулула викликає передчасну, внутрішньоклітинну активацію трипсиногену та інших травних ферментів. Аномальна концентрація цитозольного Ca^{2+} індукує активацію НФ-кВ і подальше вивільнення прозапальних цитокинів із ацинарних клітин [180]. Токсичні Ca^{2+} сигнали, що генеруються в результаті вивільнення Ca^{2+} з ендоплазматичного ретикулула і секреторних гранул, беруть участь у патогенезі панкреатиту. Висока концентрація жирних кислот є токсичною для ацинарних клітин підшлункової залози. Ці ефекти опосередковані підтриманням високих концентрацій цитозольного Ca^{2+} [165]. Тривале збільшення Ca^{2+} є важливим кофактором в ініціюванні процесів, що призводять до гострого панкреатиту [176]. Залежно від природи та важкості шкідливих стимуляцій, а також від отриманих в результаті цього ушкоджень ацинусів, ацинарні клітини балансують між виживанням, апоптозом чи некрозом. Переважання останніх процесів, в свою чергу, призведе до загального ураження підшлункової залози і поширення системних ефектів, що визначають загальний перебіг та результат гострого панкреатиту [180].

Детальніше, самоактивація є невід'ємною властивістю трипсиногену. В підшлунковій залозі існують механізми, направлені на створення балансу між його активацією та інактивацією [98]. Тобто для запобігання

неадекватної або ранньої активації трипсиногену існують інгібіторні механізми [207]. Дефект в одній або декількох ланках цих захисних механізмів може викликати каскадну активацію зимогенів, що призведе до самоперетравлення підшлункової залози [98].

Передчасна активація трипсину відіграє ключову роль в ініціації гострого панкреатиту [105, 173]. Невелика кількість активного трипсину, як правило, генерується в підшлунковій залозі, але він швидко інактивується панкреатичним секреторним інгібітором трипсину або ІСПТК-1, який наявний у в тканині органу і цитоплазмі ацинарних клітин, а потім самоліквідується або деградується трипсин-активованими протеазами (хімотрипсиногеном С) [92, 128, 173, 207]. Якщо активність трипсину перевищує інгібуючий потенціал ІСПТК-1, то він, як вважають, буде інактивованій протеолітичним трипсином-3 або шляхом аутолізу [173]. Систематична наявність неспецифічних антипротеаз, таких як α_1 -антитрипсин, α_1 -інтертрипсин, α_2 -макроглобулін, інактивує ферменти в протоках [207].

Внутрішньоклітинні захисні механізми включають синтез трипсину у вигляді неактивного зимогену (трипсиногену), зимогенну компарменталізацію та упаковку, синтез специфічного інгібітору трипсину (панкреатичного секреторного інгібітору трипсину або ІСПТК-1), R122-залежний трипсиноген/трипсин аутоліз (зміни в положенні 122 амінокислотної послідовності ферменту – R122), контроль внутрішньоклітинного рівня Ca^{2+} і лізосомально-залежний шлях елімінації зимогену/активованого травного ферменту. Порушення кожного із цих захисних механізмів підвищує ризик розвитку панкреатиту [212].

Якщо всі ці механізми гальмування вичерпані, запалення підшлункової залози стає неминучим. Трипсин активує інші панкреатичні зимогени, такі як проеластаза, прокарбоксіпептидаза або профосфоліпаза А2, які пошкоджують ацинарні клітини [128, 207]. Це можна інтерпретувати як основну причину початку розвитку панкреатиту [128]. Протеазна активація

знижується після 48 год, в той час як запалення продовжується протягом тривалого часу [83, 207]. Незабаром, після активації трипсину, утворюються великі вакуолі, що називаються аутофагосомами. Є дві провідні теорії активації трипсиногену:

- гіпотеза аутоактивації припускає, що стимуляція холецистокініном супроводжується аутоактивацією трипсиногену у вакуолях ацинарних клітин;

- гіпотеза колокалізації полягає в тому, що активація трипсину відбувається в цитозольних вакуолях, що містять травні та лізосомальні ферменти, такі як катепсин В [176]. Катепсин В активує трипсиноген з утворенням трипсину до виходу останнього із клітини [105, 207].

Хронічний панкреатит може розвиватися при наявності цис-діючих мутацій в гені, що кодує трипсиноген, в результаті яких активація його може посилюватися, так і діючих мутацій в транс-положенні генів, що кодують ІСПТК-1 та хімотрипсиноген С, в результаті яких їхні функції втрачаються. Крім того, в той час як активація трипсину призводить до панкреатиту, то його інактивація запобігає цьому. Оскільки гени катіонного трипсиногену-1, аніонного трипсиногену-2, ІСПТК-1 та хімотрипсиногену С експресуються всередині ацинарних клітин і всі їхні продукти безпосередньо беруть участь в активації та інактивації трипсиногену, то це вказує на те, що передчасна активація трипсину в підшлунковій залозі є ключовим механізмом в розвитку хронічного панкреатиту [98].

Таким чином, ранні епізоди при гострому панкреатиті включають в себе зміни в секреції та внутрішньоклітинну активацію ферментів і формування медіаторів запалення. Аутофагія та самоперетравлення із загибеллю ацинарних клітин відбуваються на ранніх етапах в процесі розвитку гострого панкреатиту. Поширення від локального до системного запалення індукується локальними медіаторами і активованими ферментами, які призводять до системної запальної відповіді. Активовані макрофаги та

поліморфноядерні лейкоцити можуть потрапляти в підшлункову залозу та продукувати більше прозапальних цитокінів [207].

Ацинарні клітини підшлункової залози відповідальні за вивільнення перших запальних сигналів у відповідь на ураження, ініційоване в них і, згодом, ці сигнали активують імунну реакцію. Ця точка зору підтримується багатьма вченими, які показують, що ацинарні клітини здатні активувати сигнальні шляхи, що беруть участь в експресії медіаторів запалення [106].

Запалення відіграє важливу роль в патофізіології панкреатиту. Ацинарні клітини підшлункової залози, ендотеліальні клітини, нейтрофіли, лімфоцити, моноцити і макрофаги задіяні у продукції запальних медіаторів при гострому панкреатиті. Медіатори запалення, що беруть участь у патофізіології цього захворювання, включають: ФНП- α , інтерлейкін (ІЛ)-6, ІЛ-1 β , ІЛ-10, фактор активації тромбоцитів, молекули міжклітинної адгезії-1, ІЛ-8, моноцитарний хемотаксичний білок-1 (МХБ-1), С5а-компонент системи комплементу, сірководень і нейтральну ендопептидазу [148]. Динаміка змін ФНП- α , який вивільняється макрофагами в межах тканини підшлункової залози, корелює з важкістю панкреатиту [4]. В останні роки стало зрозуміло, що сигнальна молекула НФ-кВ відіграє центральну роль в ініціації та прогресуванні гострого панкреатиту [148].

Останніми дослідженнями показано, що НФ-кВ активується на початку запального процесу в ацинарних клітинах та індукує транскрипцію багатьох генів, що беруть участь у запальних та апоптотичних реакціях у процесі розвитку панкреатиту [132]. В нормальних умовах димери НФ-кВ знаходяться в цитоплазмі клітини в неактивній формі, зв'язані з одним із інгібіторних білків кВ (ІкВ). Фосфорилування ІкВ у відповідь на різні стимули призводить до їхнього протеолітичного розщеплення і активації НФ-кВ, який потім потрапляє в ядро клітини, де зв'язується з промоторною ділянкою специфічного гена та запускає процес транскрипції [137]. НФ-кВ також індукує сигнал зворотного зв'язку шляхом підвищення регуляції інгібітора ІкВ- α -субодиниці. НФ-кВ має вирішальне значення на початкових

етапах розвитку панкреатиту. Фармакологічне інгібування НФ-κВ призводило до покращення результатів лікування даного захворювання, але оскільки інгібітори, які використовувалися, не були високоспецифічними, то остаточний висновок не був зроблений [132].

Активація ендотеліальних клітин призводить до трансендотеліальної міграції нейтрофілів, моноцитів і лімфоцитів у підшлунковій залозі, що в сукупності з вивільненою з активованих нейтрофілів еластазою може викликати більш значніші пошкодження, ніж ті, що викликані активованими панкреатичними ферментами. При цьому недостатнє надходження O_2 до органу і генерація вільних радикалів також сприяють ураженню підшлункової залози. Більше того, прозапальні медіатори, вивільнені нейтрофілами і макрофагами, можуть пошкоджувати стінку судин і призводити до збільшення мікроваскулярної проникності, інтрапаренхімального набряку і дефіциту надходження O_2 , а локальні та системні ускладнення виникають в результаті дії різних медіаторів незалежно від причин розвитку гострого панкреатиту [4].

Виражений протеоліз, інфільтрація тканини підшлункової залози лейкоцитами і макрофагами – головні джерела внутрішньопанкреатичного синтезу прозапальних цитокінів – призводять до прогресування некрозу ацинарних клітин органу. Збільшення проникності судинної стінки викликає значний набряк підшлункової залози як у зоні первинного ушкодження, так і в інших її областях; ендотеліальна поверхня стає протромбогенною, що призводить до мікротромбозів. Активація ендотелію сприяє гіперпродукції речовин, що підтримують адгезію лейкоцитів, збільшують проникність капілярної стінки, вивільнення факторів хемотаксису і прискорення фагоцитозу. Даний комплекс патогенетичних ланок детермінує стрес-реакцію, що призводить до порушення вищих вегетативних центрів і посилення впливу катехоламінів, а викид в системний кровотік значної кількості прозапальних цитокінів та інших медіаторів запалення викликає каскад біохімічних реакцій [4].

Результатом раніше описаних процесів ушкодження панкреатитів є загибель клітини шляхом апоптозу або некрозу [180, 214]. Форма загибелі клітин визначає тяжкість гострого панкреатиту [209]. Апоптоз переважає при легкій формі гострого панкреатиту, в той час як некроз – при тяжкій [180].

Некроз характеризується важкими патофізіологічними змінами, що включають мітохондріальний набряк, порушення плазмолемі і, в кінцевому підсумку, витікання клітинного вмісту. Це викликає гостре ексудативне запалення оточуючих тканин; подальшу активацію та інфільтрацію нейтрофілами, що, як вважають, підвищує внутрішньоклітинну активацію травних ферментів і посилює панкреатит [102]. Індукція апоптозу або запрограмованої клітинної смерті у пошкоджених ацинарних клітинах може пригнічувати запалення і поліпшувати перебіг захворювання. При апоптозі зберігається цілісність клітинної мембрани, тому, на відміну від некротичних клітин, не відбувається виходу внутрішньоклітинних компонентів, що містять прозапальні та імуногенні речовини, і це дозволяє уникнути вираженої запальної відповіді [209]. В результаті гіперстимуляції холецистокініном було показано активацію каспаз, вивільнення цитохрому С і мітохондріальну деполяризацію, які активують апоптоз [180]. Активовані каспази нарізають клітинні білки на неактивні фрагменти, які не призводять до місцевих або системних порушень. При класичному апоптозі цитоскелет деградується рано, разом з тим органели також не зберігаються на пізніх стадіях процесу. Альтернативний спосіб запрограмованої загибелі клітини, пов'язаний із ранньою деградацією органел і збереженням цитоскелета протягом тривалого часу, був описаний при гострому панкреатиті. Цей процес називається аутофагічна клітинна смерть або запрограмована загибель клітини типу II [207].

Фіброгенез при хронічному панкреатиті. Панкреатичний фіброз – характерна гістопатологічна особливість хронічного запалення підшлункової залози. Це активний динамічний процес, який призводить до посиленої продукції фіброзних факторів, незбалансованого відкладення білків

позаклітинного матриксу і деструктивного рубцювання паренхіми органу [201]. ПЗК відіграють важливу роль в ініціюванні і прогресуванні панкреатичного фіброгенезу при хронічному панкреатиті [84].

Процеси фіброгенезу у підшлунковій залозі стали досліджуватися лише в останні роки, на відміну від аналогічних процесів у печінці, які добре вивчалися протягом останніх десятиліть. Печінкові зірчасті клітини були ідентифіковані більше 130 років тому відомим патологоанатомом Карлом Вільгельмом фон Купфером. Панкреатичні аналоги печінкових зірчастих клітин були вперше виявлені N. Watari в 1982 р. завдяки флуоресцентній та електронній мікроскопії. Він ідентифікував їх у щурів, які отримували з їжею вітамін А, тому що клітини з жировими краплинами у цитоплазмі набувають властивість аутофлуоресценції при накопиченні в них ретинолу. У 1990 р. N. Пкежігі була описана подібна вітаміну А аутофлюоресценція в нормальних панкреатобіоптатах щурів та людини [81, 175].

ПЗК знаходяться в периацінарному просторі та перидуктальних зонах підшлункової залози та виступають в якості ключових учасників в патобіології основних порушень екзокринної функції органу, у тому числі при хронічному панкреатиті [103]. Ці клітини мають довгі цитоплазматичні відростки, що надають їм типовою “зірчастого” вигляду (рис. 1.3) [157].

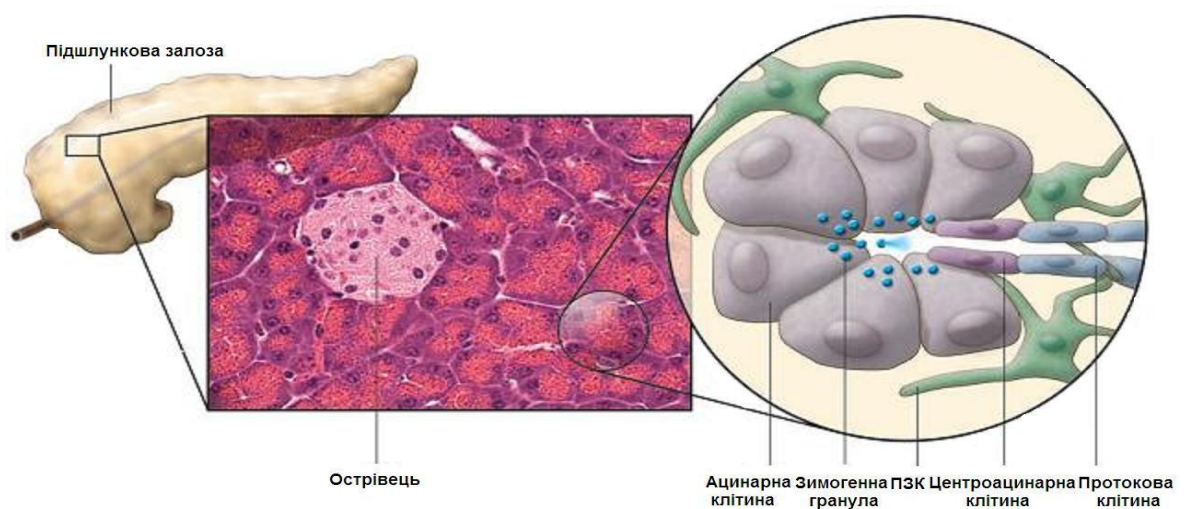


Рис. 1.3. Схема клітинних компонентів екзокринної підшлункової залози [165]

ПЗК відіграють важливу роль у регуляції нормального стану позаклітинного матриксу в підшлунковій залозі шляхом підтримання балансу між синтезом та деградацією його компонентів [80]. ПЗК можуть знаходитися у стані спокою (здатні до зберігання вітаміну А) або в активному стані, так звані міофібробласто-подібні клітини [157].

Профіброгенні стимули, такі як метаболіти етанолу, окисний стрес та різні цитокіни, запускають процес активації ПЗК. Це процес загоєння після травми підшлункової залози і не є патологічним. Повторні епізоди пошкодження тканин (при хронічному панкреатиті) і безперервна стимуляція ПЗК профіброгенними стимулами може призвести до стійкої активації цих клітин і панкреатичного фіброзу, що сприятиме розвитку органної недостатності при хронічному панкреатиті [117, 131, 177]. ПЗК, що знаходяться в стані спокою містять багато крапель ліпідів в цитоплазмі [178], на відміну від активованих клітин, де не вистачає вітаміну А [117]. Активовані клітини проліферують з високою швидкістю, експресують α -гладком'язовий актин (α -ГМА), десмін, колаген I та III типу, віментин, матриксні металопротеїнази-1 (ММП-1), ММП-2, тканинні інгібітори матриксних металопротеїназ-1 (ТІМП-1), ТІМП-2, протеоглікани, гіалуронову кислоту (ГК), ГФКП, переносник аденозинтрифосфат (АТФ)-зв'язуючих касет субсімейства G член 2 (АЗКГ2) та НМКА [43, 117, 157]. Десмін представляє міоцити, ГФКП – астроцити, віментин – лейкоцити, фібробласти та ендотеліальні клітини, нестін – нейроепітеліальні стовбурові клітини [169]. АЗКГ2 та НМКА експресуються в печінкових зірчастих клітинах щурів та людини, і було показано, що НМКА беруть участь у трансформації ПЗК в міофібробласти і регулюють клітинну адгезію, а переносник АЗКГ2 пов'язаний з життєздатністю клітин та/або активацією. АЗКГ2 та НМКА можуть мати важливе значення для дослідження ПЗК із фенотипом міофібробластів. Більш того, дослідження показали, що розчинні фактори, що секретуються ПЗК з активним фенотипом, які збільшуються в уражених ділянках підшлункової залози, відіграють важливу роль в

панкреатичній фізіології, розвитку фіброзу, презентації антигену, явищах фагоцитозу та ін. [157].

α -ГМА експресія виражена в зонах фіброзу в тканині підшлункової залози у пацієнтів з хронічним панкреатитом різної етіології. У цих фіброзних областях тільки α -ГМА клітинна експресія продукує матричну рибонуклеїнову кислоту (мРНК), що кодує проколаген $\alpha 1I$, вказуючи на те, що активовані ПЗК, ймовірно, є основним джерелом колагену при фіброзі підшлункової залози. Дослідження на декількох тваринних моделях експериментального панкреатиту показали, що некроз паренхіми і запалення в органі передують активації ПЗК. Таким чином, аутокринні та паракринні медіатори, ймовірно, беруть участь в активації ПЗК. У свою чергу, активація сприяє проліферації ПЗК, міграції та відкладенню позаклітинного матриксу, що призводить або до фіброзу, або до ремоделювання екстрацелюлярного матриксу в рамках репаративного процесу [103]. При хронічному панкреатиті у співвідношенні між металопротеїназами та їхніми тканинними інгібіторами переважає підвищене виділення ТІМП, що сприяє формуванню фіброзу [43].

Активація ПЗК при розвитку хронічного панкреатиту, ймовірно, опосередковується проліферативними і профіброгенними факторами росту, такими як фактор росту тромбоцитів (ФРТ), трансформуючий фактор росту β (ТФР- β) і фактор росту сполучної тканини, рівень яких підвищується під час некротичного запалення в підшлунковій залозі. ПЗК також можуть бути активовані АФК. Дослідження підтвердили, що культивовані ПЗК активуються також ІЛ-1 та ІЛ-6 і ФНП- α [80, 177]. ПЗК можуть самостійно синтезувати ФРТ, ТФР- $\beta 1$, які аутокринно підтримують їхній активний міофібробластний фенотип, сприяють прогресуванню фіброзу підшлункової залози навіть після припинення дії провокуючих факторів [43]. В той час як ТФР- β найбільше впливає на синтез компонентів екстрацелюлярного матриксу, ФРТ є найбільш впливовим мітогеном та здатний збільшувати міграційну спроможність ПЗК [57].

ФНП- α включає як сигнали до апоптозу, так і механізми виживання клітини, впливаючи на апоптоз як ПЗК, так і периферичних лімфоцитів. В індукції апоптозу лімфоцитів провідна роль належить сигналам, які надходять в клітину не тільки через мембранні рецептори CD95, але і через рецептори для ФНП. CD95-залежний апоптоз більше впливає на активовані CD4+-клітини, а апоптоз, що викликається ФНП- α , – на активовані CD8+-клітини. ФНП-залежний апоптоз розвивається повільніше, ніж CD95-залежний, в результаті чого здійснюється корекція співвідношення функціональних субкласів Т-клітин у процесі імунної відповіді, а порушення цього механізму призводить до хронізації процесу [57].

Джерелами цитокінів, що стимулюють активацію ПЗК виступають макрофаги, тромбоцити і, можливо, ацинарні клітини (що можуть виділяти трансформуючий фактор росту- α (ТФР- α), ІЛ-1 та ІЛ-6). Важливо відмітити, що ПЗК самостійно здатні синтезувати цитокіни такі як ТФР- β , ІЛ-1. Ці спостереження свідчать про існування аутокринних циклів, які сприяють збереженню активного стану ПЗК після початкового екзогенного сигналу, викликаючи фіброз тканини підшлункової залози [57, 136].

1.2. Енцефалопатія за умов порушення функції підшлункової залози

Вільнорадикальне окиснення, з одного боку, є невід'ємною частиною нормальної життєдіяльності організму, а з іншого – порушення цих процесів служить раннім неспецифічним чинником ушкодження, що лежить в основі розвитку різних захворювань, в тому числі гострого та хронічного панкреатиту. Якщо враховувати, що рівень антиоксидантної активності тканини підшлункової залози один з найнижчих в організмі, особливо при гострому панкреатиті, то вивільнення в кров продуктів вільнорадикального окиснення і ендотоксинів сприятиме формуванню синдрому ендогенної інтоксикації [64, 100]. Таким чином, формування цього синдрому пов'язано з

запуском процесів ліпопероксидації та накопиченням у тканинах і крові продуктів ПОЛ [16].

В даний час все більшого значення набуває вивчення маркерів ендотоксикозу різного походження [15]. Основна частина ендогенних токсинів належить до молекул середньої маси (МСМ), підвищення яких в крові, а також продуктів ПОЛ при зниженні активності системи біотранспорту та біотрансформації ендотоксинів є неспецифічним тестом ендогенної інтоксикації [15, 45, 77]. МСМ – це пул речовин з середньою молекулярною масою від 300 до 5000 Да, фрагменти нуклеїнових кислот і ароматичні амінокислоти. Їхнє накопичення відбувається при порушенні функціональної активності систем детоксикації та при посиленому катаболізмі білків, призводячи до змін фізико-хімічних властивостей клітинних мембран, що робить їх більш доступними для різного роду пошкоджуючих впливів, включаючи процеси ПОЛ [15].

ПОЛ відіграє значну роль в регуляції окисного фосфорилування клітини та проникності її мембран [23]. Надмірне утворення АФК може викликати пошкодження клітин, тканин і органів [213]. Пероксидний характер пошкодження, насамперед, пов'язаний з окисненням ліпідів клітинних мембран (холестеролу, поліненасичених жирних кислот), які є основною мішенню окисної атаки, і це призводить до утворення та накопичення продуктів ліпопероксидації, зокрема оксістеролів, гідроперекисів та ендопероксидів. Останні піддаються фрагментації з утворенням широкого спектра реактивних проміжних карбонільних продуктів ПОЛ, таких як α , β -ненасичені альдегіди (4-гідрокси-2-ноненаль і акролеїн), діальдегіди (малоновий діальдегід і гліоксаль) і кетоальдегіди (4-оксо-транс-2-ноненаль та ізокетони) [166]. Ці продукти ПОЛ є дуже токсичними сполуками для клітинних структур і сприяють ендотоксикозу (токсичному пошкодженню). Дисбаланс в прооксидантно/антиоксидантній системі на користь першої та розвиток ендогенної інтоксикації призводять до

формування окисного стресу, який може проявлятися на клітинному, тканинному, організовому рівнях [23, 96].

Багато компонентів із МСМ проявляють нейротоксичну активність, здатні приєднуватися до рецепторів та блокувати їх, неадекватно змінюючи метаболізм і функції клітини. Вони викликають зміну проникності гематоенцефалічного бар'єра (ГЕБ), інгібують мітохондріальне окиснення, порушують процеси транспорту амінокислот, K^+ і Na^+ в центральну нервову систему (ЦНС), що пов'язано з інгібуванням Na^+ , K^+ -АТФази, змінюють структурно-функціональну організацію мембран клітин крові та ендотелію судин, пригнічують фагоцитоз та ін. [23, 62, 96]. У зв'язку з тим, що МСМ здатні набувати властивостей вторинних токсинів і впливати на життєдіяльність всіх систем і органів, їх накопичення надалі посилює перебіг патологічного процесу [23, 62].

В результаті численних досліджень було встановлено, що підвищення рівня МСМ в крові спостерігається при патологічних станах різної етіології та ступеня тяжкості, в тому числі і при гострому панкреатиті, панкреонекрозі, ряді хірургічних захворювань (панкреатиті) [45].

Раннім і важким ускладненням гострого панкреатиту є панкреатична енцефалопатія, патогенез і механізм якої як і раніше досліджується [107, 179, 198]. С.А. Pallis і Р.Д. Lewis (1974) запропонували виключити всі критерії, які можуть імітувати цей синдром, наприклад, електролітний дисбаланс, гіпо- або гіперглікемію, діабетичний ацидоз, гіпо- або гіперкальціємію, ниркову або печінкову недостатність, мозкову судинну недостатність, всі умови, які можуть супроводжувати панкреатит [182]. Неврологічні прояви, пов'язані з гострим панкреатитом, багатofакторні і можуть бути результатом також гіпомагніємії, низького рівня тіаміну або осмотичного мієлінолізу. Симптоми, пов'язані з осмотичним мієлінолізом, включають коливання психічного стану, дизартрію, сплутаність свідомості, галюцинації, марення, акінетичний мутизм, судоми та кому [130]. Панкреатична енцефалопатія виявляється у 9-35% пацієнтів з важким гострим панкреатитом і пов'язана зі

смертністю у близько 70% хворих. Нейропатія пов'язана зі зміною гемодинаміки, метаболічного статусу, розладами рідинного чи електролітного балансу, виділенням прозапальних цитокінів і прямою нейротоксичною дією фосфоліпази [82].

Симптоми зазвичай виявляються через 2-5 днів від початку захворювання, хоча нові неврологічні симптоми були зареєстровані більш ніж через 1 місяць після початку панкреатиту. Патологічні зміни в ЦНС включають плямисту мієлінову блідість, центральний понтінний мієліноліз, екстрапонтінний мієліноліз, гострий геморагічний лейкоенцефаліт, а також жирову емболію. F. Vogel (1951) перший описав розсіяні вогнища інтенсивної демієлінізації при панкреатичній енцефалопатії. Були запропоновані і інші фізіопатологічні пояснення, в тому числі панкреатична інактивація, цитокіни, такі як ФНП- α , ІЛ-1. Ці прозапальні маркери та панкреатичні ферменти призводять до збільшенні проникності ГЕБ, внаслідок чого відбувається запальна активація, розвивається вазогенний набряк, мієліноліз, електролітичні порушення та гіперосмолярність, що обумовлена осмотичним діурезом [130].

Важко діагностувати ранню панкреатичну енцефалопатію [198]. В даний час для неї немає ніяких уніфікованих діагностичних стандартів. Зазвичай вона діагностується відповідно до клінічних симптомів та історії гострого панкреатиту. Патологічні зміни в тканинах головного мозку при даній патології пов'язані, в основному, з набряками нейронів, геморагічними вогнищами та розм'якшеннями вогнищ. Н.М. Лі та ін. (2003) припускають, що ліпаза та фосфоліпаза A2 можуть призвести до пошкодження структур ЦНС та відіграють важливу роль в патологічному процесі панкреатичної енцефалопатії. Інші фактори, такі як низький вміст натрію і фосфору, гіпоксемія, азотемія, порушення вуглеводного обміну та інфекції можуть бути тригерами [218].

Високий рівень панкреатичних ферментів у крові при гострому панкреатиті призводить до зміни проникності ГЕБ і викликає пошкодження

структур головного мозку [182]. При панкреатиті в кровообіг надходить трипсин, еластаза, ліпаза та фосфоліпаза А2. Фосфоліпаза А2 серед них відіграє найважливішу роль. В активованому стані вона трансформує енцефалін і лецитин у високоцитотоксичний гемолітичний енцефалін і гемолітичний лецитин. Це викликає порушення ГЕБ, розчинення фосфоліпідної структури клітинної мембрани, гідроліз мітохондрій і призводить до метаболічних порушень в мозку та його набряку. Дослідження показали, що гемолітичний лецитин може відкрити ГЕБ у щурів при панкреатиті і призвести до демієлізації. Фосфоліпаза А2 може безпосередньо впливати на фосфоліпідні шари клітин головного мозку і бути причиною набряку клітин, осередкового геморагічного некрозу, демієлізації аксонів та вторинного клітинного порушення метаболізму нейронів, що викликає різні нервово-психічні симптоми. Активація даного ферменту, який пошкоджує ацетилхолінові везикули та інгібує вивільнення ацетилхоліну, що призводить до порушення нервово-м'язової передачі, є головним чинником в патогенезі панкреатичної енцефалопатії. Фосфоліпаза А2 надходить до мозку через проникливий ГЕБ і викликає патологічні зміни, що включають менінгеальні вазодилатаційні крововиливи, внутрішньомозковий капілярний застій, менінгеальну запальноклітинну інфільтрацію і розширення міжклітинного простору в паренхімі мозку [218].

Таким чином, в результаті ураження підшлункової залози, в тому числі при панкреатиті, змінюється проникливість ГЕБ, що є необхідною умовою виникнення панкреатичної енцефалопатії [107].

Число досліджень, присвячені проблемам панкреатичної енцефалопатії, останнім часом збільшилися, але її патогенез залишається незрозумілим до кінця [218]. Питання щодо розвитку панкреатичної енцефалопатії при хронічному панкреатиті на сьогоднішній день недостатньо висвітлено і становить значний інтерес для дослідників.

1.3. Значення нейроспецифічних білків та гіалуронат-зв'язуючої активності білків міжклітинного матриксу за умов хронічного панкреатиту та ендотоксемії

Нейроспецифічні білки є структурними компонентами клітин нервової тканини і виконують рецепторні, ферментативні, регуляторні, транспортні, модуляторні та інші специфічні для ЦНС функції [20].

Нейрональна молекула клітинної адгезії (НМКА) є членом суперродини імуноглобулінів, представляє собою глікопротеїн, який опосередковує гомофільну взаємодію між сусідніми клітинами і гетерофільну – між клітинами і компонентами позаклітинного матриксу [94]. Розвиток та підтримка морфології нейронів має велике значення для нормального розвитку та функціонування мозку. НМКА відіграє важливу роль в цих процесах за допомогою участі в регуляції міграції нейронів і їх диференціації; бере участь в механізмі регулювання мембранного потенціалу, який визначає збудливість даних клітин [94, 144, 211]; взаємодіє з факторами росту та рецепторами факторів росту [133].

НМКА крім участі у розвитку нервової системи, також залучена в синаптичну пластичність і в когнітивні процеси в зрілому мозку. НМКА приймає участь як в короткочасовій пластичності при вже існуючих синапсах, так і при тривалій пластичності, пов'язаній з синаптичним утворенням і/або елімінацією. За сучасними уявленнями про функціональну роль НМКА, блокування функцій даного білка може призвести до когнітивних порушень і емоційних змін, у тому числі: порушення просторового сприйняття і пам'яті, слуху, посилення тривожності, порушення сприйнятливості запаху та ін. [90].

НМКА існує в трьох основних ізоформах (НМКА-180, НМКА-140 та НМКА-120), що відрізняються за молекулярною масою, а також за розподілом та функціями [89]. У той час як НМКА-120 не має цитоплазматичного домену і прикріплюється до мембрани за допомогою

ковалентно зв'язаної фосфатидилінозитол-заякореної сполуки, НМКА-140 та НМКА-180 представлені трансмембранними та інтрацитоплазматичними доменами. НМКА-140 і НМКА-180 в основному експресуються під час ембріонального розвитку, а глікозилфосфатидилінозитол-заякорені 120 кДа ізоформи знаходяться в різних тканинах дорослих. НМКА проходить кілька пост-трансляційних модифікацій – фосфорилування і глікозилювання. Високомолекулярні ізоформи НМКА виявляються при деяких патологічних станах, наприклад, при нейродегенеративних розладах [94].

S-100b є членом S-100 Ca^{2+} -зв'язуючого суперсімейства білків і представляє собою кислий білок з молекулярною масою 21 кДа та існує у вигляді гомодимеру, що складається з двох b субодиниць [129]. Він може секретуватися астроцитами, гліальними та шванівськими клітинами. Астроцити та гліальні клітини продукують S-100b за складною системою, що включає зміни внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} . S-100b в результаті його секреції або виходу із пошкоджених клітин здатен акумулюватися в міжклітинному просторі і/або потрапляти в кров'яне русло та спинномозкову рідину [168, 202]. S-100b бере участь в Ca^{2+} -залежній регуляції різноманітних внутрішньоклітинних процесів, таких як фосфорилування білків, активність ферментів, клітинна проліферація та диференціювання, динаміка цитоскелетних складових, структурна організація мембран, внутрішньоклітинний Ca^{2+} -гомеостаз, запалення, захист від окиснювального пошкодження клітин [164]. Внутрішньоклітинно S-100b регулює цитоскелетну динаміку через дезорганізацію тубуліну філаментів, білка проміжних філаментів III типу та зв'язування фібрилярних білків, таких як кепіруючий білок актину (CapZ) або інгібування фосфорилування ГФКП при стимуляції циклічним аденозилмонофосфатом (цАМФ) або кальцієм/кальмодуліном. S-100b взаємодіє з цитоплазматичним доменом мієлін-асоційованого глікопротеїну та інгібує його фосфорилування за допомогою протеїнкінази [202]. В клітині S-100b взаємодіє з відносно великим числом сигнальних білків, регулюючи таким чином їх функції [110].

S-100b локалізований переважно в астроцитах та шванівських клітинах нервової системи. Крім того, він виявлений в хондроцитах, меланоцитах, жирових клітинах, дендроцитах (у тому числі в клітинах Лангерганса). Секретуючись, S-100b проявляє паракринний ефект на нейрони та мікроглію, а також здійснює аутокринний вплив на астроцити [164, 191].

В астроцитах S-100b знаходиться дифузно в цитоплазмі і пов'язаний з мікротрубочками, ГФКП проміжних філаментів та внутрішньоклітинними мембранами. Високий вміст та дифузна локалізація в цитоплазмі пояснює здатність S-100b до взаємодії з ферментами, субстратами, факторами транскрипції та цитоскелетними компонентами, регулюючи таким чином енергетичний метаболізм, Ca^{2+} -гомеостаз, транскрипцію, а також форму клітин, їхню проліферацію, диференціювання та рухливість [110].

При фізіологічних (наномолярних) концентраціях даний білок виконує захисні функції, що підтверджує роль S-100b як нейротрофічного фактору під час розвитку та регенерації нейронів (Рис. 1.4) [104, 164, 193].

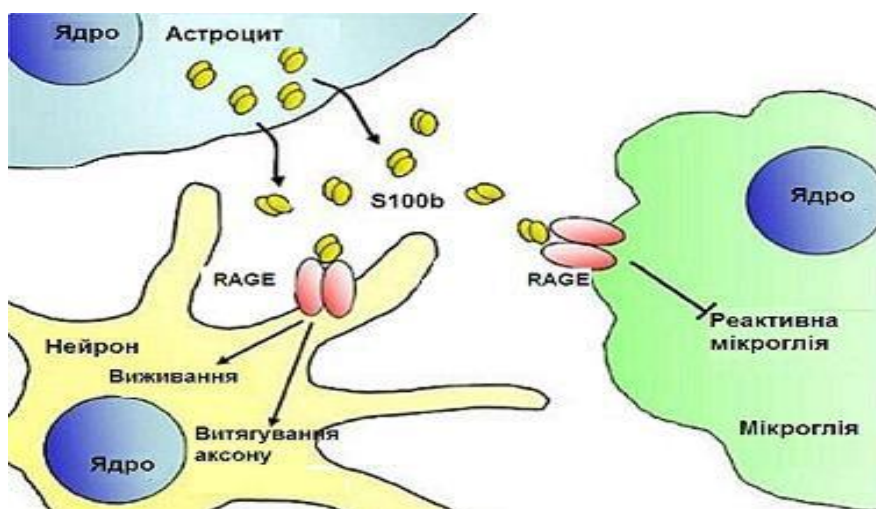


Рис. 1.4. Схема впливу низької концентрації S-100b на нейрони та клітини мікроглії. За участю рецепторів для кінцевих продуктів глікірування (RAGE) S-100b чинить трофічну дію на нейрони та знижує реактивність мікроглії [192]

При мікромольній концентрації S-100b бере участь у посиленні в мозку запальної відповіді шляхом активації мікроглії та астроцитів і впливає

на нейрони [110]. S-100b здатен індукувати апоптоз та нейродегенерацію клітин. Це високочутливий біохімічний маркер ушкодження головного мозку і може сигналювати про гліальну клітинну активацію, гибель нейронів [104, 164]. Трофічні та токсичні ефекти S-100b в мозку обумовлені зв'язком з клітинними поверхневими рецепторами (Рис. 1.5) [110].

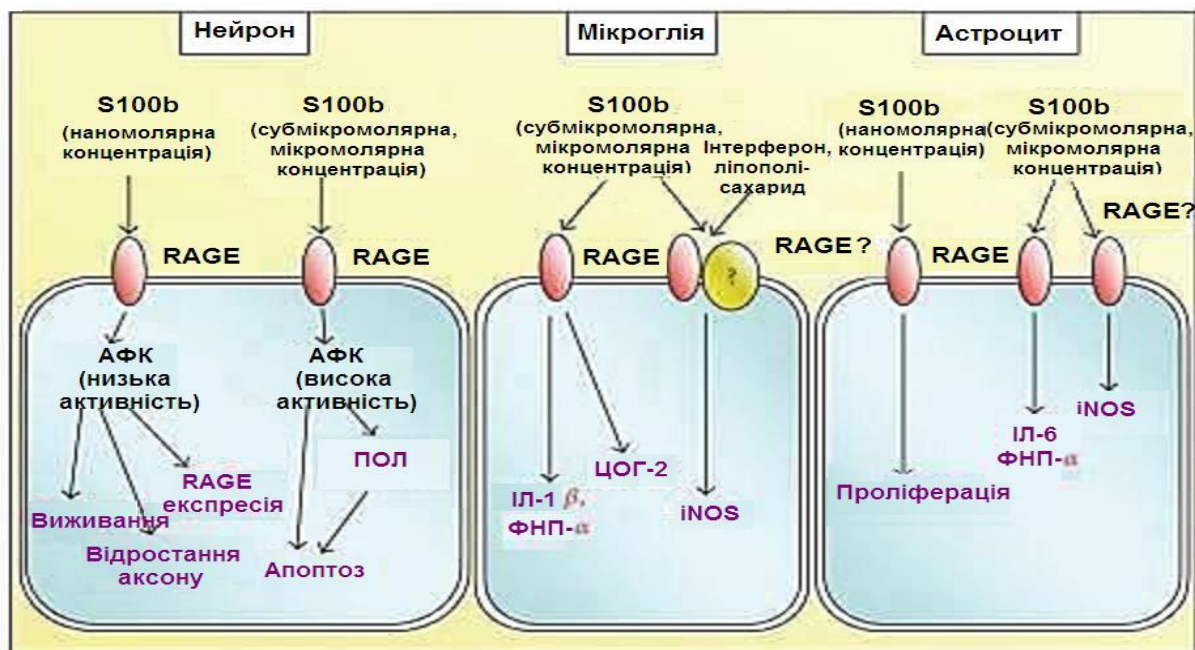


Рис. 1.5. Схематичне зображення позаклітинних регуляторних ефектів S-100b на нейрони, мікроглію та астроцити [110]

Примітки: ЦОГ-2 – циклооксігеназа-2, іNOS – індукційна NO-синтаза

S-100b експресується у шванівських клітинах неушкоджених периферичних нервів, а також у період їх дегенерації. При гострій травмі S-100b вивільняється зі шванівських клітин пошкоджених нервів та активує RAGE в інфільтрованих макрофагах і в активованих шванівських клітинах; інфільтрація макрофагами має позитивний ефект, що проявляється в очищенні від клітинних уламків та мертвих нейтрофілів і вивільненні цитокінів та трофічних факторів, в той час як активовані шванівські клітини виділяють цитокіни та нейротрофічні фактори, що мають велике значення для відновлення пошкоджених нервів (Рис. 1.6) [192].

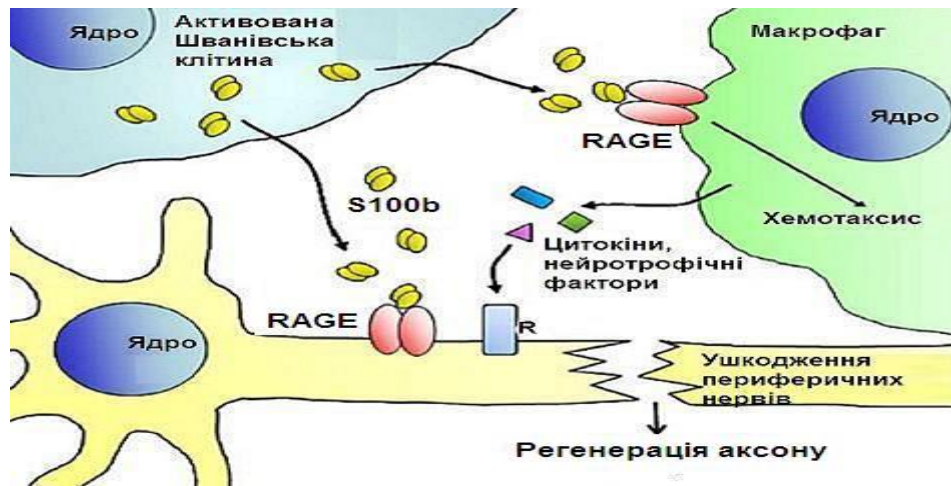


Рис. 1.6. Схема впливу низької концентрації S-100b на регенерацію аксонів пошкоджених периферичних нервів. S-100b, вивільняючись з активованих шванівських клітин, стимулює надходження їх і макрофагів до місця пошкодження та вивільнення цитокінів і трофічних факторів [192]

S-100b-активовані RAGE стимулюють міграцію шванівських клітин під час відновлення ушкоджених периферичних нервів за допомогою індукції тіоредоксин-взаємодіючих білків і активації p38 MAPK, фактору транскрипції NF-κB. S-100b також стимулює проліферацію та диференціювання попередників нервових клітин від субвентрикулярної зони мозку дорослої миші через RAGE активацію. Таким чином, S-100b стимулює виживання нейронів і диференціювання клітин через RAGE взаємодії [192].

Астроцити, також відомі як астроглія, є найбільш поширеними клітинами в ЦНС [217]. З кінця XIX століття вони були розділені на 2 основні підтипи (протоплазматичні та фіброзні) на основі їхньої різної клітинної морфології і анатомічної локалізації. Протоплазматичні астроцити знаходяться в сірій, а фіброзні – в білій речовині мозку. Електронно-мікроскопічний аналіз показав, що відростки протоплазматичних астроцитів огортають синапси, а фіброзних – зв'язуються з перехватом Ранв'є, і ці два типи клітин утворюють щільний контакт між дистальними відростками сусідніх астроцитів. Основні характеристики цих клітин (морфологічні і деякі їх функціональні взаємодії) приведені схематично (Рис. 1.7) [190].



Рис. 1.7. Схематичне зображення, що узагальнює функції астроцитів в неушкодженій ЦНС [190]

Примітки: ПГЕ – простагландин Е, НТФГМ – нейротрофічний фактор головного мозку, ГАМК – гамма-аміномасляна кислота

Астроцити експресують білок проміжних філаментів гліальний фібрилярний кислий протеїн (ГФКП), формують іонні канали як ліганд-керовані, так і потенціал-залежні, беруть активну участь у функціонуванні синапсів. Також вони відіграють важливу роль в регуляції функцій олігодендроцитів та нейрональних стовбурових клітин. При патологічних станах астроцити найшвидше реагують на пошкодження, викликають активацію астроглії або астрогліоз, який характеризується збільшенням кількості проміжних філаментів зі супутньою клітинною гіпертрофією і значним зростанням кількості астроцитів. Підвищення продукції білків проміжних філаментів та ГФКП астроцитами розглядається в якості ознаки астрогліозу. ГФКП – основний білок проміжних філаментів зрілих астроцитів. J.P. O'Callaghan (1994) стверджував, що він є чутливим і раннім біомаркером астрогліозу після нейротоксичного ураження [217].

Прозапальні фактори активованої мікроглії є тригерами та модуляторами астрогліозу. Ураження різного характеру (нейротоксини,

інфекції та травми ЦНС) можуть безпосередньо викликати пошкодження нейронів, що, в свою чергу, активує оточуючу мікроглію і астроцити та індукує подальші гліальні реакції. В своєму активованому стані мікроглія може виділяти різні прозапальні фактори, такі як цитокіни, ейкозаноїди, хемокіни, вільні радикали та протеази. Ці медіатори запалення здатні здійснювати значний вплив на оточуючі астроцити. Прозапальні медіатори викликають астрогліоз через їх рецептори на астроцитах, тим самим виконуючи функцію тригерів та модуляторів астрогліозу [217].

ГФКП – білок проміжних філаментів, декілька ізоформ якого було описано, в тому числі α , β , γ , δ , $\Delta 135$, $\Delta 164$, Δ ехон і зовсім нещодавно κ . Переважною формою є ГФКП- α , що експресується більшістю астроцитів, володіє високою специфічністю до астрогліальної клітинної лінії, активується у відповідь на пошкодження та широко використовується в якості діагностичного маркера реактивного гліозу. ГФКП- β знаходиться переважно в периферичній нервовій системі, в той час як ГФКП- γ ідентифікується за межами ЦНС (в кістковому мозку та селезінці миші). ГФКП- δ був визначений в астроцитах під м'якою оболонкою кори головного мозку, під зернистим шаром зони гіпокампа та субепідермальним шаром шлуночків мозку [162]. ГФКП експресується також у деяких популяціях попередників нервів та глії. Експресія ГФКП в астроцитах ініціюється зв'язуванням цитокінів з їх рецепторами для ІЛ-6. Ці рецептори в подальшому активують JAK/STAT (янус-кіназа/передавач сигналу) внутрішньоклітинні сигнальні шляхи, що призводить до експресії ГФКП. Як відомо, більшість інших шляхів, що беруть участь в ГФКП-експресії, підключаються на певному етапі до цього класичного шляху [126]. Таким чином, ГФКП визначається в астроглії ЦНС і є специфічним маркером диференційованих астроцитів [114]. Він забезпечує структурну підтримку та міцність на розтягнення цитоскелета нормальних астроцитів [181].

На сьогодні недостатньо інформації про молекулярні механізми взаємодії глікозаміногліканів (ГАГ) міжклітинного матриксу зі

специфічними рецепторами на клітинній поверхні при розвитку багатьох патологій, в тому числі хронічного панкреатиту. Останнім часом активно вивчаються сигнальні механізми за участю ГАГ та ГК.

ГК – це лінійний нессульфатований ГАГ, який складається із одиниць, що повторюються: $(\beta,1\rightarrow4)$ -D-глюкуронова кислота- $(\beta,1\rightarrow3)$ -N-ацетил-D-глюкозамін, та синтезується на внутрішній поверхні клітинної мембрани однією з трьох трансмембранних синтаз ГК, а потім транспортується до міжклітинного матриксу при подовженні ланцюга, досягаючи розмірів 10^6 Да [95, 99]. Раніше вважалося, що даний нессульфатований ГАГ є одним із важливих компонентів сполучної тканини [210]. Але за останні десятиріччя було показано, що в білій речовині ЦНС ГК локалізується навколо мієлінових волокон, а в сірій є однією з основних складових нейрональної сітки, що оточує тіла нейронів. Бере участь у проліферації гліальних клітин та дозріванні й у підтримці астроцитів мозку у стані спокою. ГК накопичується в ЦНС при ураженні, де обмежує астрогліоз, але разом з тим пригнічує дозрівання клітин-попередників олігодендроцитів. Взаємодія ГК з матриксними гіалуронат-зв'язуючими білками і рецепторами регулює багато аспектів поведінки клітин, таких як міграція, міжклітинна адгезія та диференціація [95, 99]. Нещодавно було висловлене припущення, що ГК є не лише фундаментальним структурним елементом перинеурального простору, а й безпосередньо впливає на синаптичну пластичність [120].

Існує велика кількість білків екстрацелюлярного матриксу, поверхні клітини, цитоплазми і ядра, що зв'язують ГК. Білки, які зв'язують даний ГАГ на поверхні клітини, являють собою рецептори ГК. Найбільш відомі серед них: трансмембранний глікопротеїн CD44, рецептор для гіалуронат-опосередкованої рухливості (RHAMM) [195].

При хронічному панкреатиті ацинарна тканина заміщується сполучною тканиною, яка формується внаслідок збільшення відкладання та дезорганізації білків екстрацелюлярного матриксу, включаючи фібронектин, ламінін, колаген I, III, IV типів, а також ГК [43, 117, 157].

РОЗДІЛ 2

ОБ'ЄКТИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Матеріали дослідження

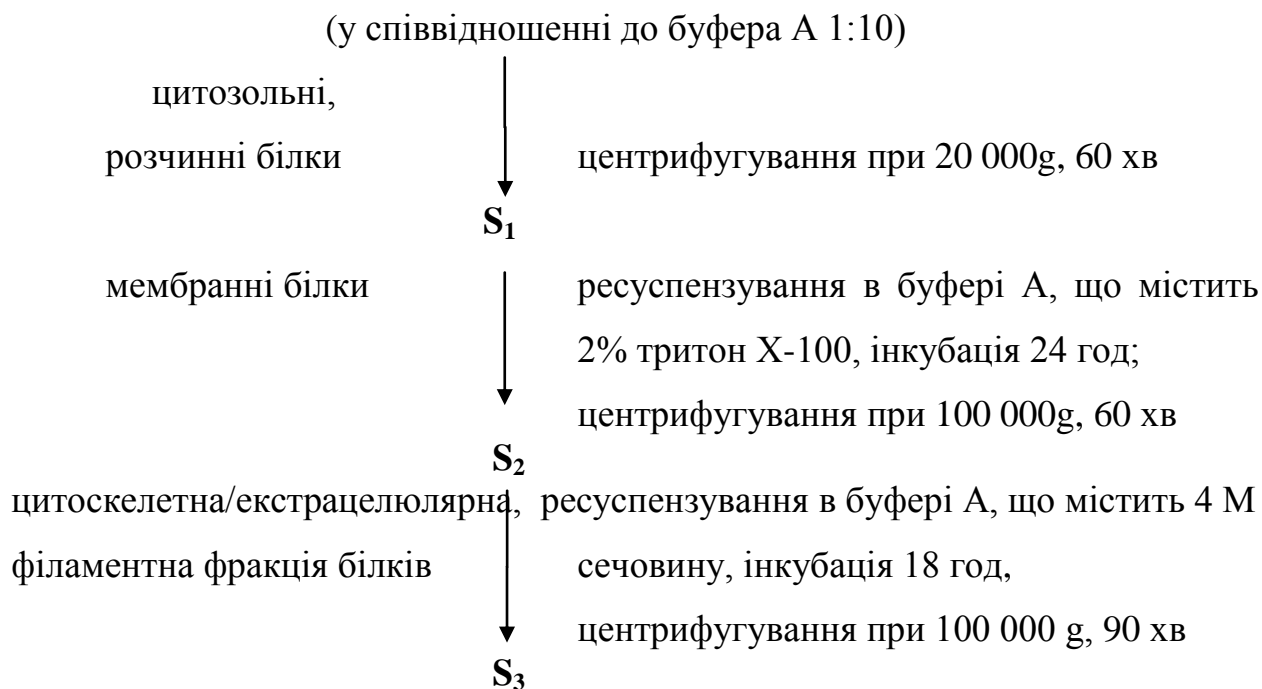
Експериментальну частину роботи було проведено на білих лабораторних щурах 6-місячного віку, вагою 190–210 г (54 самці). Тварини знаходилися в стандартних умовах віварію із циклічністю доби: світло – 12 год, ніч – 12 год. Для досліджень використовували підшлункову залозу, мозок, еритроцити та плазму крові здорових щурів та щурів з експериментальним гострим та хронічним панкреатитом. Хірургічне втручання, пов'язане із короткочасовою та тривалою оклюзією панкреатичної протоки, та декапітацію тварин проводили під наркозом (кетамін гідрохлорид, 110 мг/кг), який вводився внутрішньом'язово.

Дослідження були проведені з використанням хімічно чистих реагентів фірм *Sigma (США)*, *Boehringer (Німеччина)*, *Fluka (Швейцарія)*, *Santa Cruze (США)*, наборів фірми “*Філісіт-діагностика*” (Дніпропетровськ, Україна).

Отримання плазми крові та еритроцитарної маси. Венозну кров (6 мл) збирали у скляні пробірки з гепарином (0,01 мл), відстоювали протягом 2 год при кімнатній температурі та центрифугували 15 хв при 1500 об./хв (3500 g). Плазму крові відбирали у пластикові пробірки та використовували для подальшого аналізу, а еритроцити відмивали, приливаючи до них 5-кратний об'єм фізіологічного розчину, обережно перемішуючи та центрифугуючи 15 хв при 1500 об./хв (3500 g; відмивання проводилося 3 рази). Отримані еритроцити використовували для подальшого дослідження.

Отримання білкових фракцій із відділів головного мозку та підшлункової залози. Отримання білкових фракцій із відділів головного мозку та підшлункової залози щурів проводилось методом центрифугування відповідних гомогенатів в гіпотонічному буфері за наступною схемою:

Гомогенізація тканини із відділів головного мозку та підшлункової залози



Детальніше, мозок щурів очищали від поверхневої плівки та капілярів, вилучали окремо мозочок, таламус та гіпокамп. Гомогенізацію тканин мозку та підшлункової залози проводили в буфері А, що містив трис-НСІ – 25 мМ, рН 7,4; ЕДТО – 1 мМ; β-меркаптоетанол – 2 мМ; фосфометилсульфонілфторид – 0,2 мМ; мертіолят – 0,01%, у співвідношенні 1:10 при температурі +4°C. У ході послідовних стадій центрифугування були виділені фракції, що містили цитозольні (розчинні) та мембранні білки (інкубація гомогенату в буфері А, до якого додатково додавали тритон Х-100 – 2%). Після цього осад ресуспендували в розчині буферу А, до складу якого додавали сечовину – 4 М, екстракція проходила протягом 18 год. Подальше центрифугування проводили при 100 000 g протягом 90 хв, супернатант містив сечовинорозчинні цитоскелетні/екстрацелюлярні білки.

В ході цих послідовних реакцій центрифугування були виділені фракції, що містили розчинні рНМКА, S-100b, рГФКП, гіалуронат-зв'язуючі білки, мембранні мНМКА, гіалуронат-зв'язуючі білки, цитоскелетні/екстрацелюлярні гіалуронат-зв'язуючі білки і філаментні фГФКП. Отримані фракції білків використовували для визначення рівня нейрон- та астроцит-специфічних білків та гіалуронат-зв'язуючої активності білків (ГЗАБ).

2.2. Моделювання хронічного панкреатиту у щурів

Експерименти на щурах здійснювали відповідно до Закону України № 3447-IV від 21.02.06 р. “Про захист тварин від жорстокого поводження” та правил “Європейської конвенції захисту хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей”. Експериментальна модель хронічного панкреатиту була створена за модифікацією моделі В.І. Ріґґа та співавт. [172].

Детальніше, після введення анестетика тварину фіксували за допомогою бинтових тримачів нерухомо на спеціальній дерев'яній дощечці, черево голили (5 см в довжину та 3 см в ширину). Поголене черево змазували розчином йоду. Скальпелем (лезо для скальпелю *Medicare Great Britain, REF: S-SB, №11*) здійснювали лапаротомію: розтинали спочатку шкіряний покрив, а потім внутрішню черевну м'язову стінку. Краї утвореного розрізу змочували фізіологічним розчином та покривали стерильною (з розрізаною серединою) паперовою хустиною. Діставши органи черевної порожнини на хустину, щурам першої групи проводили оклюзію панкреатичної протоки лігатурою “*Ketgut*”, 4/0, що розсмоктується (короткочасова оклюзія панкреатичної протоки) та щурам другої групи – лігатурою “*Prolene*”, 5/0, що не розсмоктується (тривала оклюзія панкреатичної протоки). Ушивання здійснювали постадійно: спочатку внутрішні краї розтину (відокремленими швами), потім зовнішні (суцільний шов) нитками “*Капроаг*” 0 та 2/0, “*Поліамід*” 2/0 монофіламент. Внутрішньочеревинно вводили антибіотик (у вигляді розчину). Зшиті краї обробляли розчином йоду, присипали антибіотиком та заклеювали хірургічним пластирем. Оперативне втручання тривало приблизно 30 хв. Щурам контрольної групи під наркозом виконували лапаротомію та ушивання рани передньої черевної стінки. Прооперованих тварин залишали до виходу зі стану наркозу кожну в окремій клітці, а потім переводили на постійний режим перебування.

Загальна схема експерименту на тваринах представлена на рис 2.1.



Рис. 2.1. Загальна схема експериментального дослідження на тваринах

Залежно від виду оперативного втручання щури були розділені на наступні групи: I – короткочасова оклюзія панкреатичної протоки (n=18); II – тривала оклюзія панкреатичної протоки (n=18); III – псевдооперовані тварини (контрольна група, n=18). По 6 тварин кожної групи виводили з експерименту на 6, 15 і 30 добу дослідження після хірургічної оклюзії панкреатичної протоки. Біохімічний аналіз крові щурів контрольної групи достовірних відмінностей не виявив між 6, 15 та 30 добою експерименту, тому за доцільне вважали об'єднати їх в одну групу псевдооперованих тварин. Контрольну групу для дослідження нейроспецифічних білків та ГЗАБ склали 6 псевдооперованих тварин із виведенням їх з експерименту на 30 добу. Додатково було встановлено, що до 6 доби експерименту рівень нейроспецифічних білків та ГЗАБ у псевдооперованих щурів майже досягав рівня аналогічних показників у інтактних тварин.

2.3. Методика тестування тварин у “відкритому полі”

Дослідження поведінкової активності тварин проводили за допомогою тестування у “відкритому полі” за методом [5]. Тварини були розміщені в спеціально обладнаній кімнаті, коливання температури в ній становило 20-25°C, вологості – від 40-70%, освітлення було природнім. Поведінка щурів визначалася безпосередньо дослідником, який сидів тихо, недалеко від камери (“відкритого поля”), використовуючи комп’ютеризований запис подій. Відкрите поле обробляли 70% розчином етанолу після кожної тварини, для запобігання впливу відволікаючих факторів під час проведення тестування. Всі тести здійснювалися протягом однієї й тієї ж фази світлового циклу. Для формування груп брали щурів зі схожою поведінковою активністю, виключаючи занадто активних та пасивних тварин.

“Відкрите поле” – це велика прямокутна камера розміром 60×60 см з пластмасовими стінками висотою 35 см. Підлогою служить лист білого пластика, на який чорною фарбою нанесена решітка, що ділить поле на 16 (15×15 см) рівних квадратів. В середині кожного квадрата розташована нірка (9 нірок, діаметр кожної 4 см) для визначення орієнтовно-дослідницької активності. Зовнішніми називають 12 квадратів, що прилягають до стінок поля. Внутрішніми вважають 4 квадрата, які не прилягають до стінок поля. Підлога відкритого поля знаходиться на ніжках 50 см заввишки.

Згідно методиці “відкрите поле” щура поміщали в освітлену камеру, розміщуючи його у кутку та орієнтуючи до центру, та дозволяли рухатись по апаратному полю протягом 5 хв. Для дослідження по моделюванню експериментального панкреатиту були відібрані щури зі схожою рухово-дослідницькою та емоційною активністю.

Реєструвалися наступні показники поведінки тварин: периферична активність (кількість перетинів ліній периферичних квадратів “відкритого поля”), центральна активність (кількість перетинів ліній центральних квадратів “відкритого поля”), вертикальна рухова активність (кількість стійок

на задніх лапах), орієнтовно-дослідницька реакція щурів (кількість заглядань в нірки), грумінг (кількість “вмивань”), вегетативний статус (кількість болюсів (уринація, дефекація).

Тестування у “відкритому полі” дозволяє вивчити індивідуально-типологічні особливості поведінки тварин, пов’язані з проблемою індивідуальної стійкості до емоційних стресів. Реєстрацію показників рухово-дослідницької та емоційної активності у тварин з короткочасовою та тривалою оклюзією панкреатичної протоки і у контрольних щурів проводили на 5, 14 та 29 добу після лапаротомії та лігатури панкреатичної протоки.

2.4. Методи визначення біохімічних показників крові

2.4.1. Визначення активності ферментів підшлункової залози в плазмі крові

Для оцінки зовнішньосекреторної функції підшлункової залози визначали в плазмі крові активність панкреатичних ферментів: α -амілази (КФ 3.2.1.1.) тест-набором фірми “Філісім-діагностика”, ліпази (КФ 3.1.1.3.) – за методом [28], трипсину (КФ 3.4.21.4.) – за методом Ерлангера в модифікації Шатернікова [19].

Принцип методу визначення активності α -амілази полягає в тому, що при наявності даного ферменту крохмаль гідролізується до похідних, що не дають кольорової реакції з йодом. Зміна інтенсивності забарвлення йод-крохмального комплексу пропорційна активності α -амілази в пробі та визначається фотометрично при довжині хвилі 640 нм.

Принцип методу визначення ліпази полягає в тому, що під дією ферменту трибутирин гідролізується з вивільненням гліцерину і вільних жирних кислот. Реакція протікає в буфері, попередньо підфарбованому кислотно-основним індикатором в малиновий колір. Утворена під час інкубації масляна кислота змінює рН буферного середовища і ступінь його забарвлення. Інтенсивність забарвлення до та після інкубації вимірюють на

фотоелектроколориметрі (ФЕК) при довжині хвилі 536 нм. За різницею отриманих екстинкцій розраховують ліполітичну активність крові.

Під дією трипсину на синтетичний субстрат N- α -бензоїл-L-аргінін-пара-нітроанлід утворюється бензоїл- α -аргінін і пара-нітроанілін, забарвлений в жовтий колір, екстинкцію якого визначають на спектрофотометрі (СФ-46) при довжині хвилі 410 нм. Про активність трипсину судять по інтенсивності забарвлення розчину.

2.4.2. Визначення ліпідів в плазмі крові

Вміст тригліцеридів та холестеролу визначали за допомогою тест-наборів фірми “Філісіт-діагностика”.

Принцип методу визначення тригліцеридів:

Тригліцериди – ліпаза \rightarrow гліцерин + жирні кислоти;

Гліцерин+АТФ – гліцерокіназа \rightarrow гліцерил-3-фосфат + аденозиндифосфат (АДФ);

Гліцерол-3-фосфат + O₂–гліцерофосфатоксидаза \rightarrow
 \rightarrow диоксіацетонфосфат + 2H₂O₂;

H₂O₂+4-амінофеназон+4-хлорфенол–пероксидаза \rightarrow хінонімін+4H₂O.

Концентрацію хіноніміну визначали фотометрично при довжині хвилі 505 нм, інтенсивність забарвлення якого пропорційна концентрації тригліцеридів в дослідному зразку.

Принцип методу визначення холестеролу:

Ефіри холестеролу – холестеринестераза \rightarrow холестерин + – вільні жирні кислоти;

Холестерол + O₂–холестериноксидаза \rightarrow холестен-3-он+H₂O₂;

2H₂O₂ + 4-амінофеназон+хромоген–пероксидаза \rightarrow хінонімін+4H₂O.

Інтенсивність рожево-червоного або бузкового забарвлення реакційного розчину пропорційна концентрації холестерину та визначаються на ФЕК при довжині хвилі 500–550 нм.

2.4.3. Визначення глюкози в плазмі крові

Визначали рівень глюкози в плазмі крові за допомогою набору фірми “Філісіт-діагностика”. Глюкоза при наявності глюкозооксидази окиснюється O_2 повітря до глюконової кислоти та перекису водню, який при наявності пероксидази реагує з фенолом та 4-амінофеназоном з утворенням хіноніміна червоно-фіолетового кольору, що визначався фотометрично при довжині хвилі 500–550 нм.

2.4.4. Визначення показників окисного стресу та системи антиоксидантного захисту в крові

Для оцінки інтенсивності процесів ПОЛ в плазмі крові визначали вміст ТБК-активних продуктів за інтенсивністю забарвлення триметилового комплексу, який утворюється в кислому середовищі при реагуванні ТБК-активних продуктів з 2-тіобарбітуровою кислотою [46].

Еритроцити відіграють ключову роль в міжорганному і міжтканинному обміні глутатіону і, виконуючи, таким чином, роль інтегративної системи, віддзеркалюють стан загального редокс-статусу організму. Тому зміни редокс-обміну в еритроцитах вказують у тій чи іншій мірі на зміни в інших клітинах. Для визначення в еритроцитах рівня сульфгідрильних груп (SH-) та дисульфідних зв'язків (-S-S-) використовували колориметричний метод, оснований на реакції взаємодії 5,5'-дітіобіс-2-нітробензойної кислоти з SH-групами та -S-S-зв'язками [6]. При рН=8,0 ця кислота взаємодіє з вільними SH-групами білків. В ході цієї реакції відбувається вивільнення тіонітрофенільного аніону, кількість котрого прямопропорційна кількості вільних SH-груп білків, що прореагували з 5,5'-дітіобіс-2-нітробензойною кислотою. При рН=10,5 реакція може продовжуватися за умов, що у білках окрім SH-груп, наявні -S-S-зв'язки. Кількість -S-S-зв'язків розраховували, порівнюючи вміст вільного тіонітрофенільного аніону, що визначався при рН=8,0, та після доведення рН до 10,5. Розраховане тіол-дисульфідне

співвідношення (ТДС), що представляє собою відношення кількості відновлених SH-груп до кількості -S-S-зв'язків.

Для отримання білкового розчину із еритроцитів спочатку проводили їхній гемоліз протягом 25 хв після розведення дистильованою водою (1:10), потім відділяли гемоглобін (Hb): у центрифужні пробірки з 0,25 мл гемолізату послідовно додавали 0,25 мл CHCl_3 , 0,5 мл 96% $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, не перемішували і додавали 300 мг KH_2PO_4 та обережно “притоптували” Hb разом із сіллю до дна пробірки доки не утворювалося 2 фази: знизу – тині еритроцитів та Hb, зверху – білковий розчин. Після центрифугування при 4600 g протягом 20 хв отримували супернатант, що містив цитозольні білки.

Активність глутатіонредуктази (КФ 1.8.1.7.) визначали за методикою [52], а глутатіонпероксидази (КФ 1.11.1.9.) – за методикою [55]. Активність глутатіонредуктази вимірювали спектрофотометрично в гемолізаті еритроцитів (1:40) за зменшенням вмісту нікотинамідаденіндинуклеотидфосфату (НАДФН) у середовищі, що містить 50 мМ K^+ фосфатний буфер (pH=7,4), 1 мМ етилендіамінтетраоцет (ЕДТО), 0,16 мМ НАДФН, 1 мМ окиснений глутатіон при 37°C. Активність виражали в нмоль НАДФН/хв×1 г Hb, приймаючи, що коефіцієнт екстинкції дорівнює $6,22 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Активність Se-залежної глутатіонпероксидази у гемолізаті еритроцитів (1:40) визначали спектрофотометрично при 37°C у середовищі, що містить 0,05 М трис-НСІ буфер з 0,34 мМ ЕДТО (pH=8,5), 1 мМ відновлений глутатіон (GSH), 0,38 мМ H_2O_2 , 10 мМ NaN_3 . Активність виражали в мкмоль GSH/хв×1 г Hb, приймаючи, що коефіцієнт екстинкції дорівнює $6,22 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Для розрахунку активності глутатіонзалежних ферментів вимірювали вміст Hb в крові стандартним тест-набором фірми “Філісіт-діагностика”. Принцип методу визначення даного показника полягає в тому, що Hb при наявності окислювача та ціанід аніонів утворює в водному розчині ціанметгемоглобін, забарвлення якого пропорційне вмісту Hb в крові. Концентрацію відновленого глутатіону визначали в еритроцитах за методом Елмана [13] і виражали в ммоль/л еритроцитів.

2.4.5. Визначення молекул середньої маси в плазмі крові

Рівень ендотоксемії оцінювали за вмістом в плазмі МСМ, які є найбільш універсальними маркерами ендогенної інтоксикації. Визначення концентрації речовин низької і середньої молекулярної маси проводили за методом М.Я. Малахової в модифікації В.В. Ніколайчика [38, 44], який для підвищення точності дослідження запропонував осаджувати білки 0,2 М розчином хлорної кислоти (HClO_4) замість трихлороцтової кислоти (ТХО) з послідуною реєстрацією оптичного поглинання при трьох довжинах хвиль: 230, 254 та 280 нм (результати представлені в оптичних одиницях (опт. од.) для кожної довжини хвилі). При довжині хвилі 280 нм виявлялася фракція МСМ-280, що містила ароматичні амінокислоти; при 254 нм – фракція МСМ-254 – продукти неповного розпаду білків, що мають токсичний вплив; при 230 нм – фракція МСМ-230 – залишки нуклеїнових кислот. Концентрація олігопептидів у складі речовин низької та середньої молекулярної маси оцінювалася за рівнем білка в супернатанті з використанням методу Лоурі (результати визначення МСМ по Лоурі представлені в г/л) [155]. В лужному середовищі іони Cu^{2+} утворюють комплекс з пептидними зв'язками, переходячи в Cu^+ . Одновалентні іони міді реагують з реактивом Фоліна (фосфомолібденова кислота з фенолом) з утворенням нестабільного продукту, що переходить в молібденову синь, з максимумом адсорбції при 750 нм. Збільшення адсорбції при 750 нм пропорційно концентрації білка.

2.4.6. Визначення показників фіброзу підшлункової залози в плазмі крові

Біохімічні маркери плазми крові, що відображають процеси фіброзу в тканині, є гіалуронова кислота (ГК), оксипролін білковозв'язаний (ОПб/зв) та вільний (ОПв).

Загальну кількість глікозаміногліканів (ГАГ) оцінювали за оптичною густиною розчину, що містить комплекс, утворений цими полісахаридами з барвником альціаном блакитним. Важлива особливість цього барвника

полягає в тому, що залежно від кислотності середовища він вибірково утворює комплекси з сульфатованими (кисле середовище) або нессульфатованими (лужне середовище) ГАГ [122].

Ця особливість врахована у відповідних модифікаціях методу Голда. Лужний розчин (рН=8,6), який використовується для забарвлення нессульфатованого ГАГ – гіалуронової кислоти (ГК), містить ацетат натрію – 0,5 М та альціан блакитний – 0,1% (*Fluka, Швейцарія*). 100 мкл проби та 1,2 мл відповідного розчину барвника ретельно перемішується та через 1 хв після утворення суміші визначається оптична густина. Використовували монохроматичне світло, довжина хвилі якого 480 нм. В якості калібрувального стандарту застосовували високоочищену ГК (*Sigma, США*).

Мікрометод визначення ГК: 20 мкл проби приливають в лунку планшета і додають 200 мкл барвника (альціана). Через 15 хв вимірюють екстинкцію на спектрофотометрі (СФ) “*Anthos 2010*” (*Фінляндія*).

Принцип методу визначення ОПб/зв та ОПв полягає в окисненні оксипроліну хлораміном. Продукти реакції після конденсації парадиметиламінобензальдегідом дають хромоген червоного кольору, екстинкцію якого визначають на СФ-46 при довжині хвилі 558 нм [47, 48].

Розраховувався коефіцієнт ОПб/зв (кОПб/зв) та коефіцієнт ОПв (кОПв) і загальний коефіцієнт фіброзу кОПб/зв / кОПв для характеристики прогресування фіброзних змін в підшлунковій залозі в залежності від визначеної морфологічної класифікації стадійності перебігу експериментального панкреатиту для короткочасової та тривалої оклюзії панкреатичної протоки (для групи I: на 6 добу експерименту – запально-некротична стадія гострого панкреатиту, на 15 добу – регенераторно-проліферативна стадія та на 30 добу – стадія відновлення; для групи II: на 6 добу експерименту – запально-некротична стадія гострого панкреатиту, 15 добу – перехідна, атрофічно-префіброзна стадія гострого панкреатиту та на 30 добу виведення – фіброзна стадія хронічного панкреатиту):

перерахування концентрації ОПб/зв та ОПв в умовні одиниці по відношенню до контролю.

Концентрація ОПб/зв в контролі прийнята за 1(ОПб/зв).

$k_{\text{ОПб/зв}}$ в досліді = концентрації ОПб/зв досліджуваної сироватки/концентрацію ОПб/зв в контролі.

Концентрація ОПв в контролі прийнята за 1(ОПв).

$k_{\text{ОПв}}$ в досліді = концентрації ОПв досліджуваної сироватки/концентрацію ОПв в контролі.

Розраховується коефіцієнт співвідношення $k_{\text{ОПб/зв}} / k_{\text{ОПв}}$.

Для розрахунку числових діапазонів біохімічних коефіцієнтів використовувалися статистичні методи [42].

2.4.7. Визначення церулоплазміну в плазмі крові

Визначення концентрації церулоплазміну в плазмі крові щурів проводили за модифікованим методом Равіна, що базується на окисненні п-фенілендіаміну при участі церулоплазміну. Ферментативну реакцію зупиняли додаванням фтористого натрію. За оптичною густиною продуктів, які утворюються, оцінювали концентрацію церулоплазміну. Проби вимірювали на ФЕК при довжині хвилі 530 нм [19].

2.5. Морфологічні методи дослідження підшлункової залози

Для підтвердження розвитку у експериментальних тварин панкреатиту проводили гістохімічне дослідження тканини підшлункової залози, яке включало стандартну її фіксацію в рідині Буена, зневоднення у спиртах зростаючої концентрації та заливку шматочків тканини в парафінові блоки, приготування зрізів та фарбування їх гематоксиліном-еозином (за загальноприйнятим в гістологічній практиці методом), пікрофуксином (за Ван-Гізеном: дає змогу вибірково фарбувати сполучну тканину в червоний колір) [10] та трикольорове якісне фарбування за Малорі–Слінченко [56] і

вивчали за допомогою світлового мікроскопу XSP-139TP, фотографували фотоапаратом Canon A630 (Japan). За аналогічною схемою проводили гістохімічний аналіз зразків печінки експериментальних тварин.

Для проведення комп'ютерної морфометрії, з метою оцінки фіброзних змін підшлункової залози при експериментальному панкреатиті, панкреатобіоптати, отримані інвазивним методом, фотографували та здійснювали вимірювання за допомогою програми ImageJ 1.45S (розроблена в "National Institutes of Health", USA).

2.6. Визначення загальної кількості білка за методом Бредфорд

Для побудови калібрувальних кривих за стандарт використовували розчини бичачого сироваткового альбуміну (БСА). Метод кількісного визначення загального білка (ЗБ) за допомогою кумасі діамантового блакитного G-250 пов'язаний з перетворенням помаранчевого кольору барвника в блакитний при зв'язуванні з білком, при цьому максимум поглинання зміщується відповідно з 465 на 595 нм. У цьому випадку концентрація зв'язаного барвника прямопропорційна концентрації білка в пробі [91]. У слабких розчинах кумасі діамантовий блакитний G-250 має два негативних заряди, тому легко зв'язує основні амінокислоти – лізин, аргінін, гістидин. Метод характеризується в чотири рази вищою чутливістю, ніж метод Лоурі [155]. Забарвлення стабільне протягом 1 год. У незначній мірі на результати впливають буферні компоненти з лужними властивостями, такі як, трис, оцтова кислота, 2-меркаптоетанол, сахароза, гліцерин і слідові кількості детергентів. Цей вплив може бути компенсований шляхом введення відповідних домішок у контрольний розчин.

Мікроваріант методу Бредфорд. Дослідну білкову фракцію або розчини білка-стандарту вносили до лунок планшету по 20 мкл, після чого додавали до них по 200 мкл розчину барвника. Енергійно струшували й через 10 хв визначали оптичну густину при довжині хвилі 620 нм на СФ "Anthos 2010".

Розчин барвника містить кумасі діамантовий блакитний G-250 – 0,01%, етанол – 4,75% та фосфорну кислоту – 8,5%. Після приготування розчин ретельно фільтрували. Реактив стійкий у темному посуді при температурі 20°C протягом 2 тижнів.

2.7. Методика визначення нейроспецифічних білків

Кількісне визначення нейрон- та астроцит-специфічних білків проводили методом твердофазного імуноферментного аналізу [17]. Специфічність НМКА, S-100b та ГФКП у головному мозку обумовлена тим, що їхня експресія нейронами та астроцитами в десятки разів вища, у порівнянні з внутрішніми органами. Головною рисою цього методу, який має численні модифікації, є використання специфічної взаємодії антигену з антитілом. Кількісне визначення нейрональних і гліальних білків у фракціях тканин головного мозку та підшлункової залози проводили згідно зі стандартними методиками конкурентного та імуноферментного аналізу, з використанням моноспецифічних поліклональних антитіл проти НМКА (*Santa Cruze, США*), ГФКП (*Boehringer, США*) та S-100b (*Sigma, США*), відповідно стандартних білків та антитіл проти імуноглобуліна G (Ig G) кролів, мічених пероксидазою хрому (*Sigma, США*).

Визначення рівня нейроспецифічних білків проводили за таким протоколом:

- сорбція до полістиролу частково очищеного білка, розведеного на фосфатному буфері – 50 мМ, рН=6,8 до кінцевої концентрації 0,4 мкг/100 мкл, протягом 18 год при +4°C;
- промивання забуференим фізіологічним розчином (ЗФР) з додаванням твіну 0,05%, рН=7,4 – 3 рази по 5 хв;
- блокування вільних місць зв'язування на полістиролі 1% розчином БСА на ЗФР протягом 1 год при +37°C;

- одночасно проводили преінкубацію у пробірках антитіл до специфічного білка та антигену із дослідних зразків протягом 1 год при $+37^{\circ}\text{C}$;

- по закінченню блокування лунки пластину відмивали ЗФР з додаванням твіну 0,05%, $\text{pH}=7,4$, 3 рази по 10 хв, та вносили преінкубовану суміш у лунку планшету; інкубацію проводили протягом 18 год при $+4^{\circ}\text{C}$;

- промивання ЗФР з твіном, 3 рази по 5 хв;

- інкубація з вторинними антитілами проти IgG кролів, міченими пероксидазою хрому, протягом 1,5 год при $+37^{\circ}\text{C}$;

- промивання ЗФР з твіном, 3 рази по 5 хв;

- фарбування розчином ортофенілендіамін (ОФД) 0,05%, що містить H_2O_2 – 0,015% та цитрат – 0,2%, $\text{pH}=5,5$ (до розвитку стабільного кольору);

- зупинка реакції розчином HCl – 2 М.

Для побудови калібрувальних кривих використовували розчини очищених антигенів НМКА – *Santa Cruze (США)*, S-100b – *Sigma (США)*, ГФКП – *Boehringer (Німеччина)* з визначеною концентрацією, інші процедури проводили за наведеними вище схемами. Для оцінки результатів проводили вимірювання оптичної густини на СФ “*Anthos 2010*” при довжині хвилі 492 нм.

Кількісне значення білків у пробі визначали як відношення кількості нейрональних і гліальних білків в пробі до кількості загального білка у даній пробі (мкг НМКА (ГФКП або S-100b)/мг ЗБ).

2.8. Методика визначення гіалуронат-зв’язуючої активності білків

Перед визначенням гіалуронат-зв’язуючої активності білків проводили синтез вуглевод-ферментного кон’югату. Кон’югат ГК із пероксидазою хрому готували по методиці [109]. ГАГ – 2,5 мг/мл, розчиняли в

бікарбонатному буфері – 0,3 М, рН=9,5. З метою екранування аміногруп, у розчин вуглеводів додавали спиртовий розчин динітрофторбензолу – 0,01%, у співвідношенні 1:10 (інкубація 30 хв при кімнатній температурі). Для кон'югації з молекулами пероксидази хрому частина карбоксильних груп повинна бути перетворена на альдегідні. Для цього в реакційну суміш додавали рівний об'єм водного розчину перйодату натрію – 80 мМ (інкубація 30 хв при кімнатній температурі, постійне перемішування). Перйодатне окиснення зупиняли розчином етиленгліколю – 0,16 М (інкубація 60 хв при кімнатній температурі). Отриманий розчин діалізували проти бікарбонатного буферу – 10 мМ, рН=9,5. Ліофілізовану пероксидазу хрому розчиняли в отриманому розчині вуглеводу в кінцевій концентрації 1,5 мг/мл (інтенсивне перемішування протягом 5 год при кімнатній температурі). Пероксидазу, що не зв'язалася з вуглеводами, відокремлювали від кон'югату за допомогою гель-фільтрації на сефадексі G-100.

Для визначення загальної гіалуронат-зв'язуючої активності білків (ГЗАБ) в отриманих фракціях головного мозку та підшлункової залози був використаний твердофазний вуглевод-ферментний аналіз [109]. Цей метод є модифікацією твердофазного імуоферментного аналізу. Його особливість полягає у використанні кон'югату, що складається з ГК з нашітою ферментною міткою. Для проведення мікрометоду з різними фракціями головного мозку та підшлункової залози були підібрані оптимальні умови сорбції та зв'язування сорбованих білків з відповідними ГАГ. Аналіз проводили в плоскодонних 96-луночних планшетах, за наступною схемою:

- сорбція до полістиролу планшету білків дослідної проби, яка розведена на фосфатному буфері – 10 мМ, рН=6,0 (інкубація 12 год, при +4°C);
- промивання ЗФР з твіном – 0,05%, рН=7,4, 3 рази по 5 хв;
- блокування вільних місць зв'язування на полістиролі розчином БСА – 1% на ЗФР (інкубація 1 год при кімнатній температурі);
- промивка фосфатним буфером – 10 мМ, рН=6,8 (3 рази по 5 хв);

- інкубація з ферментним кон'югатом, що розведений на ацетатному буфері – 0,2 мМ, рН=5,0 протягом 1 год, при кімнатній температурі;
- промивка фосфатним буфером – 10 мМ, рН=6,8 (3 рази по 5 хв);
- фарбування розчином ОФД – 0,05% та H_2O_2 – 0,015% на цитрат-фосфатному буфері – 0,1 М, рН=5,0;
- зупинка реакції HCl – 2М.

Для побудови калібрувальних кривих використовували розчини кон'югату з визначеною концентрацією ГК, інші процедури проводили за наведеною вище схемою. Для оцінки результатів проводили вимірювання оптичної густини на СФ “*Anthos 2010*” при довжині хвилі 492 нм. Кількісне значення гіалуронат-з'язуючої активності білків у пробі визначалося, як відношення кількості ГК, що зв'язалася із сорбованими білками проби до кількості загального білка у даній пробі (нг зв'яз. ГК/мг ЗБ).

2.10. Статистична обробка результатів

Отримані дані вводились в базу даних, побудовану за допомогою електронних таблиць *Microsoft Excel* під керуванням оболонки *Windows XP Professional*. Статистичну обробку результатів здійснювали методами варіаційної статистики, реалізованими стандартним пакетом прикладних програм *SPSS for Windows 13.0*. Для статистичного аналізу даних використовували середнє арифметичне вибірки (М), стандартну помилку середнього (m). Порівняння середніх значень змінних здійснювали за допомогою параметричних методів (критерію t Стьюдента) за нормального розподілу цих ознак, що виражені в інтервальній шкалі. Відповідність виду розподілу ознак закону нормального розподілення перевіряли за допомогою методу Шапіто-Уїлка. Різниця середніх значень вважалася вірогідною, якщо досягнутий рівень значущості (P) був меншим за 0,05. Для визначення ступеня взаємозв'язку між двома показниками проведений кореляційний аналіз із визначенням достовірних коефіцієнтів кореляції Пірсона – r [42].

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ

3.1. Зміни біохімічних показників крові у щурів за умов експериментального панкреатиту

3.1.1. Зміни активності ферментів підшлункової залози у крові щурів за умов експериментального панкреатиту

Для гострих атак панкреатиту характерне надходження цих ферментів в кров як непряме свідчення пошкодження ацинарних клітин і порушення відтоку панкреатичного секрету. Так, у щурів з короткочасовою та тривалою оклюзією панкреатичної протоки на 6 добу експерименту спостерігалось вірогідне підвищення активності α -амілази на 139% ($P < 0,001$) та 205% ($P < 0,001$), ліпази – на 52% ($P < 0,05$) та 91% ($P < 0,001$), трипсину – на 140% ($P < 0,001$) та 223% ($P < 0,001$) відповідно, порівняно з контролем. У щурів I групи на 15 добу дослідження підвищення активності ферментів у крові було менш вираженим, порівняно з попередніми значеннями (зниження активності α -амілази на 29% ($P < 0,05$), трипсину на 44% ($P < 0,001$) відносно 6 доби експерименту), але залишалось високим відносно контролю: α -амілаза на 70% ($P < 0,01$), трипсин на 34% ($P < 0,05$). На 30 добу експерименту на стадії відновлення активність ферментів у крові щурів цієї ж групи досягла меж фізіологічної норми, що пояснюється раннім розсмоктуванням лігатури та відновленням нормального функціонування протоки підшлункової залози і органу. Але слід відмітити установлене вірогідне зниження у плазмі крові цих тварин активності α -амілази на 51% ($P < 0,001$), а трипсину на 50% ($P < 0,001$), порівняно з 6 добою, а також активності α -амілази на 31% ($P < 0,05$), порівняно з 15 добою дослідження. Про тривале запалення в підшлунковій залозі щурів II групи на 15 добу експерименту (атрофічно-префіброзна стадія гострого панкреатиту) свідчила підвищена активність α -амілази на 130% ($P < 0,001$), ліпази – на 81% ($P < 0,01$) і трипсину – на 170% ($P < 0,001$) відносно контролю (табл. 1).

Активність α -амілази, ліпази та трипсину у крові щурів за умов експериментального панкреатиту ($M \pm m$)

Показники	Контрольна група (n=18)	Доба	I група (n=18)	II група (n=18)
α -Амілаза, мг/с·л	62,55 \pm 0,23	6 доба	149,29 \pm 13,37***	190,80 \pm 23,70***
		15 доба	106,55 \pm 9,84**•	144,10 \pm 16,00***
		30 доба	73,44 \pm 7,42••#	91,50 \pm 6,40**••#
Ліпаза, нмоль/с·л	1,10 \pm 0,20	6 доба	1,67 \pm 0,15*	2,10 \pm 0,09***
		15 доба	1,38 \pm 0,19	1,99 \pm 0,20**
		30 доба	1,15 \pm 0,22	1,60 \pm 0,09*••
Трипсин, мкмоль/мл·хв	6,40 \pm 0,70	6 доба	15,35 \pm 1,00***	20,70 \pm 1,60***
		15 доба	8,60 \pm 0,50*••	17,30 \pm 1,50***
		30 доба	7,70 \pm 0,75••	11,60 \pm 0,70***•••##

Примітки: *,**,*** – різниця вірогідна, порівняно з контролем, $P < 0,05$, $P < 0,01$, $P < 0,001$ відповідно; •,••,••• – різниця вірогідна, порівняно з 6 добою дослідження, $P < 0,05$, $P < 0,01$, $P < 0,001$ відповідно; #, ## – різниця вірогідна, порівняно з 15 добою дослідження, $P < 0,05$, $P < 0,01$ відповідно

На 30 добу дослідження на фіброзній стадії хронічного панкреатиту активність ферментів була зниженою, порівняно із запально-некротичною стадією гострого панкреатиту: α -амілаза – на 52% ($P < 0,01$), ліпаза – на 24% ($P < 0,01$), трипсин – на 44% ($P < 0,001$), але відносно контролю активність α -амілази залишалася підвищеною на 46% ($P < 0,01$), ліпази – на 46% ($P < 0,05$), трипсину – на 81% ($P < 0,001$) (див. табл. 1).

3.1.2. Зміни вмісту ліпідів у крові щурів за умов експериментального панкреатиту

У результаті ураження підшлункової залози внаслідок розвитку панкреатиту порушується не тільки метаболізм вуглеводів, але й транспорт ліпідів. У щурів I групи достовірних змін у концентрації як тригліцеридів, так і холестеролу у плазмі крові не спостерігалось. Виражені зміни рівня

ліпідів відмічалися у II групі тварин вже на перехідній, атрофічно-префіброзній стадії гострого панкреатиту: відбувалося вірогідне збільшення в плазмі крові рівня тригліцеридів відносно контролю на 55% ($1,55 \pm 0,13$ проти $1,00 \pm 0,06$ ммоль/л; $P < 0,01$), а холестеролу – на 27% ($1,62 \pm 0,07$ проти $1,28 \pm 0,09$ ммоль/л) (рис. 3.1, рис. 3.2).

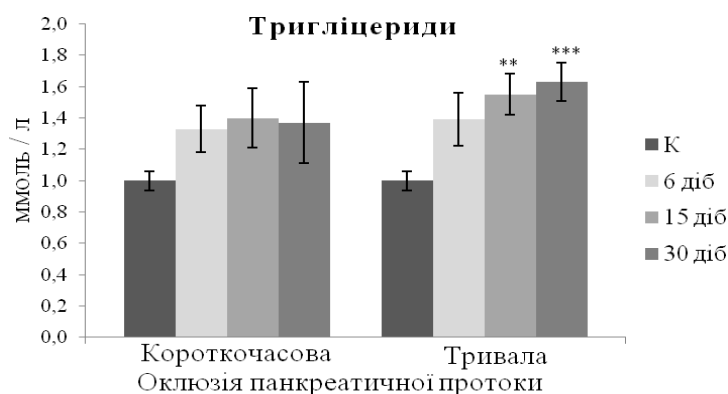


Рис. 3.1. Динаміка зміни вмісту тригліцеридів у плазмі крові щурів за умов експериментального панкреатиту

Примітки: К – контроль – псевдооперовані тварини, $n=18$; **, *** – різниця вірогідна, порівняно з контролем, $P < 0,01$, $P < 0,001$ відповідно, $n=6$

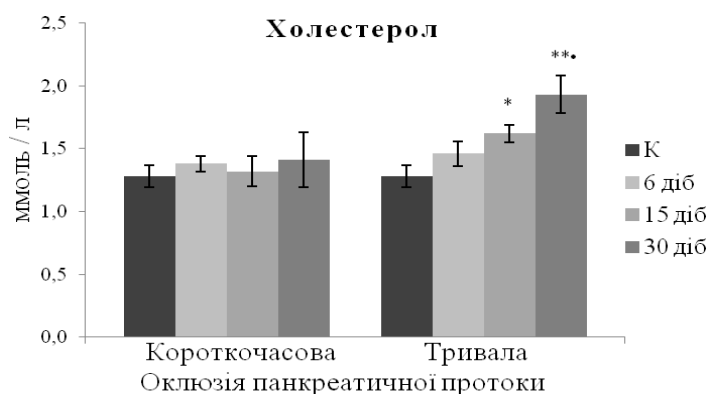


Рис. 3.2. Динаміка зміни вмісту холестеролу у плазмі крові щурів за умов експериментального панкреатиту

Примітки: К – контроль – псевдооперовані тварини, $n=18$; *, ** – різниця вірогідна, порівняно з контролем, $P < 0,05$, $P < 0,01$ відповідно, $n=6$; • – різниця вірогідна, порівняно з 6 добою дослідження, $P < 0,05$, $n=6$

У щурів на фіброзній стадії хронічного панкреатиту було відмічено зростання вмісту даних показників відносно контрольного значення на 63%

(до $1,63 \pm 0,12$ ммоль/л; $P < 0,001$) та 51% (до $1,93 \pm 0,15$ ммоль/л; $P < 0,01$) відповідно для тригліцеридів та холестеролу. Відзначалася вірогідна різниця для холестеролу між 6 і 30 добою експерименту на 32% ($P < 0,05$) (див. рис. 3.1, рис. 3.2).

3.1.3. Зміни вмісту глюкози у крові щурів за умов експериментального панкреатиту

Існує пряма залежність між ступенем морфологічних склеротичних змін паренхіми підшлункової залози і вираженістю функціональних порушень обміну глюкози. Вважається, що в основі розвитку даних змін лежить ураження клітин острівкового апарату залози, в результаті чого зменшується кількість і активність β -клітин, а також число рецепторів до інсуліну, розвивається інсулінорезистентність з наступним порушенням вуглеводного і ліпідного обмінів. На фіброзній стадії хронічного панкреатиту у щурів з тривалою оклюзією панкреатичної протоки відбувалося зростання в плазмі крові вмісту глюкози на 69% (з $3,18 \pm 0,42$ до $5,37 \pm 0,38$ ммоль/л; $P < 0,01$), порівняно з контролем, та на 61% (з $3,34 \pm 0,71$ ммоль/л до $5,37 \pm 0,38$ ммоль/л; $P < 0,05$), порівняно із запально-некротичною стадією гострого панкреатиту (рис. 3.3).

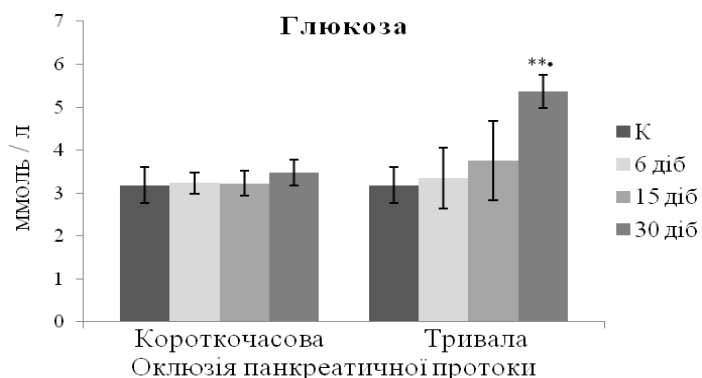


Рис. 3.3. Динаміка зміни вмісту глюкози у плазмі крові щурів за умов експериментального панкреатиту

Примітки: К – контроль – псевдооперовані тварини, $n=18$; ** – різниця вірогідна, порівняно з контролем, $P < 0,01$, $n=6$; • – різниця вірогідна, порівняно з 6 добою дослідження, $P < 0,05$, $n=6$

У щурів I групи достовірних змін вмісту глюкози в плазмі крові протягом експерименту не спостерігалось (див. рис. 3.3).

Оскільки вираженість порушення обміну глюкози залежить від ступеня фіброзних змін паренхіми підшлункової залози, то закономірним було виявлене прогресуюче підвищення вмісту даного показника в крові щурів на фіброзній стадії хронічного панкреатиту.

3.1.4. Зміни показників ліпопероксидації та системи антиоксидантного захисту у крові щурів за умов експериментального панкреатиту

Для оцінки ступеня мембранної патології панкреатитів визначався вміст ТБК-активних продуктів в плазмі крові тварин, і було встановлено його вірогідне збільшення у щурів I та II груп на 6 добу дослідження відповідно на 31% ($5,91 \pm 0,23$ проти $4,50 \pm 0,23$ нмоль/мл; $P < 0,01$) та 24% ($5,57 \pm 0,16$ проти $4,50 \pm 0,23$ нмоль/мл; $P < 0,01$) відносно контролю, що свідчило про активацію процесів ліпопероксидації (рис. 3.4).

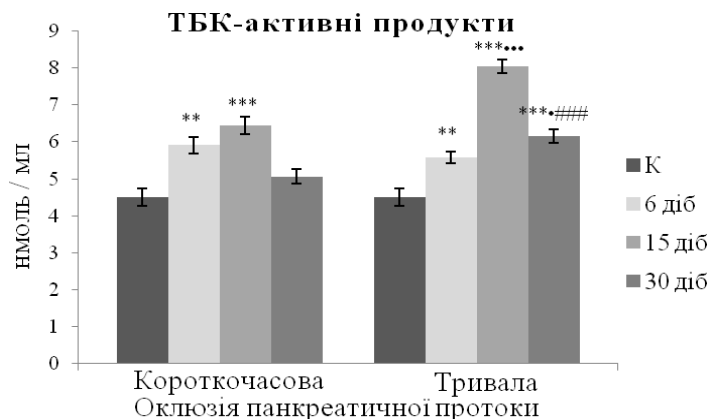


Рис. 3.4. Вміст ТБК-активних продуктів в плазмі крові щурів за умов експериментального панкреатиту

Примітки: К – контроль – псевдооперовані тварини, $n=18$; **, *** – різниця вірогідна, порівняно з контролем, $P < 0,01$, $P < 0,001$ відповідно, $n=6$; •, ••• – різниця вірогідна, порівняно з 6 добою дослідження, $P < 0,05$, $P < 0,001$ відповідно, $n=6$; #### – різниця вірогідна, порівняно з 15 добою дослідження, $P < 0,001$, $n=6$

На 15 добу експерименту спостерігалася максимальна інтенсифікація процесів ПОЛ – зростання рівня ТБК-активних продуктів відносно контролю відповідно для двох груп на 43% (до $6,44 \pm 0,24$ нмоль/мл; $P < 0,001$) та 79% (до $8,05 \pm 0,19$ нмоль/мл; $P < 0,001$). На 30 добу дослідження у I групі щурів відбувалось зниження всісту вільнорадикальних процесів, тоді як у II групі рівень ТБК-активних продуктів був все ще вищим за контроль на 37% ($6,16 \pm 0,18$ порівняно з $4,50 \pm 0,23$ нмоль/мл; $P < 0,001$) та за аналогічний показник на запально-некротичній стадії гострого панкреатиту на 11% ($P < 0,05$), але нижчим на 24% ($P < 0,001$), ніж на атрофічно-префіброзній стадії гострого панкреатиту (див. рис. 3.4). Таким чином, до кінця другого тижня хірургічної оклюзії спостерігалася максимальна інтенсифікація процесів ліпопероксидації, що зумовлювало утворення вторинних продуктів ПОЛ у крові, здатних інактивувати катіонні помпи, мембранні білки, ферменти.

Зміна вмісту тіолових груп (SH-груп) білків в клітині вказує на порушення в ній окисно-відновних процесів, у котрих сульфгідрильні групи відіграють важливу роль, то важливо було з'ясувати стан тіол-дисульфідної системи в еритроцитах щурів з експериментальним панкреатитом на різних етапах його розвитку. У I групі тварин протягом експерименту спостерігалася тенденція до зниження вмісту SH-груп (рис. 3.5).

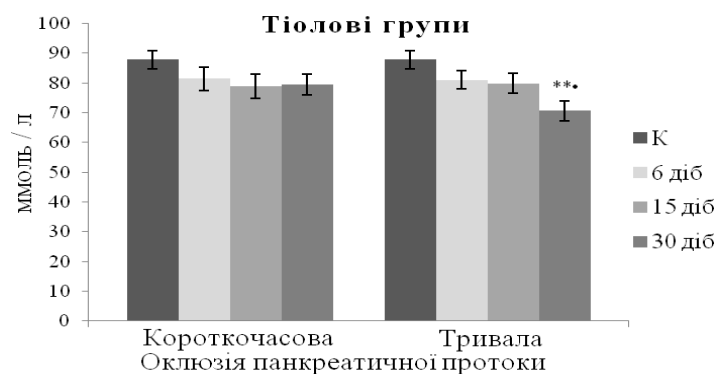


Рис. 3.5. Динаміка зміни вмісту тіолових груп в еритроцитах щурів за умов експериментального панкреатиту

Примітки: К – контроль – псевдооперовані тварини, $n=18$; ** – різниця вірогідна, порівняно з контролем, $P < 0,01$, $n=6$; • – різниця вірогідна, порівняно з 6 добою дослідження, $P < 0,05$, $n=6$

Встановлено зниження їхнього рівня в еритроцитах щурів II групи на фіброзній стадії хронічного панкреатиту відносно контролю (на 20% у середньому з $87,85 \pm 3,13$ до $70,64 \pm 3,27$ ммоль/л; $P < 0,01$) та відносно аналогічного показника на запально-некротичній стадії гострого панкреатиту (на 13% з $81,05 \pm 3,14$ до $70,64 \pm 3,27$ ммоль/л; $P < 0,05$) (див. рис. 3.5).

Вміст дисульфідних зв'язків (-S-S-зв'язки) поступово зростає у групі тварин з короткочасовою оклюзією панкреатичної протоки ($P > 0,05$), а у групі щурів з тривалою оклюзією панкреатичної протоки він збільшувався на 32% ($11,86 \pm 0,48$ проти $9,00 \pm 1,07$ ммоль/л; $P < 0,05$) на 6 добу, на 38% ($12,45 \pm 0,73$ проти $9,00 \pm 1,07$ ммоль/л; $P < 0,05$) – на 15 добу і на 45% ($13,09 \pm 0,70$ проти $9,00 \pm 1,07$ ммоль/л; $P < 0,05$) – на 30 добу експерименту (рис. 3.6). Отримані дані підтверджені зворотнім кореляційним зв'язком, встановленим у II групі щурів у залежності від тривалості захворювання: із зниженням вмісту SH-груп зростає вміст -S-S-зв'язків ($r = -0,723$, $P < 0,001$).

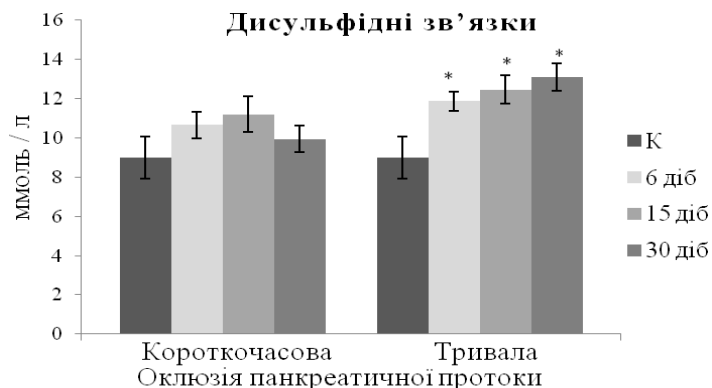


Рис. 3.6. Динаміка зміни рівня дисульфідних зв'язків в еритроцитах щурів за умов експериментального панкреатиту

Примітки: К – контроль – псевдооперовані тварини, $n=18$; * – різниця вірогідна, порівняно з контролем, $P < 0,05$, $n=6$

У щурів I групи на 15 добу дослідження на регенераторно-проліферативній стадії відмічалось вірогідне зниження ТДС – показника, що виражає зміни в тіол-дисульфідному співвідношенні, відносно контролю на 31% (з $10,30 \pm 0,96$ до $7,15 \pm 0,40$; $P < 0,05$) (рис. 3.7).

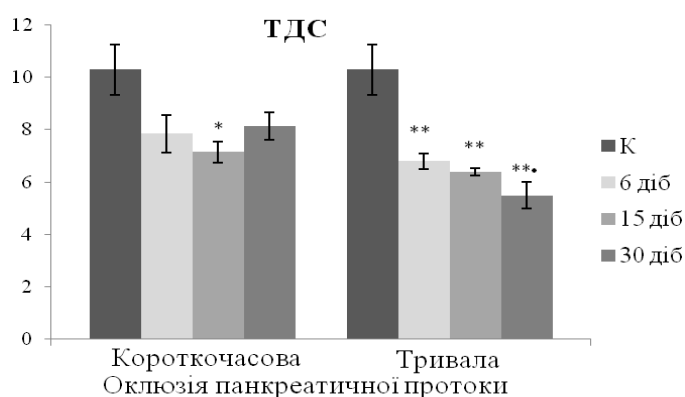


Рис. 3.7. Динаміка зміни тіол-дисульфідного співвідношення в еритроцитах щурів за умов експериментального панкреатиту

Примітки: К – контроль – псевдооперовані тварини, n=18; *, ** – різниця вірогідна, порівняно з контролем, P<0,05, P<0,01 відповідно, n=6; • – різниця вірогідна, порівняно з 6 добою дослідження, P<0,05, n=6

Протягом всього експерименту у тварин II групи спостерігалось вірогідне зниження ТДС на 34% (до $6,80 \pm 0,30$; P<0,01), 38% (до $6,39 \pm 0,15$; P<0,01) та 46,7% (до $5,49 \pm 0,50$; P<0,01) відповідно для 6, 15 та 30 доби дослідження, порівняно з контролем (див. рис. 3.7). У тварин на фіброзній стадії хронічного панкреатиту зниження ТДС було вірогідно нижчим на 19,3% (P<0,05), ніж на запально-некротичній стадії гострого панкреатиту.

Згідно отриманих даних, вірогідне зниження вмісту відновленого глутатіону в еритроцитах тварин I та II групи досягло відповідно 19% (до $1,90 \pm 0,12$ ммоль/л; P<0,01) та 16% (до $1,97 \pm 0,07$ ммоль/л; P<0,01), порівняно з контролем ($2,34 \pm 0,07$ ммоль/л). Більш суттєве зниження концентрації даного показника, порівняно з контрольною групою, спостерігалось на 15 добу експерименту – на 24% (до $1,78 \pm 0,07$ ммоль/л; P<0,001) та 21% (до $1,86 \pm 0,12$ ммоль/л; P<0,01) відповідно для двох груп. Рівень відновленого глутатіону в еритроцитах щурів I групи з 30 добовою хірургічною оклюзією панкреатичної протоки хоч і залишався зниженим на 18% (до $1,91 \pm 0,06$ ммоль/л; P<0,001), порівняно з контролем, проте спостерігалася тенденція до його поступового підвищення. Концентрація даного показника продовжувала вірогідно знижуватися у щурів II групи при хронічному панкреатиті на 26%

(до $1,73 \pm 0,06$ ммоль/л; $P < 0,01$), порівняно з контролем, та на 12% ($P < 0,05$), порівняно з запально-некротичною стадією гострого панкреатиту, що свідчило про виснаження компенсаторних можливостей глутатіонової ланки в еритроцитах (рис. 3.8).

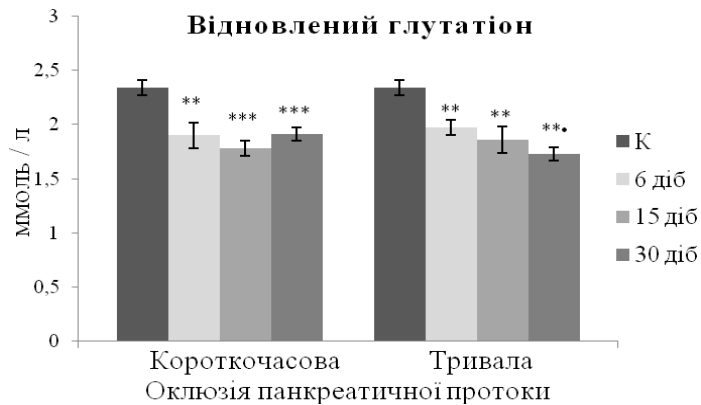


Рис. 3.8. Динаміка зміни вмісту відновленого глутатіону в еритроцитах щурів за умов експериментального панкреатиту

Примітки: К – контроль – псевдооперовані тварини, $n=18$; **, *** – різниця вірогідна, порівняно з контролем, $P < 0,01$, $P < 0,001$ відповідно, $n=6$; • – різниця вірогідна, порівняно з 6 добою дослідження, $P < 0,05$, $n=6$

Нестача відновленого глутатіону при панкреатиті викликає пригнічення активності глутатіонпероксидази. Слід відзначити відсутність вірогідних змін активності цього ферменту у I групі тварин, спостерігалася лише тенденція до її зниження протягом дослідження. У щурів II групи на запально-некротичній стадії гострого панкреатиту відзначалося незначне зниження активності глутатіонпероксидази в еритроцитах, порівняно з контролем. У тварин на атрофічно-префіброзній стадії гострого панкреатиту активність ферменту була вже на 16% нижчою за контроль ($170,85 \pm 5,37$ порівняно з $202,80 \pm 13,76$ мкмоль ГSH/хв·гНб; $P < 0,05$), а на фіброзній стадії хронічного панкреатиту дане зниження досягло 22% (до $157,36 \pm 8,54$ мкмоль ГSH/хв·гНб; $P < 0,05$). У II групі тварин між 6 та 30 добою експерименту різниця в активності цього ферменту була достовірною ($P < 0,05$) (рис. 3.9).

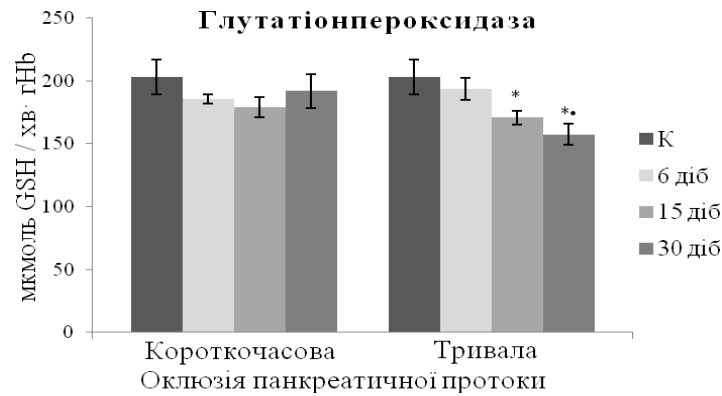


Рис. 3.9. Динаміка зміни активності глутатіонпероксидази в еритроцитах щурів за умов експериментального панкреатиту

Примітки: К – контроль – псевдооперовані тварини, $n=18$; * – різниця вірогідна, порівняно з контролем, $P<0,05$, $n=6$; • – різниця вірогідна, порівняно з 6 добою дослідження, $P<0,05$, $n=6$

Оскільки глутатіонпероксидаза в еритроцитах зосереджена в цитозолі, то має дуже широкий “фронт роботи” і при нестачі цього ферменту можна прогнозувати погіршення функціонального статусу щурів з панкреатитом.

Аналогічні зміни стосувалися й глутатіонредуктази: вірогідних змін її активності у групі щурів з короткочасовою оклюзією панкреатичної протоки не відзначалося, спостерігалася лише тенденція до зниження протягом експерименту, а у тварин з тривалою оклюзією протоки підшлункової залози зниження активності цього ферменту було більш виражене. Так, на 15 добу експерименту активність глутатіонредуктази була нижчою, ніж у контролі, на 18% ($6,38 \pm 0,54$ порівняно з $5,24 \pm 0,05$ нмоль НАДФН/хв·гНв; $P<0,05$), а на 30 добу – на 21% (до $5,04 \pm 0,26$ нмоль НАДФН/хв·гНв; $P<0,05$) (рис. 3.10). Отримані дані вказують на виражене порушення у щурів II групи рівноваги в системі ПОЛ-АОЗ в бік активації процесів вільнорадикального окиснення на фоні зниження захисних механізмів організму, що призводить до вивільнення у системний кровоплин продуктів ліпопероксидації та ендотоксинів і сприяє розвитку ендогенної інтоксикації, в результаті чого виникає дисбаланс численних біохімічних і нейрофізіологічних процесів, що може впливати на важкість перебігу захворювання.

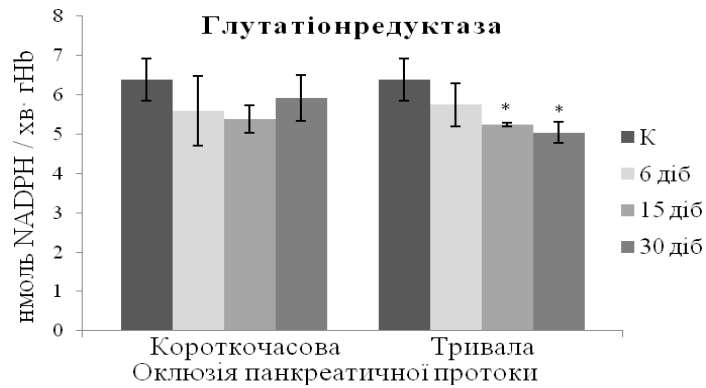


Рис. 3.10. Динаміка зміни активності глутатіонредуктази в еритроцитах щурів за умов експериментального панкреатиту

Примітки: К – контроль – псевдооперовані тварини, n=18; * – різниця вірогідна, порівняно з контролем, P<0,05, n=6

3.1.5. Зміни рівня ендогенної інтоксикації у крові щурів за умов експериментального панкреатиту

Показано значний вплив ураження підшлункової залози на вміст молекул середньої маси (МСМ), що виражався у збільшенні їхньої концентрації в плазмі крові щурів I та II груп на 6 добу дослідження відносно контролю на 89% ($1479,09 \pm 136,94$ проти $781,25 \pm 31,65$ мг/л; P<0,001) та 104% (до $1597,26 \pm 107,08$ мг/л; P<0,001) відповідно, що свідчило про високий рівень ендогенної інтоксикації організму. Дещо нижчий рівень МСМ відзначався на 15 добу експерименту, проте був все ж вірогідно вищим на 49% (до $1164,57 \pm 94,76$ мг/л; P<0,01) та на 54% (до $1201,90 \pm 85,55$ мг/л; P<0,001), порівняно з контролем, відповідно двох типів хірургічної оклюзії панкреатичної протоки. У щурів II групи на фіброзній стадії хронічного панкреатиту вміст МСМ в плазмі крові тварин залишався вищим від контрольного значення на 57% (до $1228,27 \pm 109,47$ мг/л; P<0,01), але був зниженим відносно аналогічного показника на запально-некротичній стадії гострого панкреатиту на 23% (P<0,05); тоді як у щурів I групи на стадії відновлення рівень МСМ значно знижувався порівняно з попередніми показниками на 6 (на 37%; P<0,01) та 15 добу (рис. 3.11).

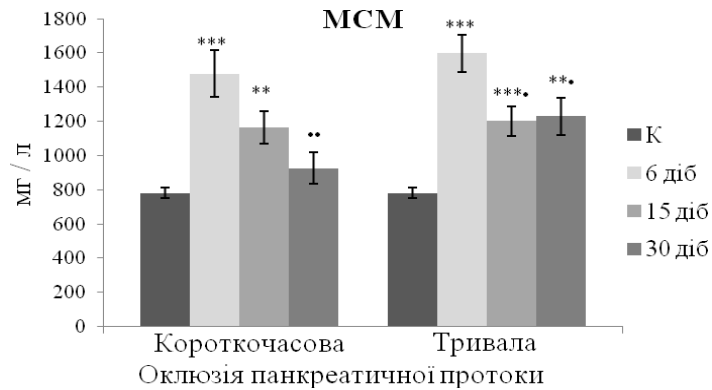


Рис. 3.11. Динаміка зміни вмісту молекул середньої маси у плазмі крові щурів за умов експериментального панкреатиту

Примітки: К – контроль – псевдооперовані тварини, n=18; **, *** – різниця вірогідна, порівняно з контролем, $P<0,01$, $P<0,001$ відповідно, n=6; •, •• – різниця вірогідна, порівняно з 6 добою дослідження, $P<0,05$, $P<0,01$ відповідно, n=6

Не виключено, що зміна вмісту фракцій МСМ при панкреатиті має безпосереднє відношення до розвитку патологічного процесу, і тому спектр МСМ-230, МСМ-254, МСМ-280 можна розглядати в якості об'єктивного критерію метаболічних порушень. Аналіз спектрів поглинання світла кислото-розчинної фракції плазми крові в діапазоні 230-280 нм показав, що всі фракції МСМ, які аналізувалися, в дослідних групах щурів перевищували контрольні показники. Так, середня фракція МСМ, що містить переважно ендogenous патогени у вигляді білків-гістонів, продуктів руйнування ДНК, які вийшли з цитозолу в міжклітинне середовище, лімфотік і кров при порушенні цілісності клітинних мембран (нуклеарная фракція) і визначена при довжині хвилі 230 нм, у групі щурів з 6 добовою короткочасовою та тривалою оклюзією панкреатичної протоки вірогідно збільшилася відповідно на 105% (до $0,809\pm 0,061$ ум.од.; $P<0,001$) та 115% (до $0,847\pm 0,062$ ум.од.; $P<0,001$), з 15 добовою – на 45% (до $0,571\pm 0,056$ ум.од.; $P<0,05$) та 55% (до $0,611\pm 0,061$ ум.од.; $P<0,01$), порівняно з контролем ($0,394\pm 0,012$ ум.од.). Слід відзначити вірогідну різницю зниження рівня даного показника на 15 добу на 29% ($P<0,05$) та 28% ($P<0,05$), у порівнянні з 6 добою дослідження, відповідно для обох груп щурів.

Вміст МСМ-230 вірогідно зростав у тварин I та II груп з 30 добовою оклюзією панкреатичної протоки відповідно на 22% (до $0,480 \pm 0,025$ ум.од.; $P < 0,05$) та 64% (до $0,647 \pm 0,071$ ум.од.; $P < 0,01$), у порівнянні з контролем, проте відповідно на 41% ($P < 0,05$) та 24% ($P < 0,05$) знижувався відносно 6 доби дослідження (рис. 3.12).

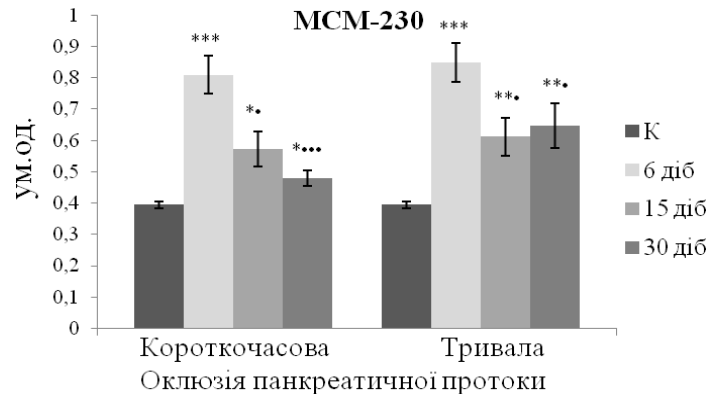


Рис. 3.12. Динаміка зміни вмісту молекул середньої маси (МСМ-230) у плазмі крові щурів за умов експериментального панкреатиту

Примітки: К – контроль – псевдооперовані тварини, $n=18$; *, **, *** – різниця вірогідна, порівняно з контролем, $P < 0,05$, $P < 0,01$, $P < 0,001$ відповідно, $n=6$; •, *** – різниця вірогідна, порівняно з 6 добою дослідження, $P < 0,05$, $P < 0,001$ відповідно, $n=6$

Токсична фракція (визначається при довжині хвилі 254 нм) складається з токсинів, що володіють високою спорідненістю до біологічних структур, які знаходяться в плазмі у практично повністю зв'язаному стані у вигляді комплексів з альбуміном або ліпопротеїнами низької щільності, і змінюється менш суттєво. Вміст пептидної фракції МСМ-254 в обох групах щурів на 6 добу експерименту збільшувався відповідно на 129% (до $0,071 \pm 0,008$ ум.од.; $P < 0,01$) та 145% (до $0,076 \pm 0,005$ ум.од.; $P < 0,001$), у порівнянні з контролем ($0,031 \pm 0,004$ ум.од.). Достовірних змін вмісту МСМ-254 у плазмі крові щурів з 15 та 30 добовою короткочасовою та тривалою оклюзією панкреатичної протоки, порівняно з контролем, не спостерігалось. Але слід зазначити статистично вірогідну різницю зниження рівня МСМ-254 на 15 та 30 добу експерименту у I та II групах тварин, порівняно з 6 добою дослідження: для

15 доби на 47% ($P<0,05$) і 49% ($P<0,001$) та для 30 доби на 52% ($P<0,001$) та 49% ($P<0,001$) відповідно для двох груп (рис. 3.13).

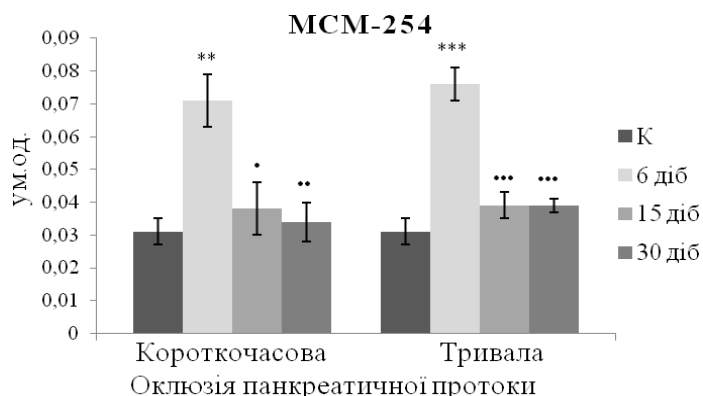


Рис. 3.13. Динаміка зміни вмісту молекул середньої маси (МСМ-254) у плазмі крові щурів за умов експериментального панкреатиту

Примітки: К – контроль – псевдооперовані тварини, $n=18$; **, *** – різниця вірогідна, порівняно з контролем, $P<0,01$, $P<0,001$ відповідно, $n=6$; •, **, *** – різниця вірогідна, порівняно з 6 добою дослідження, $P<0,05$, $P<0,01$, $P<0,001$ відповідно, $n=6$

Середня концентрація МСМ-280 (фракція ароматичних хромофорів), визначена при довжині хвилі 280 нм у крові щурів I та II групи на запально-некротичній стадії гострого панкреатиту, вірогідно збільшилася відповідно на 141% (до $0,101\pm 0,006$ ум.од.; $P<0,01$) та 181% (до $0,118\pm 0,007$ ум.од.; $P<0,001$), порівняно з контролем ($0,042\pm 0,002$ ум.од.). Вірогідного збільшення вмісту МСМ-280 відносно контролю не спостерігалось на 15 добу експерименту в жодній з груп, проте даний показник знизився порівняно з відповідними вище вказаними значеннями на 6 добу дослідження на 50% (до $0,051\pm 0,007$ ум.од.; $P<0,001$) та 53% (до $0,055\pm 0,007$ ум.од.; $P<0,001$) відповідно для двох груп. На 30 добу дослідження рівень МСМ-280 достовірно був вищим лише у крові щурів II групи на 48% (до $0,062\pm 0,003$ ум.од.; $P<0,001$), порівняно з контролем, але знижувався відносно 6 доби дослідження на 48% ($P<0,001$). У щурів I групи на стадії відновлення вміст МСМ-280 вірогідно знижувався на 55% ($P<0,001$), порівняно із запально-некротичною стадією гострого панкреатиту (рис. 3.14).

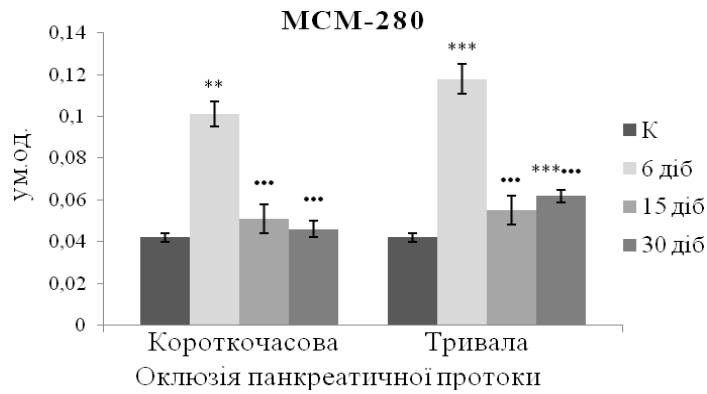


Рис. 3.14. Динаміка зміни вмісту молекул середньої маси (МСМ-280) у плазмі крові щурів за умов експериментального панкреатиту

Примітки: К – контроль – псевдооперовані тварини, n=18; **, *** – різниця вірогідна, порівняно з контролем, $P < 0,01$, $P < 0,001$ відповідно, n=6; ... – різниця вірогідна, порівняно з 6 добою дослідження, $P < 0,001$, n=6

У щурів I та II групи спостерігався розвиток неспецифічної ендогенної інтоксикації, що на першому етапі експерименту виражалось високим рівнем в плазмі крові щурів МСМ, збільшенням нуклеарної, токсичної фракції та фракції ароматичних хромофорів. В подальшому досить високий рівень вказаних показників підтримувався лише у щурів II групи.

3.1.6. Зміни показників фіброзу підшлункової залози у крові щурів за умов експериментального панкреатиту

Зміна вмісту в плазмі крові оксипроліну білковозв'язаного (ОПб/зв) та вільного (ОПв) розглядається як показник метаболізму колагену і дає важливу інформацію про біохімічні та патологічні особливості фіброзу.

У щурів I групи вірогідних змін в концентрації цих показників не спостерігалось. Про посилений анаболізм сполучної тканини у щурів II групи на перехідній, атрофічно-префіброзній стадії гострого панкреатиту свідчило зростання вмісту ОПб/зв на 24% ($P < 0,05$), а про знижений катаболізм – зменшення вмісту ОПв на 22% ($P < 0,05$) відносно контролю. Дані процеси поглиблювалися із прогресуванням панкреатиту і фіброзною зміною

підшлункової залози: рівень ОПб/зв на 30 добу експерименту зростав на 39% ($P<0,001$) відносно контролю та на 26% ($P<0,01$), порівняно з 6 добою, а рівень ОПв знижувався на 30% ($P<0,01$) відносно контролю та на 26% ($P<0,01$), порівняно з 6 добою дослідження (табл. 2).

Таблиця 2

Концентрація біохімічних маркерів фіброзу та коефіцієнти співвідношення кОПб/зв/кОПв ($M\pm m$)

Показник	Контроль (n=18)	Група	Доба дослідження		
			6 доба (n=6)	15 доба (n=6)	30 доба (n=6)
ОПб/зв, мкмоль/л	166,69±9,24	I	177,62±10,39	183,89±11,48	192,77±11,53
		II	183,62±7,43	206,16±13,80*	230,81±8,82***••
кОПб/зв	1	I	1,07±0,06	1,10±0,07	1,16±0,07
		II	1,10±0,04	1,24±0,08	1,38±0,05••
ОПв, мкмоль/л	9,96±0,60	I	9,58±0,55	8,86±0,44	8,18±0,84
		II	9,35±0,74	7,76±0,50*	6,97±0,39***••
кОПв	1	I	0,96±0,06	0,89±0,04	0,82±0,08
		II	0,94±0,06	0,78±0,05•	0,70±0,04••
кОПб/зв / кОПв	1	I	1,12±0,06	1,24±0,02	1,46±0,13•
		II	1,17±0,11	1,63±0,18•	2,03±0,18••

Примітки: *, **, *** – різниця вірогідна, порівняно з контролем, $P<0,05$, $P<0,01$, $P<0,001$ відповідно; •, •• – різниця вірогідна, порівняно з 6 добою дослідження, $P<0,05$, $P<0,01$ відповідно

Розраховувався коефіцієнт ОПб/зв (кОПб/зв) та коефіцієнт ОПв (кОПв) і загальний коефіцієнт фіброзу кОПб/зв / кОПв, що дозволяє характеризувати прогресування фіброзних змін в організмі в залежності від визначеної нами морфологічної класифікації стадійності перебігу експериментального панкреатиту для короткочасової та тривалої оклюзії панкреатичної протоки.

У щурів I групи на 6 добу експерименту на запально-некротичній стадії гострого панкреатиту коефіцієнт співвідношення кОПб/зв / кОПв дорівнював $1,12\pm 0,06$, на 15 добу експерименту на регенераторно-проліферативній стадії – $1,24\pm 0,02$, на 30 добу експерименту на стадії відновлення – $1,46\pm 0,13$ (при встановленій нормі 1 для псевдооперованих тварин). Слід відзначити, що

коефіцієнт співвідношення $\text{кОПб/зв} / \text{кОПв}$ у групі щурів на 30 добу дослідження був на 30% ($P < 0,05$) вищим, порівняно з аналогічним показником на 6 добу дослідження. У щурів II групи на 6 добу експерименту на запально-некротичній стадії гострого панкреатиту коефіцієнт співвідношення $\text{кОПб/зв} / \text{кОПв}$ дорівнював $1,17 \pm 0,11$, на 15 добу на перехідній, атрофічно-префіброзній стадії гострого панкреатиту – $1,63 \pm 0,18$, що на 39% ($P < 0,05$) вище, ніж на 6 добу дослідження, на 30 добу на фіброзній стадії хронічного панкреатиту – $2,03 \pm 0,18$, що також на 74% ($P < 0,01$) вище, ніж на 6 добу дослідження (при нормі 1) (див. табл. 2). Отримані співвідношення $\text{кОПб/зв} / \text{кОПв}$ для щурів II групи на 6, 15 та 30 добу експерименту дозволили визначити числові інтервали коефіцієнтів, які при значеннях в межах 1,09–1,43 характеризують запально-некротичну стадію гострого панкреатиту і відсутність фіброзних змін, при 1,44–1,78 – перехідну, атрофічно-префіброзну стадію гострого панкреатиту, при 1,79 і $>$ – фіброзну стадію хронічного панкреатиту.

До методів оцінки фіброзу підшлункової залози слід віднести визначення молекулярних сполук, що беруть участь у порушенні утворення позаклітинного матриксу. Однією з таких сполук є гіалуронова кислота (ГК). Результати біохімічного дослідження, пов'язані із визначенням в плазмі крові тварин вмісту ГК, засвідчили відсутність вірогідних змін даного показника при короткочасовій оклюзії панкреатичної протоки на всіх етапах дослідження. А в плазмі крові щурів з тривалою оклюзією панкреатичної протоки на перехідній, атрофічно-префіброзній стадії гострого панкреатиту спостерігалось вірогідне зростання концентрації даного показника відносно контролю на 25% ($1,60 \pm 0,12$ проти $1,28 \pm 0,06$ мкг/мл, $P < 0,05$). На фіброзній стадії хронічного панкреатиту збільшення вмісту ГК, у порівнянні з контролем, було ще суттєвішим – зростав на 47% ($1,88 \pm 0,10$ мкг/мл; $P < 0,001$) та вже вірогідно перевищував аналогічний показник на запально-некротичній стадії гострого панкреатиту на 32% ($P < 0,01$) (рис. 3.15).

Таким чином, в плазмі крові тварин II групи, а саме на перехідній, атрофічно-префіброзній стадії гострого панкреатиту та на фіброзній стадії

хронічного панкреатиту, спостерігалось значне збільшення концентрації ГК, що вказує на прогресування процесів фіброгенезу в організмі. Підвищення на 15 та 30 добу дослідження рівня ОПб/зв в плазмі крові тварин також відображало активне колагеноутворення в організмі, а зменшення концентрації ОПв вказує на знижену деградацію утвореного колагену, тобто перевагу синтезу над розпадом.

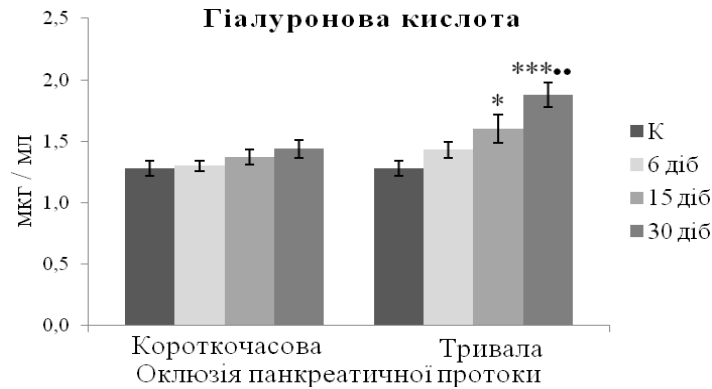


Рис. 3.15. Динаміка зміни вмісту гіалуронової кислоти у плазмі крові щурів за умов експериментального панкреатиту

Примітки: К – контроль – псевдооперовані тварини, n=18; *, *** – різниця вірогідна, порівняно з контролем, $P < 0,05$, $P < 0,001$ відповідно, n=6; ** – різниця вірогідна, порівняно з 6 добою дослідження, $P < 0,01$, n=6

3.1.7. Зміни вмісту церулоплазміну у крові щурів за умов експериментального панкреатиту

Відомо, що рівень церулоплазміну в крові зростає при гострих та хронічних запальних процесах, в тому числі і при панкреатиті. Він циркулює в плазмі і перехоплює вільнорадикальні форми кисню, захищаючи від їх пошкоджуючої дії ліпидовмісні біоструктури. Церулоплазмін здійснює інактивацію вільних радикалів, що утворюються в макрофагах і лейкоцитах при фагоцитозі та розвитку ПОЛ в осередку запалення. Так, максимальне зростання вмісту церулоплазміну відносно контролю спостерігалось в I та II групах щурів на запально-некротичній стадії гострого панкреатиту відповідно на 40% (з $475,13 \pm 40,38$ до $666,23 \pm 65,40$ мг/мл, $P < 0,05$) та 34% (до $638,58 \pm 26,84$ мг/мл; $P < 0,01$). Високим був його вміст і у тварин II групи на атрофічно-

префібрзній стадії гострого панкреатиту – збільшувався на 26% (до $596,24 \pm 34,81$ мг/мл; $P < 0,05$) відносно контролю. У I та II групі тварин на 30 добу експерименту зниження вмісту церулоплазміну було вірогідне на 24% ($P < 0,05$) та 19% ($P < 0,05$), порівняно з 6 добою (рис. 3.16).

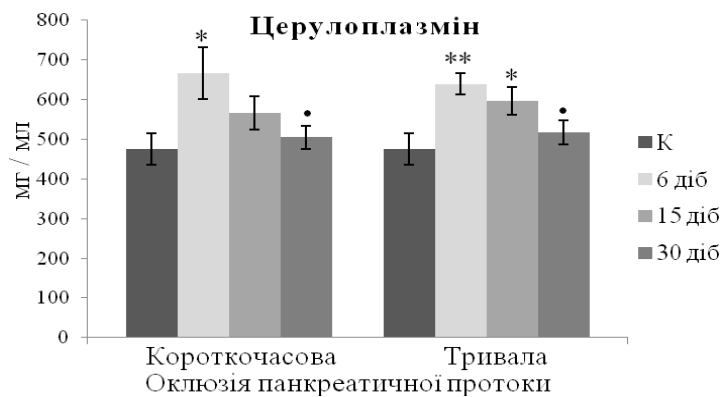


Рис. 3.16. Динаміка зміни вмісту церулоплазміну у плазмі крові щурів за умов експериментального панкреатиту

Примітки: К – контроль – псевдооперовані тварини, $n=18$; *, ** – різниця вірогідна, порівняно з контролем, $P < 0,05$, $P < 0,01$ відповідно, $n=6$; • – різниця вірогідна, порівняно з 6 добою дослідження, $P < 0,05$, $n=6$

Отже, встановлене нами підвищення вмісту церулоплазміну в плазмі крові експериментальних підтвердило розвиток запального процесу в підшлунковій залозі при гострому панкреатиті, а при переході його в хронічну форму спостерігається поступове затухання активності цього процесу.

3.1.8. Зміни поведінкових реакції щурів за умов експериментального панкреатиту

Одним із прогностичних критеріїв, що входять в комплекс характеристик схильності/резистентності до емоційного стресу, є рухова активність тварин, визначена в тесті “відкрите поле” [53].

З метою оцінки дослідницької поведінки та емоційного стану щурів з короткочасовою та тривалою оклюзією протоки підшлункової залози у післяопераційний період проводили тест “відкрите поле”.

Результати цього тесту у групі псевдооперованих щурів продемонстрували відсутність достовірних змін усіх показників між 5, 14 та 29 добою. Оцінку змін параметрів рухово-дослідницької та емоційної активності у I та II групі тварин проводили шляхом співставлення отриманих результатів на кожному етапі дослідження (на 5, 14 та 29 добу експерименту) з результатами контрольної групи, визначеними на відповідну добу.

Загалом, при вивченні поведінки тварин I і II групи протягом всього експерименту були виявлені значні зміни в їхній активності, у порівнянні з контролем. У щурів обох дослідних груп, особливо на 5 добу експерименту, різко знижувалася спонтанна рухова активність, про що свідчило зменшення кількості локомоцій та більшості поведінкових актів, спостерігалось також зниження кількості заглядань у нірки та вертикальних стійок як ознака пригнічення орієнтовно-дослідницької поведінки. Поряд з цим у тварин простежувалися елементи негативно-емоційного стану – збільшення кількості грумінгів.

Відомо, що перше представлення “відритого поля” є для щурів сильним стресовим фактором, до якого в наступні рази розвивається звикання [25]. І дійсно, в наших експериментах у контрольній групі тварин при повторному тестуванні на 14 та 29 добу спостерігалось незначне зниження горизонтальної активності, яке, однак, виявилось невірогідним. При цьому інші види активності істотно не змінювалися в контролі. Виняток представляли дослідні тварини, яким проводили короткочасову і тривалу оклюзію панкреатичної протоки.

Тестування щурів I групи виявило значні зміни їхньої локомоторної активності та орієнтовно-дослідницької поведінки. Так, горизонтальна рухова активність тварин значно знижувалась вже на 5 добу після оперативного втручання на підшлунковій залозі, що проявлялось зменшенням відносно контролю кількості перетину тваринами ліній відповідно зовнішніх та внутрішніх квадратів на 39% ($13,84 \pm 2,63$ проти $22,50 \pm 2,26$; $P < 0,05$) та 42% ($2,33 \pm 0,67$ проти $4,00 \pm 1,00$) (рис. 3.17).

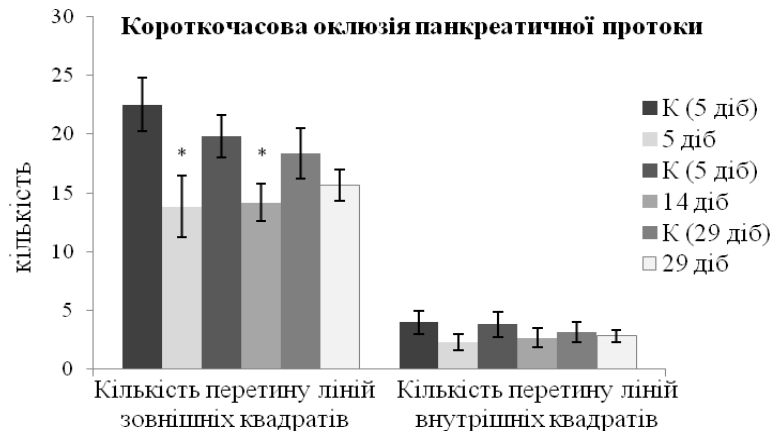


Рис. 3.17. Локомоторна активність щурів за умов експериментального панкреатиту

Примітки: К – контроль – псевдооперовані тварини, n=18; * – різниця вірогідна, порівняно з контролем, $P < 0,05$, n=6; групи дослідних щурів (5, 14 і 29 доба), n=18

Щури проявляли активність лише на перших хвилинах тестування, але з кожною наступною хвилиною кількість перетинів ліній квадратів різко знижувалася. На 14 добу також відмічалася знижена рухова активність – тварини зупинялись в одному з кутів поля вже через 1-2 хв. І кількість перетинів ліній зовнішніх квадратів була нижчою від показника контрольної групи на 29% ($14,17 \pm 1,58$ проти $19,83 \pm 1,78$; $P < 0,05$), а внутрішніх – на 30% ($2,67 \pm 0,80$ проти $3,83 \pm 1,08$). На 29 добу відсоток зниження обох показників був не таким значним, як на 5 та 14 добу, хоч ще і залишався нижчим від контролю на 15% ($15,67 \pm 1,33$ проти $18,33 \pm 2,14$) та 11% ($2,83 \pm 0,54$ проти $3,17 \pm 0,87$) відповідно для кількості перетину ліній зовнішніх та внутрішніх квадратів (див. рис. 3.17).

Під час вивчення інших аспектів дослідницької поведінки щурів, зокрема, вертикальної активності та ниркового рефлексу, було встановлено вірогідне зниження цих показників по відношенню до контролю вже на 5 добу експерименту на 35% ($4,00 \pm 0,58$ проти $6,17 \pm 0,75$; $P < 0,05$) та 40% ($7,33 \pm 1,33$ проти $12,17 \pm 1,45$; $P < 0,05$) відповідно. На 14 добу рівень дослідницької діяльності щурів цієї групи поступово підвищувався, у порівнянні з попередніми показниками, але все ж був нижчим від контролю

на 12% ($4,83 \pm 0,87$ проти $5,50 \pm 0,67$) та 24% ($7,50 \pm 1,06$ проти $9,83 \pm 1,19$) відповідно для вертикального та ниркового компоненту. На 29 добу кількість здійснених тваринами вертикальних стійок та заглядань у нирки продовжувала поступово збільшуватися, у порівнянні з аналогічними значеннями на 5 та 14 добу, проте ще відповідно на 9% ($6,50 \pm 0,62$ проти $7,17 \pm 0,95$) та 11% ($7,83 \pm 0,65$ проти $8,83 \pm 1,17$) залишалася нижчою від контрольного показника (рис. 3.18).

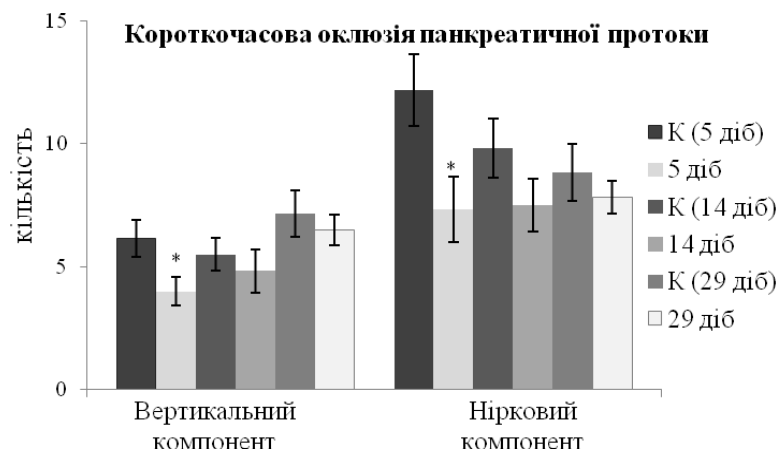


Рис. 3.18. Кількість орієнтовно-дослідницьких актів в динаміці за умов експериментального панкреатиту

Примітки: К – контроль – псевдооперовані тварини, $n=18$; * – різниця вірогідна, порівняно з контролем, $P < 0,05$, $n=6$; групи дослідних щурів (5, 14 і 29 доба), $n=18$

Грумінг – це специфічна загально визнана поведінкова реакція тварини на стрес. Сильний стрес призводить до зниження рухової активності щурів в цілому ряді тестів на тлі збільшеного грумінгу. Рівень даного показника у тварин I групи був підвищеним, порівняно з контролем, на 19% ($4,17 \pm 0,65$ проти $3,50 \pm 0,62$), 16% ($5,00 \pm 0,68$ проти $4,33 \pm 0,71$) та 26% ($4,00 \pm 0,52$ проти $3,17 \pm 0,40$) відповідно на 5, 14 та 29 добу дослідження.

Одночасно зі зростанням кількості грумінгів, збільшувався також рівень уринацій та дефекацій, що вказує на підвищення тривожності та стресорної реакції на оперативне втручання на підшлунковій залозі. Так,

кількість уринацій підвищувалася, порівняно з контролем, на 5 добу на 24% ($0,83 \pm 0,31$ проти $0,67 \pm 0,33$) та на 29 добу – на 52% ($0,50 \pm 0,22$ проти $0,33 \pm 0,21$), тоді як кількість дефекацій змінювалась різнонаправлено: зростала на 5 добу експерименту на 34% ($0,67 \pm 0,21$ проти $0,50 \pm 0,22$) та знижувалася на 14 добу – на 25% ($0,50 \pm 0,22$ проти $0,67 \pm 0,21$).

В результаті проведених досліджень по визначенню поведінкової активності щурів після тривалої оклюзії панкреатичної протоки, було встановлено, що на 5 добу експерименту кількість перетину ліній зовнішніх і внутрішніх квадратів вірогідно знижувалася відносно контролю відповідно на 51% ($11,00 \pm 1,18$ проти $22,50 \pm 2,26$; $P < 0,01$) та 92% ($0,33 \pm 0,21$ проти $4,00 \pm 1,00$; $P < 0,01$), продовжувала знижуватися на 14 добу на 81% ($3,83 \pm 0,48$ проти $19,83 \pm 1,78$; $P < 0,001$) та 91% ($0,33 \pm 0,21$ проти $3,83 \pm 1,08$; $P < 0,01$) і максимального зниження досягла на 29 добу експерименту – на 85% ($2,67 \pm 0,42$ проти $18,33 \pm 2,14$; $P < 0,001$) та 100% (рис. 3.19).

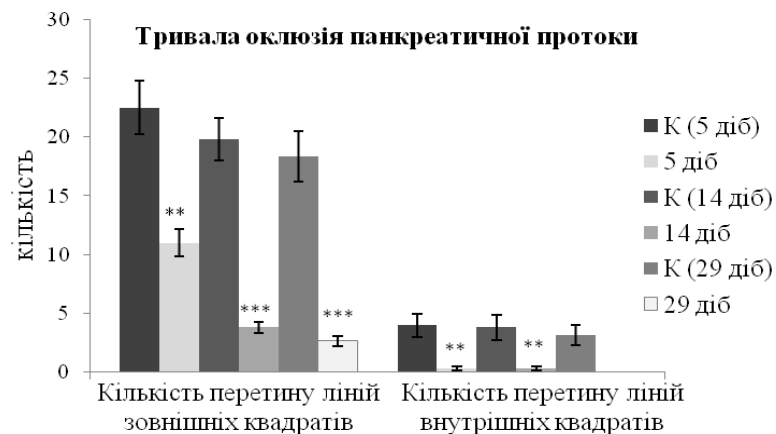


Рис. 3.19. Локомоторна активність щурів за умов експериментального панкреатиту

Примітки: К – контроль – псевдооперовані тварини, $n=18$; **, *** – різниця вірогідна, порівняно з контролем, $P < 0,01$, $P < 0,001$ відповідно, $n=6$; групи дослідних щурів (5, 14 і 29 доба), $n=18$

Спостерігалось вірогідне зниження кількості вертикальних стійок та заглядань у нірки у щурів на 6 добу дослідження відносно контролю на 38 % ($3,83 \pm 0,60$ проти $6,17 \pm 0,75$; $P < 0,05$) та 60% ($4,83 \pm 0,87$ проти $12,17 \pm 1,45$;

$P < 0,01$) відповідно для обох показників. В подальшому значне порушення орієнтовно-дослідницької активності тварин виражалось також вірогідним зменшенням цих двох показників, у порівнянні з контролем, на 14 добу на 88% ($0,67 \pm 0,21$ проти $5,50 \pm 0,67$; $P < 0,001$) та 85% ($1,50 \pm 0,56$ проти $9,83 \pm 1,19$; $P < 0,001$) і на 29 добу – на 95% ($0,33 \pm 0,21$ проти $7,17 \pm 0,95$; $P < 0,001$) та 85% ($1,33 \pm 0,49$ проти $8,83 \pm 1,17$; $P < 0,001$) відповідно для кількості вертикальних стійок і нірок (рис. 3.20).

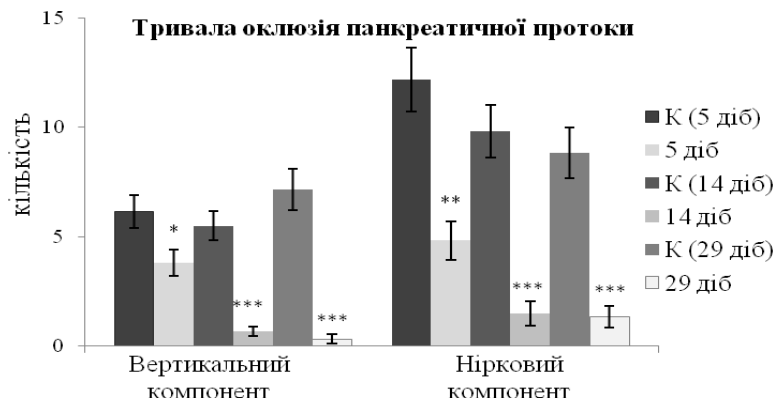


Рис. 3.20. Кількість орієнтовно-дослідницьких актів в динаміці за умов експериментального панкреатиту

Примітки: К – контроль – псевдооперовані тварини, $n=18$; *, **, *** – різниця вірогідна, порівняно з контролем, $P < 0,05$, $P < 0,01$, $P < 0,001$ відповідно, $n=6$; групи дослідних щурів (5, 14 і 29 доба), $n=18$

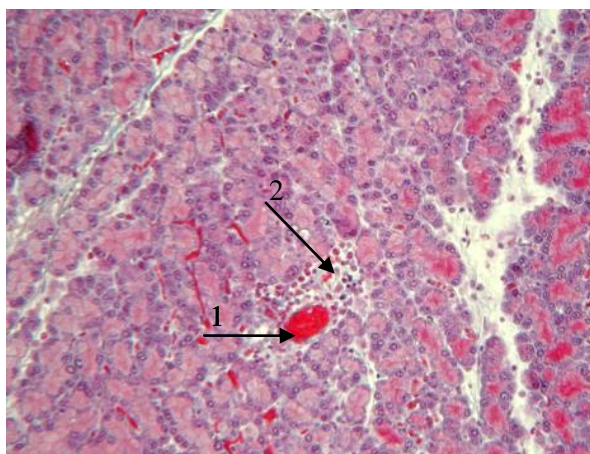
Кількість грумінгів у щурів II групи на 5 та 14 добу експерименту зростала відносно контролю на 76% ($6,17 \pm 0,70$ проти $3,50 \pm 0,62$; $P < 0,05$) та 16% ($5,00 \pm 0,73$ проти $4,33 \pm 0,71$) відповідно, а на 29 добу спостерігалось зниження даного показника на 16% ($2,67 \pm 0,67$ проти $3,17 \pm 0,40$).

При дослідженні динаміки вегетативної активності щурів відзначалось зростання кількості уринацій відносно контролю у щурів на 5 добу тестування на 75% ($1,17 \pm 0,17$ порівняно з $0,67 \pm 0,33$), на 14 добу – на 34% ($0,67 \pm 0,33$ порівняно з $0,50 \pm 0,22$), а на 29 добу – на 52% ($0,50 \pm 0,22$ порівняно з $0,33 \pm 0,21$). Відзначалось зростання кількості дефекацій, порівняно з контролем, на 5 добу тестування на 166% ($1,33 \pm 0,49$ порівняно з $0,50 \pm 0,22$), на 14 добу – на 124% ($1,50 \pm 0,22$ порівняно з $0,67 \pm 0,21$; $P < 0,05$) і на 29 добу – на 66% ($0,83 \pm 0,31$ порівняно з $0,50 \pm 0,34$).

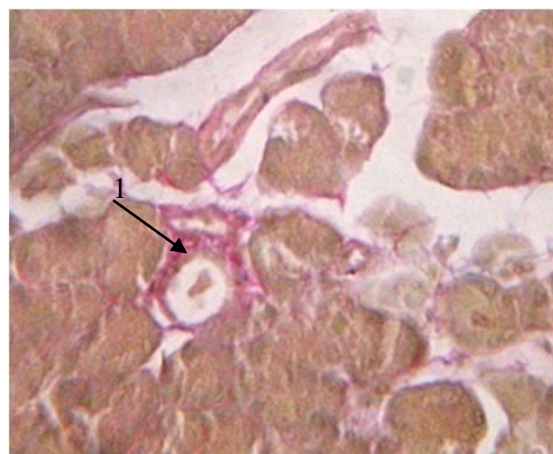
Таким чином, у щурів з короткочасною та тривалою оклюзією панкреатичної протоки за умов розвитку гострого панкреатиту спостерігалось зниження показників локомоторної та орієнтувально-дослідницької активності тварин та підвищення стресу. У щурів II групи на фіброзній стадії хронічного панкреатиту відбувалося подальше поглиблення змін вищевказаних показників, на відміну від тварин I групи, у яких на стадії відновлення дані показники поступово поверталися до значень контрольної групи.

3.1.9. Морфологічні зміни в підшлунковій залозі за умов експериментального панкреатиту

Особливості гістоструктури підшлункової залози в умовах короткочасової оклюзії панкреатичної протоки. В результаті гістохімічного дослідження підшлункової залози щурів з короткочасовою оклюзією панкреатичної протоки було встановлено, що на 6 добу експерименту розвивалися зміни, які характерні для гострого панкреатиту. Так, в хвостовій частині органу було виявлено розширення протоків різного калібру із застоєм секрету, осередки лімфоцитарної, нейтрофільної або еозинофільної інфільтрації, ознаки повнокрів'я внутрішньочасточкових судин. Визначалися осередки некрозу ацинарної тканини (рис. 3.21 А). Характерним було розростання фібробластів. В інших частинах підшлункової залози (голівці, тілі) гістохімічних змін не спостерігалось. Аналіз тканини хвостової частини підшлункової залози тварин I групи на 15 добу експерименту виявив більш значне розширення внутрішньо- і міжчасточкових протоків із розвитком початкових ознак фіброзування навколо них, прогресуючими явищами повнокрів'я, вогнищевою внутрішньоклітинною інфільтрацією паренхіми. В області лігатури спостерігалось хронічне запалення. Відмічалось сплющення та дистрофія внутрішньопротокового епітелію, осередки склерозування. Гістоструктура ацинарної тканини залишалась збереженою (див. рис. 3.21 Б). В голівці і тілі підшлункової залози гістохімічних змін не спостерігалось.



А



Б

Рис. 3.21. Мікрофотографії зрізів тканини підшлункової залози щура І групи на 6 (А) та 15 добу дослідження (Б)

Примітки: А: 1 – повнокрів'я; 2 – інфільтрація навколопротокової зони лімфоцитами та плазматичними клітинами. Забарвлення гематоксиліном та еозином, x100. Б: 1 – фіброз. Забарвлення за Ван-Гізоном, x100

На 30 добу експерименту в хвостовій частині органу спостерігалася дистрофія ацинарної тканини в окремих дольках, склероз навколо внутрішньодолькових протоків з відокремленням поодиноких ацинусів. При забарвленні за Ван-Гізоном відзначався незначний рихлий перидуктальний фіброз. Ацинарна тканина залишалася без суттєвих змін (рис. 3.22).

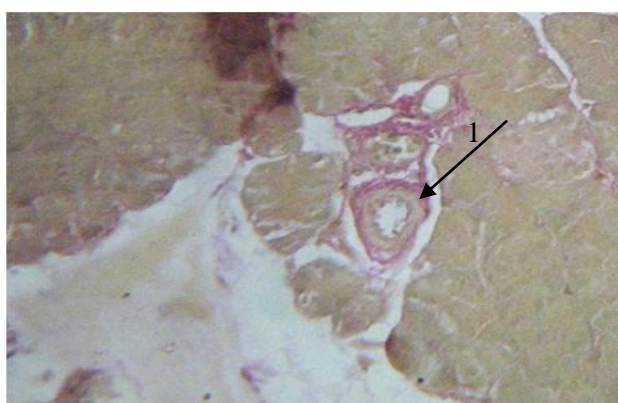
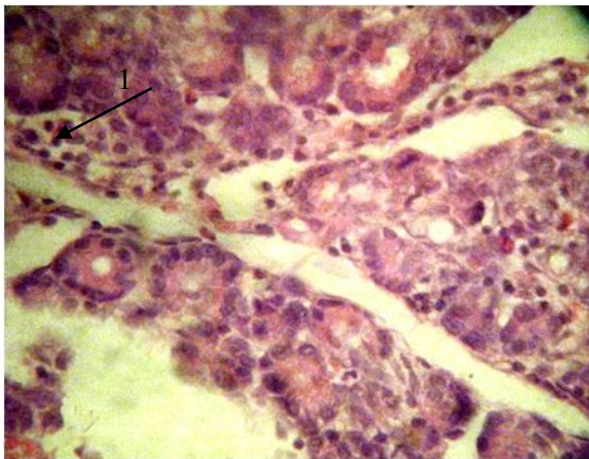


Рис. 3.22. Мікрофотографія зрізу тканини підшлункової залози щура І групи на 30 добу дослідження

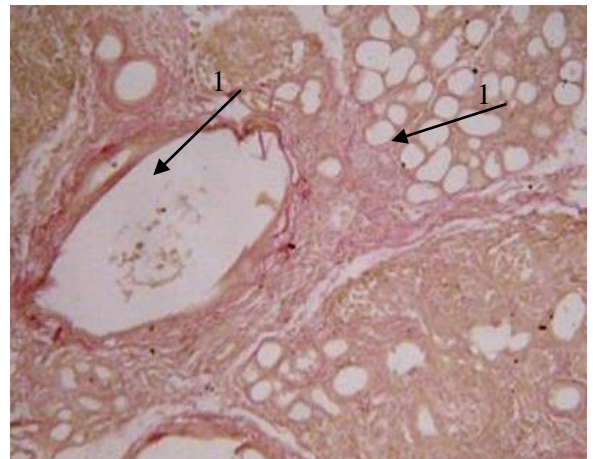
Примітка: 1 – перидуктальний фіброз. Забарвлення за Ван-Гізоном, x100

В голівці та тілі підшлункової залози гістохімічних змін тканини органу не спостерігалось.

Особливості гістоструктури підшлункової залози в умовах тривалої оклюзії панкреатичної протоки. У групі експериментальних тварин з тривалою оклюзією панкреатичної протоки на 6 добу дослідження у підшлунковій залозі розвивалися зміни, що також характеризували розвиток гострого панкреатиту. У зразку із хвостового відділу органу спостерігалися ознаки запалення, зокрема інфільтрація внутрішньодолькових і міждолькових септ лімфоцитами та еозинофілами, осередки некрозу. Відзначалося розростання фіброblastів у вигляді вузьких безперервних та розгалужених тяжів (рис. 3.23 А). В інших частинах підшлункової залози гістохімічних змін не спостерігалось.



А



Б

Рис. 3.23. Мікрофотографії зрізів тканини підшлункової залози щура II групи на 6 (А) та 15 добу дослідження (Б)

Примітки: А: 1 – круглоклітинна інфільтрація в зоні зруйнованих часточок. Забарвлення гематоксиліном та еозином, x100. Б: 1 – розширення протоків підшлункової залози. Забарвлення за Ван-Гізоном, x100

На 15 добу експерименту в підшлунковій залозі були встановлені ознаки індуративного панкреатиту. Продовжувалося загострення, характерною була наявність нейтрофільних сегментоядерних лейкоцитів з примісом еозинофільних в прошарках між розрізненими острівцями

Лангерганса. Відмічався склероз судин, міждольковий та менш виражений внутрішньодольковий фіброз. Також відмічалось значне розширення протоків та часткова атрофія ацинарних клітин (див. рис. 3.23 Б). В голівці та тілі підшлункової залози гістохімічних змін не спостерігалось.

Аналіз зразків тканини із хвостового відділу підшлункової залози тварин на 30 добу експерименту виявив зміни, що характерні для фіброзної стадії хронічного панкреатиту, а саме: склероз судин, фіброзне перетворення, гранульоми. Забарвлення за Ван-Гізоном у зразках із хвостової частини органу виявило міждольковий та внутрішньодольковий фіброз. Хронізація панкреатиту супроводжувалася значною атрофією ацинарної тканини підшлункової залози та заміщенням її фіброзною тканиною. Дрібні протоки органу були розширені, спостерігались ознаки гіперплазії епітелію. В збереженій частині протокової структури мала місце парціальна атрофія ацинарних клітин. Навколо магістральних та внутрішньочасточкових протоків виявлялась щільна фіброзна тканина, а рихла фіброзна тканина заповнювала міжчасточковий простір і містила залишки зруйнованих часток острівців, протоки та судини (рис. 3.24).

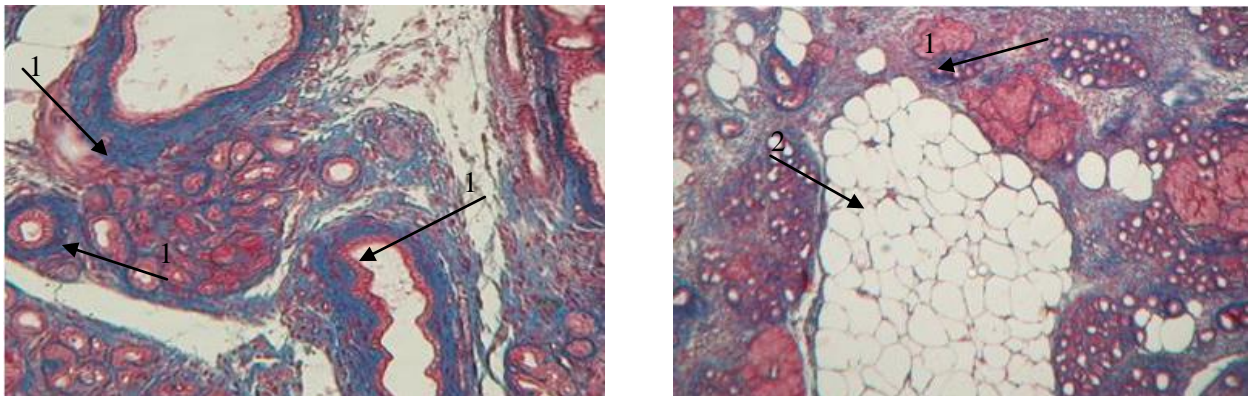


Рис. 3.24. Мікрофотографії зрізів тканини підшлункової залози щура II групи на 30 добу дослідження

Примітки: 1 – навко- та внутрішньочасточковий фіброз; 2 – осередок жирової дистрофії. Забарвлення за Малорі-Слінченко, x100

В голівці та тілі підшлункової залози гістохімічних змін не спостерігалось.

Гістохімічний аналіз зразків тканини підшлункової залози щурів контрольної групи не виявив змін – серед екзокринної тканини розташовувалися острівці Лангерганса різної форми і розміру. Ацинуси мали нормальну структуру (рис. 3.25).

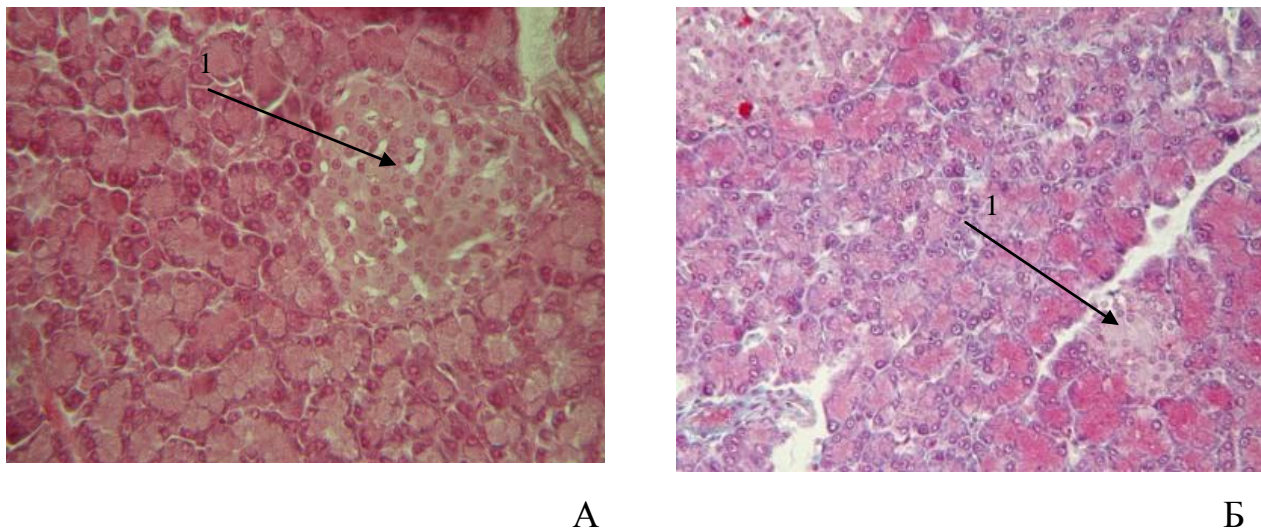


Рис. 3.25. Мікрофотографії зрізів тканини підшлункової залози щура контрольної групи

Примітки: 1– острівець Лангерганса. Забарвлення гематоксиліном та еозином, x100 (А). Забарвлення за Малорі-Слінченко, x100 (Б)

Отже, в результаті короткочасової оклюзії панкреатичної протоки на 6 добу експерименту розвивався гострий панкреатит, що підтверджувалося наявністю в тканині підшлункової залози лімфоцитарної інфільтрації з елементами нейтрофільної та еозинофільної, також спостерігалось розростання фібробластів та відзначалися осередки некрозу ацинарної тканини; на 15 добу було виявлено розширення протоків, ознаки повнокрів'я, поодинокі осередки фіброзування; на 30 добу спостерігалось перидуктальне фіброзування з утворенням незначної кількості рихлої сполучної тканини. Характерною особливістю цієї моделі експериментального панкреатиту було збереження гістоструктури ацинарної тканини підшлункової залози до кінця експерименту. Отримані результати вказують на те, що за умов тривалої оклюзії панкреатичної протоки у експериментальних щурів розвивався

гострий панкреатит, який поступово переходив в хронічну форму, що супроводжувалося фіброзуванням органу. Так, на 6 добу експерименту в підшлунковій залозі відзначались ознаки гострого процесу, що підтверджувалося лімфоцитарною та еозинофільною інфільтрацією внутрішньо- та міжчасточкових септ, осередковим некрозом. На 15 добу відмічалось розширення протоків та атрофія ацинарних клітин, а вже на 30 добу забарвлення за Ван-Гізоном підтвердило розростання фіброзної тканини у міждольковому та внутрішньодольковому просторі органу.

З метою оцінки фіброзних змін підшлункової залози в I та II групі щурів проводилася комп'ютерна морфометрія панкреатобіоптатів, отриманих інвазивним методом. Комп'ютерний індекс фіброзу (КІФ – співвідношення фіброзної тканини до загальної площі біоптату) для контролю становив $0,50 \pm 0,07$. На 6 добу експерименту, пов'язаного з короткочасовою оклюзією панкреатичної протоки, КІФ дорівнював $1,06 \pm 0,34$ (встановлена запально-некротична стадія гострого панкреатиту), на 15 добу – $2,00 \pm 0,69$ (встановлена регенераторно-проліферативна стадія), а на 30 добу – $5,90 \pm 1,54$ (встановлена стадія відновлення). На 30 добу експерименту КІФ в 11,8 разів ($P < 0,01$) перевищував контрольне значення, в 5,6 рази ($P < 0,05$) – аналогічний показник для 6 доби і в 3 рази – для 15 доби ($P < 0,05$) дослідження.

На 6 добу експерименту при тривалій оклюзії панкреатичної протоки КІФ дорівнював $1,13 \pm 0,66$ (встановлена запально-некротична стадія гострого панкреатиту), на 15 добу – $3,11 \pm 2,03$ (встановлена перехідна, атрофічно-префіброзна стадія гострого панкреатиту), а на 30 добу – $20,79 \pm 5,12$ (встановлена фіброзна стадія хронічного панкреатиту). На 30 добу експерименту КІФ в 41,6 разів ($P < 0,01$) перевищував контрольне значення, в 18,4 рази ($P < 0,01$) – аналогічний показник для 6 доби і в 6,7 разів – для 15 доби ($P < 0,01$) дослідження. Також КІФ у цій групі щурів на фіброзній стадії хронічного панкреатиту перевищував в 3,5 рази ($P < 0,05$) аналогічний показник для I групи тварин на стадії відновлення.

Гістохімічний аналіз зразків печінки всіх дослідних щурів виявив незначне розширення порталних трактів, та в деяких випадках легку лімфо-плазмоцитарну інфільтрацію. Кількість фіброзної тканини була незначною і в 100% випадків не виходила за межі контрольних показників для псевдооперованих тварин та не могла вплинути на результати вимірювань.

Отже, приведені результати біохімічних досліджень підтвердили розвиток хронічного панкреатиту лише в умовах тривалої оклюзії панкреатичної протоки, що і стало підставою дослідження розподілу нейрон-та астроцит-специфічних білків та рівня ГЗАБ міжклітинного матриксу у мозку та підшлунковій залозі щурів саме II групи на фіброзній стадії хронічного панкреатиту в умовах панкреатичної енцефалопатії.

Основні наукові результати підрозділу опубліковані в роботах [32–36, 50].

3.2. Розподіл нейроспецифічних білків і рівня гіалуронат-зв'язуючої активності білків головного мозку та підшлункової залози щурів за умов розвитку хронічного панкреатиту

3.2.1. Розподіл нейрональної молекули клітинної адгезії в головному мозку та підшлунковій залозі щурів за умов розвитку хронічного панкреатиту

Зміни розподілу НМКА в умовах гострих неврологічних розладів були докладно описані раніше [93]. Проте на сьогодні відомості щодо перерозподілу НМКА у відділах головного мозку при хронічних захворюваннях внутрішніх органів, у тому числі і при хронічному панкреатиті, є обмеженими. Для дослідження розподілу НМКА були обрані відділи мозку, відповідальні за рухову активність, сенсорну чутливість, в тому числі і больову, та процеси навчання і пам'яті. Отримані в ході експерименту результати дозволили проаналізувати особливості розподілу НМКА в розчинній та мембранній фракціях білків, екстрагованих із різних

відділів головного мозку (мозочка, гіпокампа, таламуса) та підшлункової залози щурів. За результатами кількісного аналізу фракцій НМКА у мозочку було встановлено, що рівень рНМКА був вищим, ніж у контролі, на 24% ($2,18 \pm 0,14$ проти $1,75 \pm 0,14$ мкг рНМКА/мг ЗБ; $P < 0,05$) (рис. 3.26).

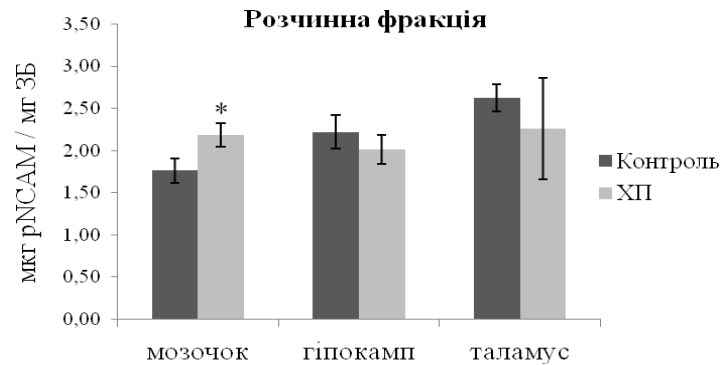


Рис. 3.26. Вміст рНМКА в різних відділах головного мозку щурів

Примітки: Контроль – псевдооперовані тварини, $n=6$; ХП – щури з хронічним панкреатитом, $n=6$, * – різниця вірогідна, порівняно з контролем, $P < 0,05$

У той же час вміст мНМКА був на 46% нижчим ($212,52 \pm 29,19$ та $114,83 \pm 9,48$ мкг мНМКА/мг ЗБ відповідно; $P < 0,01$) (рис. 3.27).

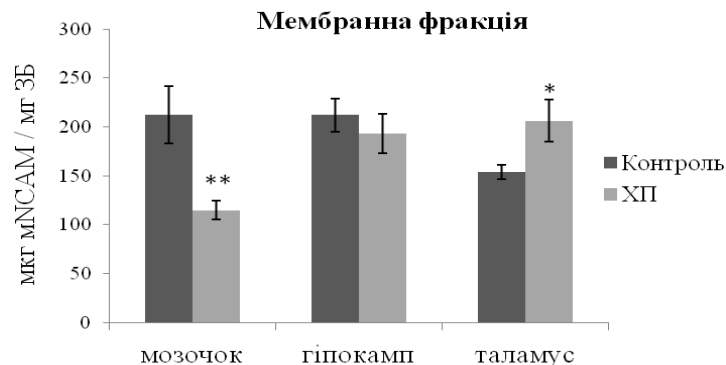


Рис. 3.27. Вміст мНМКА в різних відділах головного мозку щурів

Примітки: Контроль – псевдооперовані тварини, $n=6$; ХП – щури з хронічним панкреатитом, $n=6$, *, ** – різниця вірогідна, порівняно з контролем, $P < 0,05$, $P < 0,01$ відповідно

Такі зрушення, можливо, відбувалися за рахунок “зрізання” позаклітинного домену мНМКА із мембран клітин. Кореляційний аналіз

показав наявність сильного зворотного зв'язку між вмістом рНМКА і мНМКА у фракціях мозочка ($r=-0,886$, $P<0,05$). Перерозподіл рНМКА та мНМКА у мозочку є наслідком ендотоксикації при хронічному панкреатиті і може бути важливим фактором, що впливає на функціональну активність цього відділу мозку.

У таламусі була виявлена протилежна тенденція перерозподілу НМКА (зниження рНМКА на 14%, у середньому з $2,26\pm 0,16$ до $2,26\pm 0,60$ мкг рНМКА/мг ЗБ; збільшення мНМКА на 34%, у середньому з $153,82\pm 7,55$ до $206,45\pm 21,74$ мкг мНМКА/мг ЗБ; $P<0,05$); очевидними були зниження кількості рНМКА і збільшення мНМКА (див. рис. 3.26, 3.27). У гіпокампі відмінності вмісту НМКА при хронічному панкреатиті не досягали рівня вірогідності; функціонування зазначеного відділу мозку, відповідального за пізнавальну діяльність, не зазнавало негативних змін у відповідному аспекті.

Певний дисбаланс вмісту форм НМКА у мозочку і таламусі свідчив про істотний перерозподіл цього білка між згаданими відділами мозку, що, вірогідно, визначає деякий специфічний патерн пластичності в ЦНС при ендотоксикації в умовах розвитку хронічного панкреатиту. Перебіг даної патології та перерозподіл форм НМКА у мозку тварин супроводжувалися істотним зниженням інтенсивностей їх локомоторної та орієнтувально-пізнавальної активності, а також проявами стресового стану (збільшення кількості уринацій та дефекацій). Кореляційні зв'язки між рівнями фракцій НМКА та показниками поведінки щурів були різноспрямованими. Для кількостей перетину тваринами зовнішніх квадратів та рівня рНМКА у мозочку r складав $-0,638$ ($P<0,05$), а аналогічний коефіцієнт для рівня рНМКА у таламусі був позитивним ($0,638$; $P<0,05$). І між рівнем мНМКА у мозочку і кількістю вертикальних стійок кореляція була позитивною ($r=0,828$, $P<0,05$). Отже, розвиток хронічного панкреатиту у щурів протягом 30 днів істотно впливав на функціонування мозочка й таламуса, і одним із аспектів таких змін є перерозподіл форм НМКА. Зміна характеристик міжклітинної адгезії в цих структурах мозку може бути одним із факторів,

що сприяють розвитку панкреатичної енцефалопатії; це супроводжується пригніченням моторної активності тварин і розвитком стану стресу (рис. 3.28).

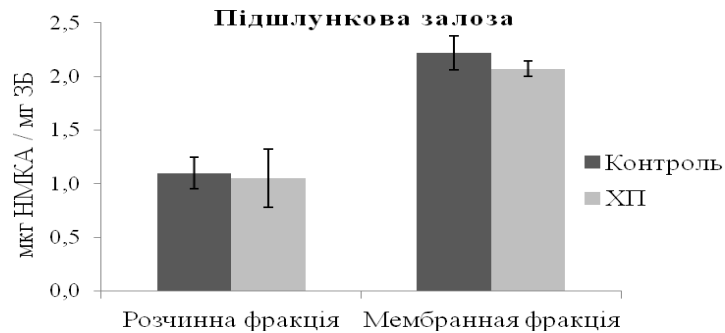


Рис. 3.28. Вміст рНМКА та мНМКА в підшлунковій залозі щурів
Примітки: Контроль – псевдооперовані тварини, n=6; ХП – щури з хронічним панкреатитом, n=6

На 30 добу оклюзії панкреатичної протоки не відбувалося достовірних змін концентрації розчинної та мембранної форм НМКА в екстракті із підшлункової залози, у порівнянні з контролем (див. рис. 3.28).

В гіпокампі щурів на фіброзній стадії хронічного панкреатиту достовірних відмінностей концентрації як цитозольної, так і мембранної форм НМКА, у порівнянні з контролем не спостерігалось.

3.2.2. Вміст астрогліальних білків в головному мозку та підшлунковій залозі за умов розвитку хронічного панкреатиту

Для визначення реакції білків астроглії на розвиток хронічного панкреатиту був досліджений вміст астроцит-специфічних білків S-100b та білка проміжних філаментів цитоскелета ГФКП в екстракті із структурно і функціонально різних відділів мозку та підшлункової залози.

Існує кореляційний зв'язок між функціональною активністю різних відділів мозку і видом діяльності організму тварини. Для дослідження розподілу білка S-100b та ГФКП також були обрані відділи мозку, відповідальні за рухову активність, сенсорну чутливість та процеси навчання і пам'яті. Одержані величини S-100b складаються із розчинної форми і експресованих астроглією позаклітинних молекул.

Результати досліджень показали збільшення рівня S-100b у гіпокампі і таламусі, відповідно на 78% ($1,05 \pm 0,05$ проти $0,59 \pm 0,06$ мкг S-100b/мг ЗБ; $P < 0,001$) та 60% ($1,19 \pm 0,12$ проти $0,68 \pm 0,02$ мкг S-100b/мг ЗБ; $P < 0,01$). В мозочку вірогідних змін вмісту досліджуваного білка не відзначалося (рис. 3.29).

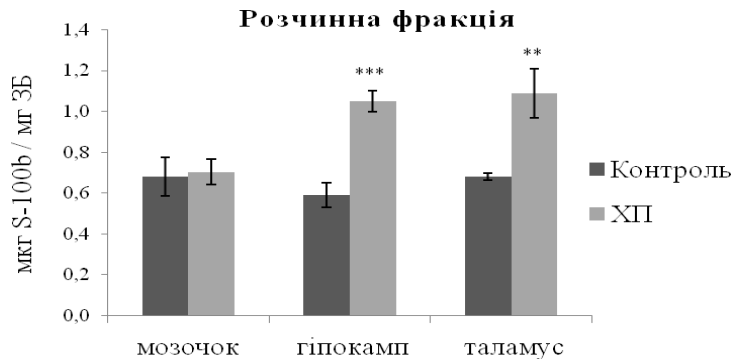


Рис. 3.29. Вміст S-100b в різних відділах головного мозку щурів

Примітки: Контрoль – псевдооперовані тварини, $n=6$; ХП – щури з хронічним панкреатитом, $n=6$, **, *** – різниця вірогідна, порівняно з контролем, $P < 0,01$, $P < 0,001$ відповідно

Розвиток хронічного панкреатиту супроводжувався вірогідним підвищення вмісту S-100b у підшлунковій залозі, порівняно з контролем, на 120% (з $0,06 \pm 0,01$ до $0,13 \pm 0,01$ мкг S-100b/мг ЗБ; $P < 0,01$), що може індукувати каскад Ca^{2+} -залежних дегенеративних процесів у досліджуваному органі (рис. 3.30).

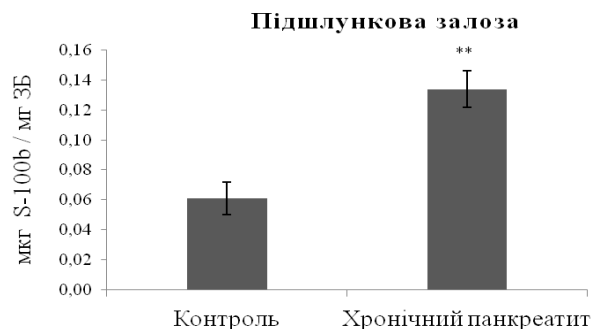


Рис. 3.30. Вміст S-100b в підшлунковій залозі щурів

Примітки: Контрoль – псевдооперовані тварини, $n=6$; Хронічний панкреатит – щури з хронічним панкреатитом, $n=6$, ** – різниця вірогідна, порівняно з контролем, $P < 0,01$

Дані зміни свідчать про декілька процесів, що можливо відбуваються одночасно: активацію астроцитів внаслідок інтоксикації мозку, порушення глія-гліальних та глія-нейрональних взаємодій, збільшення транспорту S-100b з астроглії до міжклітинного простору та негативний вплив на нейрони.

ГФКП – один із головних імуноцитохімічних маркерів астроцитів, важливий представник макроглії в ЦНС ссавців. В якості маркерів астрогліальних клітин він широко застосовується в діагностичних цілях та експериментальних роботах при дослідженні функцій нервової системи в нормі та при патології. Однією із ключових та найбільш досліджуваних функцій астроцитів є їхня участь в організації та регуляції проникливості бар'єрної системи мозку (гематоенцефалічного і ліквороенцефалічного бар'єрів). Відомо, що саме накопичення ГФКП пов'язано з забезпеченням астроцитами бар'єрних функцій [61].

Реакція астрогліальних елементів у відповідь на розвиток хронічного панкреатиту виявляється не тільки в змінах кількості астрогліальних клітин як внаслідок процесів міграції і проліферації, але й дозволяє припустити і активацію процесів перебудови (реорганізації) проміжних філаментів астроглії. Встановлена зміна вмісту розчинної форми ГФКП у щурів на 30 добу після тривалої оклюзії панкреатичної протоки, виражена підвищенням концентрації цього білка у екстрактах із досліджуваних структур головного мозку. Так, рівень рГФКП у мозочку був вищим, ніж у контролі, на 31% ($0,63 \pm 0,03$ порівняно з $0,48 \pm 0,05$ мкг рГФКП/мг ЗБ; $P < 0,05$), а у таламусі спостерігалася тенденція до його зростання порівняно з контролем на 12% ($0,61 \pm 0,05$ порівняно з $0,54 \pm 0,06$ мкг рГФКП/мг ЗБ). Таким чином, встановлено підвищення вмісту рГФКБ у мозочку та таламусі (рис. 3.31).

Динаміку зміни вмісту філаментної фракції астроцит-специфічного білка ГФКП у різних відділах головного мозку при формуванні хронічного панкреатиту наведено на рис. 3.32.

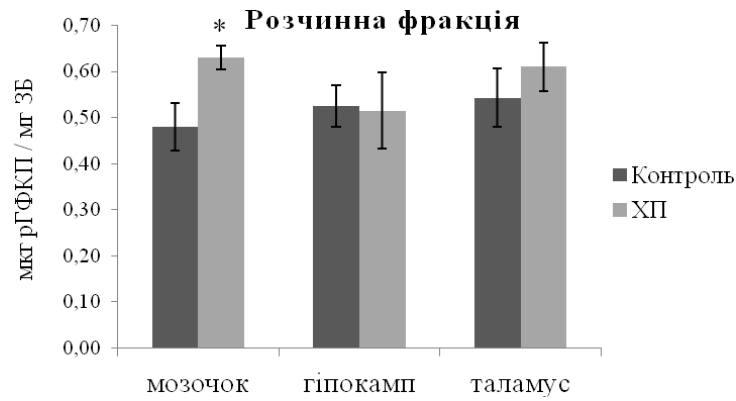


Рис. 3.31. Вміст рГФКП в різних відділах головного мозку щурів

Примітки: Контроль – псевдооперовані тварини, n=6; ХП – щури з хронічним панкреатитом, n=6, * – різниця вірогідна, порівняно з контролем, $P < 0,05$

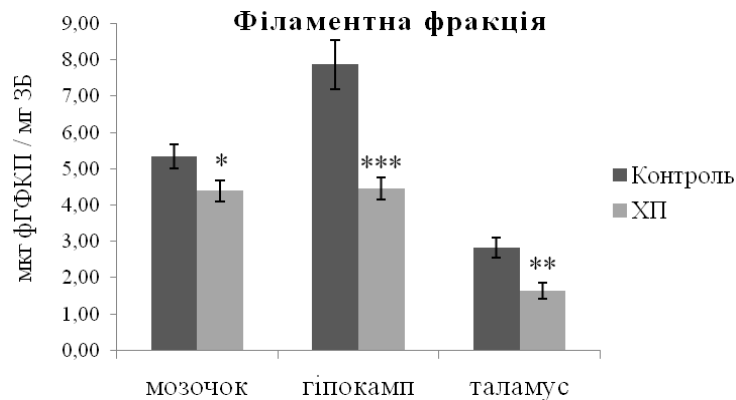


Рис. 3.32. Вміст фГФКП в різних відділах головного мозку щурів

Примітки: Контроль – псевдооперовані тварини, n=6; ХП – щури з хронічним панкреатитом, n=6, *, **, *** – різниця вірогідна, порівняно з контролем, $P < 0,05$, $P < 0,01$, $P < 0,001$ відповідно

Показано, що на 30 добу спостереження рівень ГФКП у всіх досліджуваних відділах мозку щурів вірогідно знизився, порівняно з контролем. У мозочку дане зменшення рівня фГФКП відбулося на 18% (з $5,35 \pm 0,33$ до $4,39 \pm 0,28$ мкг фГФКП/мг ЗБ; $P < 0,05$), у гіпокампі – на 44% (з $7,87 \pm 0,68$ до $4,45 \pm 0,30$ мкг фГФКП/мг ЗБ; $P < 0,001$), а в таламусі – на 42% (з $2,82 \pm 0,27$ до $1,64 \pm 0,23$ мкг фГФКП/мг ЗБ; $P < 0,01$) (див. рис. 3.32).

Вміст розчинної фракції ГФКП, екстрагованої із підшлункової залози, знизився на фіброзній стадії хронічного панкреатиту відносно контролю на 42% ($0,13 \pm 0,02$ проти $0,08 \pm 0,008$ мкг рГФКП/мг ЗБ; $P < 0,05$). Рівень філаментної форми ГФКП в екстракті із підшлункової залози знижувався відносно контролю на 19% ($0,78 \pm 0,04$ порівняно з $0,96 \pm 0,06$ мкг фГФКП/мг ЗБ; $P < 0,05$) (рис. 3.33).

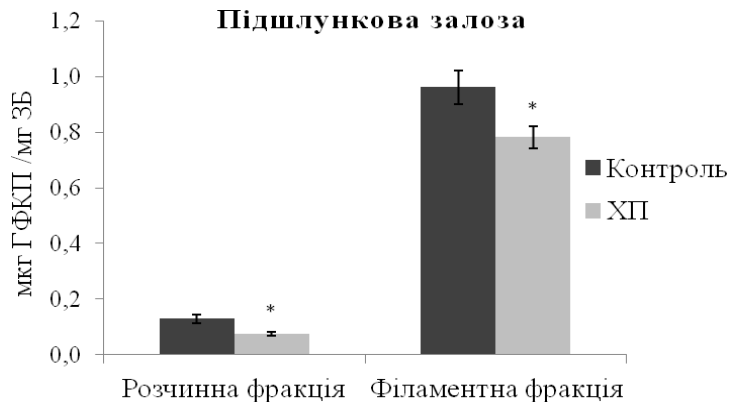


Рис. 3.33. Вміст рГФКП та фГФКП в підшлунковій залозі щурів

Примітки: Контроль – псевдооперовані тварини, $n=6$; ХП – щури з хронічним панкреатитом, $n=6$, * – різниця вірогідна, порівняно з контролем, $P < 0,05$

Встановлений кореляційний зв'язок між підвищенням в гіпокампі та таламусі рівня S-100b і зниженням у цих відділах ГФКП (відповідно $r = -0,657$, $P < 0,05$; $r = -0,714$, $P < 0,05$).

Таким чином, тривала оклюзія панкреатичної протоки на 30 добу спричиняє реорганізацію проміжних філаментів астроцитів головного мозку, що супроводжується кількісними змінами розчинної та філаментної форм ГФКП.

3.2.3. Рівень гіалуронат-зв'язуючої активності білків головного мозку та підшлункової залози щурів за умов розвитку хронічного панкреатиту

Як відомо, в патогенезі неврологічних ускладнень при панкреатиті провідну роль відіграє ферментативна дисфункція підшлункової залози, яка супроводжується виділенням великої кількості протеолітичних ферментів і

надходження їх в кров'яне русло. Це призводить до розладу водно-електролітного балансу, іноді вуглеводного обміну, загальної інтоксикації. В головному мозку та інших відділах нервової системи розвивається набряк, дисциркуляторні порушення, а також дистрофічні зміни нервових клітин, глії та мієлінових оболонки. Питання стосовно метаболізму глікозаміногліканів (ГАГ) та їх специфічних рецепторів у підшлунковій залозі та головному мозку ссавців унаслідок впливу патогенних чинників, викликаних розвитком хронічного панкреатиту, нині майже не вивчено. Важливим було проведення порівняльного аналізу змін загальної ГЗАБ у структурно і функціонально різних відділах мозку та підшлунковій залозі щурів за умов розвитку експериментального хронічного панкреатиту.

Через таку властивість ГАГ як великий заряд і вплив на осмолярність міжклітинної рідини з'явилися первинні дані про регуляцію ними міжклітинних контактів. Експериментальні дослідження останніх років значно розширюють діапазон механізму дії ГАГ міжклітинного матриксу в системі передачі сигналу від однієї клітини до іншої. Важливе місце в цій системі відіграють спряжені групи: ГАГ та їх відповідні рецептори, особливо ГК через її безпосередню участь у міжклітинному сигналюванні.

Результати наших досліджень дають змогу порівняти розподіл ГЗАБ у цитозольній (розчинній), мембранній та екстрацелюлярній/цитоскелетній фракціях, що екстраговані із різних відділів головного мозку та підшлункової залози щурів. Встановлено, що вплив хронічного панкреатиту не призвів до вірогідних змін ГЗАБ розчинної фракції, отриманої із мозочка та гіпокампа експериментальних тварин. У таламусі, що відповідає за перерозподіл інформації, яка надходить до його ядер у вигляді імпульсів, активність білків, які зв'язують ГК, вірогідно збільшилася щодо контрольного значення на 13% ($17,01 \pm 0,83$ проти $15,08 \pm 0,16$ нг зв'яз. ГК/мг ЗБ; $P < 0,05$) (рис. 3.34).

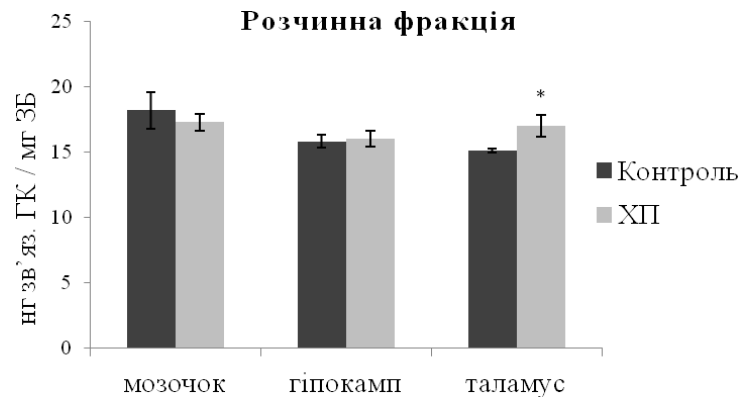


Рис. 3.34. Зміна гіалуронат-зв'язуючої активності розчинних білків, екстрагованих із різних відділів головного мозку

Примітки: Контроль – псевдооперовані тварини, n=6; ХП – щури з хронічним панкреатитом, n=6, * – різниця вірогідна, порівняно з контролем, P<0,05

Нині вже ідентифіковано декілька гіалуронат-зв'язуючих розчинних білків, характерних лише для нервової тканини. Наприклад, гіалуронектин і гіалуронат-зв'язуючий білок астроглії. В мозкових структурах важливу роль відіграють аутокоїди, що зв'язують гіалуронат (водорозчинні медіатори, що здійснюють переважно коротко дистанційну локальну дію). Проведений кореляційний аналіз у групі щурів з експериментальним хронічним панкреатитом виявив високий прямий зв'язок між ГЗАБ мембранною фракцією, екстрагованою із підшлункової залози, та розчинною фракції, отриманої із таламуса ($r=0,870$, $P<0,05$).

При аналізі активності мембранних рецепторів, що зв'язують гіалуронат, було виявлено зниження у мозочку на 41% ($1,08\pm 0,16$ проти $1,84\pm 0,28$ нг зв'яз. ГК/мг ЗБ; $P<0,05$), у таламусі – на 23% ($1,99\pm 0,18$ проти $2,58\pm 0,19$ нг зв'яз. ГК/мг ЗБ; $P<0,05$). У гіпокампі спостерігалось навпаки зростання ГЗАБ на 60% ($1,46\pm 0,21$ проти $0,91\pm 0,14$ нг зв'яз. ГК/мг ЗБ; $P<0,05$) (рис. 3.35).

Таким чином, мембранні гіалуронат-зв'язуючі рецептори активно зв'язували гіалуронат у гіпокампі, тоді як в мозочку і таламусі цей процес знижувався. Отже, ці зміни свідчили про перерозподіл афінності до гіалуронату між різними відділами мозку: у мозочку та таламусі спостерігалось

зниження, а у гіпокампі – підвищення чутливості, що може бути сигналом для певних адаптивних процесів у відділах мозку під час хронізації панкреатиту.

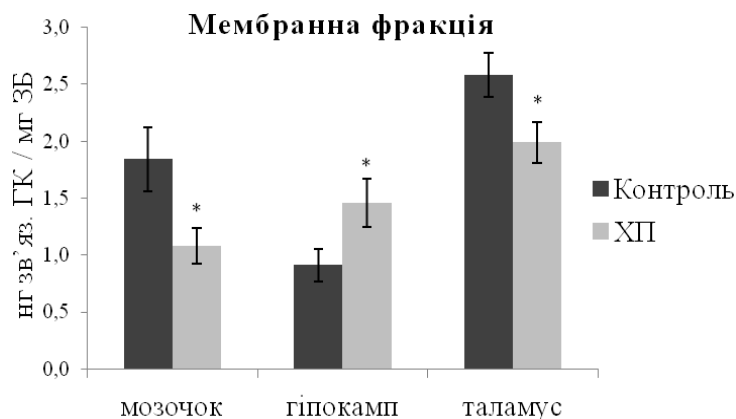


Рис. 3.35. Зміна гіалуронат-зв'язуючої активності мембранних білків, екстрагованих із різних відділів головного мозку

Примітки: Контроль – псевдооперовані тварини, n=6; ХП – щури з хронічним панкреатитом, n=6, * – різниця вірогідна, порівняно з контролем, P<0,05

У результаті впливу хронічного панкреатиту знизилася ГЗАБ цитоскелетної/екстрацелюлярної фракції, екстрагованої з гіпокампа і таламуса, тобто зменшилась афінність рецепторів до гіалуронату (або зниження їх кількості). У гіпокампі зменшилась активність зв'язування гіалуронату, порівняно з контролем, на 31% ($2,86 \pm 0,30$ проти $4,12 \pm 0,48$ нг зв'яз. ГК/мг ЗБ; P<0,05), у таламусі – на 37% ($4,06 \pm 0,29$ проти $6,46 \pm 0,95$ нг зв'яз. ГК/мг ЗБ; P<0,05) (рис. 3.36).

Слід відмітити, що при хронічному панкреатиті достовірних змін в активності гіалуронат-зв'язуючих білків розчинної фракції, екстрагованої із підшлункової залози, не відмічено, а у мембранній фракції – спостерігалось зростання на 53% ($0,26 \pm 0,03$ проти $0,17 \pm 0,03$ нг зв'яз. ГК/мг ЗБ; P<0,05). В цитоскелетній/екстрацелюлярній фракції достовірних змін активності білків, що зв'язують гіалуронат не було зареєстровано (рис. 3.37).

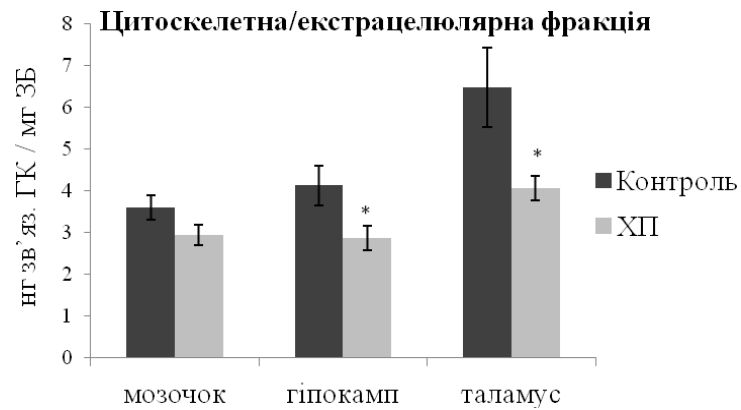


Рис. 3.36. Зміна гіалуронат-зв'язуючої активності цитоскелетних/екстрацелюлярних білків, екстрагованих із різних відділів головного мозку
Примітки: Контроль – псевдооперовані тварини, n=6; ХП – щури з хронічним панкреатитом, n=6, * – різниця вірогідна, порівняно з контролем, $P < 0,05$

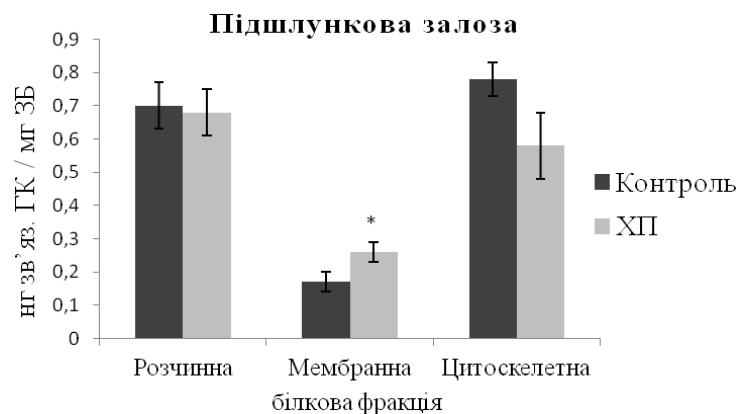


Рис.3.37. Зміна гіалуронат-зв'язуючої активності білків розчинної, мембранної та цитоскелетної/екстрацелюлярної фракцій із підшлункової залози
Примітки: Контроль – псевдооперовані тварини, n=6; ХП – щури з хронічним панкреатитом, n=6, * – різниця вірогідна, порівняно з контролем, $P < 0,05$

При проведенному кореляційному аналізі було виявлено, що при зростанні в плазмі крові рівня ГК, знижується ГЗАБ цитоскелетної/екстрацелюлярної фракції, екстрагованої з гіпокампа і таламуса ($r = -0,870$, $P < 0,05$ та $r = -0,870$, $P < 0,05$ відповідно). Високий зворотний кореляційний зв'язок спостерігався між ГЗАБ розчинної фракції, екстрагованої із підшлункової залози, та білків цитоскелетної/екстрацелюлярної фракції з таламуса і гіпокампа ($r = -0,900$, $P < 0,05$ та $r = -0,810$, $P < 0,05$ відповідно).

Отже, розвиток хронічного панкреатиту супроводжувався значним перерозподілом ступеня афінності рецепторів до гіалуронату у відділах мозку та підшлунковій залозі. Найбільш виражений перерозподіл спостерігався у мембранній фракції білків: у мозочку і таламусі відбувалося зниження, а у гіпокампі – підвищення чутливості, що може бути сигналом для певних адаптивних процесів у мозку під час розвитку панкреатиту.

Основні наукові результати підрозділу опубліковані в роботах [31, 34, 35, 159].

РОЗДІЛ 4

УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

Отримані нами результати роботи можна представити у вигляді схеми (рис. 4.1).

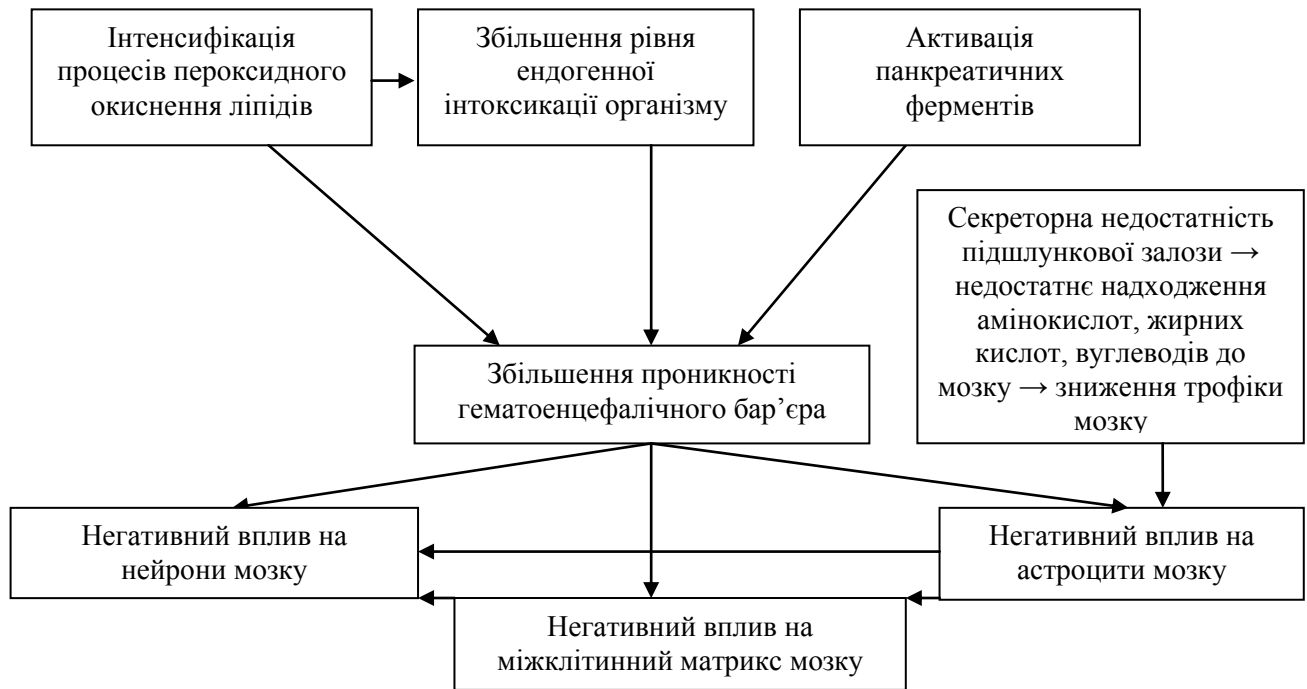


Рис. 4.1. Схема впливу ушкоджуючих факторів під час розвитку панкреатиту на нервові клітини

Показано, що за умов тривалої оклюзії панкреатичної протоки у крові визначається інтенсифікація ПОЛ, підвищення рівня ендогенної інтоксикації та висока активність панкреатичних ферментів, що призводить до збільшення проникності гематоенцефалічного бар'єра (ГЕБ). За свідченням S.L. Lewis (2012) органна недостатність та зниження рівня головних метаболічних субстратів при панкреатиті зумовлює порушення трофіки нервових клітин [152]. Ми припускаємо, що даний комплекс змін у крові може бути індуктором перерозподілу нейроспецифічних білків та ГЗАБ міжклітинного матриксу спочатку як адаптація мозку на інтоксикацію, а при прогресуванні панкреатиту вже може призводити до розвитку енцефалопатії.

Як при короткочасовій, так і при тривалій оклюзії панкреатичної протоки у щурів на ранньому етапі експериментального дослідження розвивався гострий панкреатит. В результаті поступового розсмоктування лігатури у I групі (кінець першого тижня – початок другого) та відсутності її розсмоктування у II групі тварин подальші перебудови в підшлунковій залозі розвивалися двома різними шляхами. Так, для короткочасової оклюзії панкреатичної протоки: запально-некротична стадія гострого панкреатиту → регенераторно-проліферативна стадія → стадія відновлення; для тривалої оклюзії панкреатичної протоки: запально-некротична стадія гострого панкреатиту → перехідна, атрофічно-префіброзна стадія гострого панкреатиту → фіброзна стадія хронічного панкреатиту.

Гострий панкреатит – це некрозапальне захворювання підшлункової залози. Патогенез даної патології не до кінця з'ясований. Понад століття тому Н. Chiari (1896) припустив, що розвиток панкреатиту є результатом аутолізу паренхіми підшлункової залози передчасно активованими травними ферментами [105]. Його перебіг значною мірою залежить від вираженості агресивного впливу активованих панкреатичних ферментів на залозу та прилеглі до неї тканини [37]. Таким чином, перетравлення підшлункової залози власними протеолітичними ферментами вважається основною причиною захворювання гострим панкреатитом. Протеазо-індуковане пошкодження клітин призводить до вивільнення хемокінів, які, у свою чергу, залучають запальні клітини. Їхня системна дія визначає важкість перебігу захворювання [37, 188].

За даними R. Dawra (2011), внутрішньоацинарна активація трипсиногену та НФ-кВ активація відбуваються незалежно і паралельно на ранній стадії панкреатиту. Активація трипсиногену призводить до ацинарного пошкодження під час раннього панкреатиту та пов'язана з приблизно половиною уражень підшлункової залози. Активація НФ-кВ викликає продукцію запальних медіаторів, що призводить до вираженого місцевого запалення та подальшого пошкодження органу. Продукція

медіаторів запалення з ацинусів, а також з діючого запального інфільтрату викликає широке системне запалення протягом розвитку гострого панкреатиту [105].

Встановлення підвищеного рівня панкреатичних ферментів в крові має вирішальне значення в діагностиці гострого панкреатиту [143]. Для гострих атак панкреатиту характерне надходження їх в кров як непряме свідчення пошкодження ацинарних клітин і порушення відтоку панкреатичного секрету. Так, у щурів з короткочасовою та тривалою оклюзією панкреатичної протоки на 6 добу експерименту спостерігалось вірогідне підвищення щодо контролю активності панкреатичних ферментів: α -амілази відповідно на 139% ($P < 0,001$) та 205% ($P < 0,001$), ліпази – на 52% ($P < 0,05$) та 91% ($P < 0,001$), трипсину – на 140% ($P < 0,001$) та 223% ($P < 0,001$). На 15 добу експерименту значення їхньої активності у крові щурів I групи було зниженим, порівняно з попереднім аналогічним значенням, але все ще залишалось високим відносно контролю: α -амілаза на 70% ($P < 0,01$), а трипсин – на 34% ($P < 0,05$). А на 30 добу активність ферментів у крові щурів цієї групи досягла меж фізіологічної норми, що можна пояснити раннім розсмоктуванням лігатури і відновленням нормального функціонування протоки підшлункової залози та органу.

Гістохімічне дослідження панкреатобіоптатів щурів II групи на 15 добу експерименту показало вже розвиток індуративного панкреатиту, наявність великої кількості нейтрофільних сегментоядерних лейкоцитів, тобто продовжувалось загострення в органі. Тривале запалення в підшлунковій залозі підтверджувалось все ще досить високою активністю досліджуваних панкреатичних ферментів: зростання α -амілази на 130% ($P < 0,001$), ліпази – на 81% ($P < 0,01$) та трипсину – на 170% ($P < 0,001$). На 30 добу дослідження активність цих ферментів поступово знижувалась, але залишалась підвищеною, у порівнянні з контролем: α -амілаза – на 46% ($P < 0,01$), ліпаза – на 46% ($P < 0,05$), трипсин – на 81% ($P < 0,001$), що вказує на посилення пошкодження тканини підшлункової залози і втрату нею більшого відсотку своєї функціональної активності.

Наші дані співзвучні з результатами дослідження Г.Я. Шимунова (2006), який також визначав активність α -амілази в крові щурів з гострим та хронічним панкреатитом. Моделювання панкреатиту здійснювалося шляхом однократного введення в підшлункову залозу 0,2 мл 1% тритону X-100. Так, у щурів з гострим панкреатитом активність α -амілази підвищувалася на 67% ($P<0,05$), а з хронічним – на 36% ($P<0,05$), у порівнянні з контролем [76].

Оксидантна система має шкідливий та токсичний вплив на клітини та тканини внаслідок порушення структури ліпідів, нуклеїнових кислот та білків. Окисно-відновна клітинна сигнальна система відіграє важливу роль у розвитку та прогресуванні пошкоджуючого впливу на β -клітини підшлункової залози. Іntenсифікація вільнорадикального окиснення при хронічному панкреатиті частіше за все обумовлена гіпоксією органу, стресовими впливами. Гіпоксія призводить до подальшого посилення процесів ПОЛ та до зміни структури та функції білків, збільшення модифікованої атерогенної фракції ліпопротеїдів, інгібування ферментів АОЗ, що в подальшому спричиняє наростання синдрому ендогенної інтоксикації, збільшення гіпоксичних та ішемічних змін в органах та тканинах, а також призводить до розвитку системних метаболічних змін [72].

А.А. Aghdassi (2011) було показано, що порушення толерантності до глюкози із супутнім зниженням рівня інсуліну відмічається між 28 добою та до 6-12 місяців після лігатури панкреатичної протоки [79]. Це узгоджується з отриманими нами результатами при тривалій оклюзії протоки підшлункової залози на фіброзній стадії хронічного панкреатиту: рівень глюкози підвищувався на 69% ($P<0,01$), порівняно з контролем, та на 61% ($P<0,05$), порівняно з запально-некротичною стадією гострого панкреатиту. Отримані результати свідчать про порушення обміну глюкози при фіброзній трансформації підшлункової залози. У крові тварин II групи при гострому панкреатиті змін вмісту даного показника не відзначалося. Аналогічні дані були отримані і в дослідженні О.П. Тимошенко зі співавт. (2009), які також продемонстрували, що при гострому панкреатиті у собак змін концентрації

глюкози не спостерігається [63]. Проведений кореляційний аналіз у II групі тварин виявив, що в залежності від тривалості захворювання визначається середній зворотній зв'язок між активністю α -амілази та рівнем глюкози ($r = -0,498$, $P < 0,05$), тобто поступове зниження активності даного ферменту в результаті хронізації панкреатиту, порівняно з високими значеннями при гострому панкреатиті, та зростання вмісту глюкози – взаємопов'язані процеси. При короткочасовій оклюзії панкреатичної протоки достовірних змін рівня глюкози в плазмі крові не спостерігалось.

При хронічному панкреатиті нерідко виявляється порушення ліпідного обміну [21, 29]. Згідно отриманих даних, в I групі тварин достовірних змін рівня показників ліпідного обміну в плазмі крові не відзначалося. У II групі тварин на перехідній, атрофічно-префіброзній стадії трансформації підшлункової залози рівень тригліцеридів та холестеролу, порівняно з контролем, збільшувався відповідно на 55% ($P < 0,01$) та 27% ($P < 0,05$), а на фіброзній стадії хронічного панкреатиту – на 63% ($P < 0,001$) та 51% ($P < 0,01$). Таким чином, в плазмі крові відмічено суттєві зміни кількісного вмісту тригліцеридів та холестеролу при фіброзних змінах підшлункової залози. Інші результати були отримані Власовим А.П. та співавторами (2007): при експериментальному панкреатиті у собак, викликаному введенням 0,6 мл жовчі в паренхіму підшлункової залози, спостерігалось зниження вмісту холестеролу та підвищення рівня тригліцеридів [9].

Останнім часом важлива роль відводиться синдрому ендогенної інтоксикації, оскільки він розвивається при всіх патологічних станах, що пов'язані з підвищеним катаболізмом або блокадою детоксикаційних систем організму. Важливим фактором, який впливає на розвиток цього синдрому, незалежно від етіології, є активація процесів вільнорадикального окиснення, що реалізується у вигляді ПОЛ, окисної модифікації білків, середньомолекулярних пептидів і нуклеїнових кислот [74].

Посилення процесів ПОЛ – це неспецифічний процес [22]. Активація вільнорадикальних процесів – універсальний пошкоджуючий механізм, що

може викликати пошкодження та смерть клітини. Вільнорадикально-індуковані процеси можуть привести до некрозу або апоптозу [199]. І цей механізм відіграє ключову роль у патогенезі багатьох захворювань людини [22].

Визначаючи концентрацію ТБК-активних продуктів у плазмі крові, можна побічно судити про ступінь мембранної патології клітин при ураженні підшлункової залози. Так, нами було встановлено вірогідне збільшення вмісту ТБК-активних продуктів у I та II групі щурів на 6 добу дослідження відповідно на 31% ($P < 0,01$) та 24% ($P < 0,01$), порівняно з контролем, що свідчило про активацію процесів ліпопероксидації. Слід відмітити, що на 15 добу лігатури спостерігалася максимальна інтенсифікація процесів ПОЛ: рівень ТБК-активних продуктів зростав щодо контролю на 43% ($P < 0,001$) та 79% ($P < 0,001$) відповідно для двох типів оклюзії панкреатичної протоки. У тварин I групи на 30 добу експерименту достовірних змін вмісту даного показника в плазмі крові тварин не спостерігалось, відбувалось “затухання” вільнорадикальних процесів. Тоді як у тварин II групи на фіброзній стадії хронічного панкреатиту концентрація ТБК-активних продуктів була все ще вищою відносно контролю на 37% ($P < 0,001$), але достовірно нижчою на 24% ($P < 0,05$), ніж у щурів на перехідній, атрофічно-префіброзній стадії гострого панкреатиту. Таким чином, після хірургічного втручання на підшлунковій залозі, пов'язаного з короткочасовою та тривалою оклюзією панкреатичної протоки, ми відзначили на 6 та 15 добу значну активацію процесів ПОЛ, що свідчило про окиснювальне пошкодження мембран панкреатитів. Явище хронізації панкреатиту також характеризувалось відносно активними вільнорадикальними процесами.

Інші дослідники також відмічали значне зростання рівня ТБК-активних продуктів при експериментальному гострому панкреатиті. Так, С.В. Морозов зі співавт. (2006), які для моделювання гострого панкреатиту здійснювали інтрапаренхіматозне введення собакам аутожовчі, визначили, що вже на 2 добу експерименту вміст ТБК-активних продуктів зростав на 135% ($P < 0,05$),

порівняно з контрольною групою [41]. А.П. Власов зі співав. (2012), які також визначали цей показник в плазмі крові собак при експериментальному панкреатиті, показали, що на 5 добу експерименту рівень ТБК-активних продуктів збільшується на 273% ($P < 0,05$), у порівнянні з контролем [8].

Підвищений окиснювальний стрес негативно впливає на нервові клітини. Реактивні кисневі метаболіти є редокс-активними сполуками, і, залежно від їхньої концентрації, можуть мати позитивний (проліферація клітин) або негативний (зупинка клітинного росту, клітинна загибель) ефект на нервові клітини. Зміни в окисно-відновному стані клітин призводять до активації проапоптичних сигнальних білків, особливо через активацію мітоген-активованого протеїнкіназного (МАПК) каскаду і c-jun-амінотермінальної кінази. З іншого боку, здатність нейронів до виживання залежить від модуляції біохімічних шляхів передачі сигналу через серин/треонін кіназу, яка є важливим ефектором фосфатидилінозитол-3-кінази. Крім того, реактивні метаболіти можуть також впливати на мітохондріальні мембрани, призводячи до вивільнення цитохрому С під час апоптозу [111].

Важливо підкреслити, що зміна вільнорадикального окиснення у крові звичайно передуює появі виражених клінічних симптомів ушкодження тканини. Інтенсивність ПОЛ у біомембранах клітин крові обмежується функціонуванням антиоксидантної системи. До потужних систем АОЗ, які відіграють важливу роль у захисті від руйнівного впливу окиснювального стресу, відноситься глутатіонова система, до складу якої входять відновлений глутатіон і ферменти: глутатіонпероксидаза, глутатіонредуктаза. Підтримка оптимального рівня останніх є необхідною для виживання клітин, оскільки інгібування їхньої активності призводить до затримки мітозу і загибелі клітин [73, 150]. На думку Д.О. Воронкіна (2011), детальне дослідження цієї системи не тільки в підшлунковій залозі, а й у крові є важливим для розуміння механізму окиснювального стресу в патогенезі захворювання, що вивчається, та його ускладнень [12]. Саме вираженість змін у системі ПОЛ-АОЗ у крові може свідчити про швидкість прогресування

патологічного процесу та характер можливих ускладнень під час хронізації панкреатиту [71], що можна використовувати в якості доступного біохімічного тест-контролю.

Редокс-регуляція є центральним механізмом в клітинній сигналізації. Дослідниками було показано, що місцеві зміни в окисно-відновних процесах у певний момент часу призводять до зворотньої окисної модифікації ключових білків [140]. Тіолові групи (SH-групи) є основною мішенню цих модифікацій, їх окисно-відновний потенціал активно контролюється оксидоредуктазами. Порушення редокс-сигналізації пов'язане з численними захворюваннями [87, 153, 154]. Таким чином, суттєву роль в підтриманні редокс-потенціалу клітин крові, що визначає ефективність їхнього функціонування, відіграє тіол-дисульфідна система. SH-групи білків і відновленого глутатіону виступають у ролі акцепторів гідроксильного радикалу (HO^\bullet) і синглетного кисню, знижуючи деструктивну і цитотоксичну дію АФК. Відновлений глутатіон забезпечує антиоксидантний детоксикаційний потенціал глутатіонзалежних ферментів [59, 60, 55].

Глутатіон є головним відновлювачем в клітині, що необхідний для протидії АФК. Глутатіонзалежні ферменти відіграють важливу роль в захисті від оксидативного стресу. Глутатіонредуктаза каталізує перехід окисненого глутатіону у відновлений, який необхідний для функціонування глутатіонпероксидази, що, в свою чергу, відновлює перекис водню і перекиси нуклеїнових кислот, білків та ліпідів, тому зниження активності цих ферментів є несприятливим фактором [27].

Таким чином, важливо було з'ясувати стан тіол-дисульфідної системи в еритроцитах щурів з експериментальним панкреатитом на різних етапах його розвитку, так як зміна вмісту SH-груп білків у клітині вказує на порушення в ній окисно-відновних процесів, у котрих сульфгідрильні групи відіграють важливу роль. Було встановлено вірогідне зниження вмісту SH-груп в еритроцитах щурів II групи при фіброзній стадії хронічного панкреатиту на 20% ($P < 0,01$) відносно контролю та на 13% ($P < 0,05$) відносно аналогічного

показника на запально-некротичній стадії гострого панкреатиту. На відміну від SH-груп, рівень дисульфідних зв'язків (-S-S-зв'язки) змінювався протилежно: збільшувався на 32% ($P < 0,05$) на 6 добу, на 38% ($P < 0,05$) – на 15 добу і на 45% ($P < 0,05$) – на 30 добу експерименту, у порівнянні з контролем. Отримані дані підтверджуються високим зворотнім кореляційним зв'язком, встановленим у групі щурів з тривалою оклюзією панкреатичної протоки в залежності від тривалості захворювання: із зниженням вмісту SH-груп зростає вміст -S-S-зв'язків ($r = -0,723$, $P < 0,001$). Ці зміни є неспецифічною реакцією організму на розвиток панкреатиту. Така модифікація змінює стан клітинних мембран, їх проникність і адгезивні властивості, впливає на активність ферментів і клітинну проліферацію. Власне тому співвідношення відновлених і окиснених SH-груп та їх здатність до окиснювальної модифікації (буферна ємність) служать важливими критеріями неспецифічної резистентності організму [49].

У щурів I групи протягом всього дослідження достовірних змін рівня даних показників не спостерігалось.

Встановлена нами інтенсифікація процесів ПОЛ, виражена підвищенням в плазмі крові щурів II групи концентрації ТБК-активних продуктів, супроводжувалася інгібуванням активності глутатіонпероксидази на 16% ($P < 0,05$) і 22% ($P < 0,05$) та глутатіонредуктази на 18% ($P < 0,05$) і 21% ($P < 0,05$) відповідно на 15 добу та 30 добу і пригніченням відновного потенціалу відновленого глутатіону на 16% ($P < 0,01$), 21% ($P < 0,01$) і 26% ($P < 0,01$) відповідно для кожного етапу експерименту, що свідчило про виражений окиснювальний дисбаланс клітин, який розвивався вже на початковому етапі захворювання підшлункової залози, і це погіршувало його протікання. В еритроцитах тварин I групи спостерігалось лише вірогідне зниження вмісту відновленого глутатіону на 19% ($P < 0,01$), 24% ($P < 0,001$) та 18% ($P < 0,001$) відповідно на 6, 15 та 30 добу дослідження, тоді як активність ферментів глутатіонової ланки мала лише тенденцію до зниження, найбільше виражену на 15 добу експерименту.

Тіол-дисульфідна система (як білкові, так і низькомолекулярні компоненти) реагує на розвиток панкреатиту зміною свого окислювально-відновного стану, який характеризується співвідношенням концентрації HS- і -S-S-груп, або тіол-дисульфідним співвідношенням (ТДС). Чим більша вихідна величина ТДС, а саме буферна ємність цієї системи, тим вищий рівень резистентності організму. У щурів II групи на фіброзній стадії хронічного панкреатиту рівень даного показника знижувався на 47% ($P < 0,01$), порівняно з контролем. Для II групи тварин визначена пряма кореляційна залежність між зниженням вмісту відновленого глутатіону та концентрацією SH-груп ($r = 0,493$, $P < 0,05$) та між зниженням вмісту відновленого глутатіону та числовим значенням ТДС ($r = 0,495$, $P < 0,05$). Слід відзначити кореляційний зв'язок між зниженням активності глутатіонпероксидази та зростанням рівня глюкози ($r = -0,552$, $P < 0,05$).

Отже, отримані результати вказують на те, що за умов тривалої оклюзії панкреатичної протоки у щурів спочатку спостерігалася запально-некротична стадія гострого панкреатиту, яка поступово переходила в фіброзну стадію хронічного панкреатиту. У тварин на початковому етапі розвитку гострого панкреатиту спостерігалася інтенсифікація процесів ПОЛ, виражена накопиченням в крові ТБК-активних сполук, і при хронізації панкреатиту оксидативний стрес у тканині залози зменшувався. Визначення показників антиоксидантної системи крові показало, що у щурів під час розвитку експериментального хронічного панкреатиту, відбувалося зниження рівня SH-груп, значення ТДС і зростання вмісту -S-S-груп та зменшення концентрації відновленого глутатіону та активності глутатіонзалежних ферментів в еритроцитах, що вказувало на переважання оксидантної системи над антиоксидантною. У тварин з короткочасовою оклюзією панкреатичної протоки дані зміни були менш вираженими, що вказувало на відновлення балансу в системі ПОЛ-АОЗ після розсмоктування лігатури, накладеної на панкреатичну протоку. Таку особливість змін вмісту відновленого глутатіону та активності глутатіонпероксидази в еритроцитах експериментальних щурів

при хронічному панкреатиті висвітлено також у роботі Н.І. Меринової зі співавт. (2013), де показано зниження даних показників при фіброзі підшлункової залози [40]. Дефіцит відновленого глутатіону в еритроцитах може свідчити про напруження антиоксидантного захисту організму щурів, виступаючи в якості найбільш раннього показника посилення окислювальних процесів в клітинах і може призводити до прогресування захворювання.

Вивільнення у системній кровоплин продуктів вільнорадикального окиснення та ендотоксинів сприяє розвитку ендогенної інтоксикації, в результаті чого виникає дисбаланс численних біохімічних і нейрофізіологічних процесів, що може впливати на важкість перебігу захворювання [1, 64]. Вважають, що молекули середньої маси (МСМ) і ТБК-активні сполуки є найбільш інформативними показниками ендогенної інтоксикації [115]. Накопичення цих нефізіологічних метаболітів у плазмі крові щурів з хронічним панкреатитом, ймовірно, є взаємопов'язаним процесом, що підтверджується позитивним кореляційним зв'язком між вказаними показниками ($r=0,529$, $P<0,05$).

Накопичення МСМ є не лише одним із маркерів ендотоксикації, але й фактором, що ускладнює перебіг патологічного процесу, набуваючи роль вторинних токсинів, впливаючи на функції органів та систем [22]. Аналіз отриманих результатів показав значний вплив ураження підшлункової залози на рівень МСМ, що виражалось вірогідним збільшенням концентрації даного показника в плазмі крові щурів I та II груп на 6 добу експерименту відповідно на 89% ($P<0,001$) та 104% ($P<0,001$), порівняно з контролем, та свідчило про високий рівень ендогенної інтоксикації організму. Дещо нижчий вміст МСМ спостерігався на 15 добу експерименту, проте був все ж достовірно вищий контролю – відповідно на 49% ($P<0,01$) та 54% ($P<0,001$). У щурів II групи з фіброзною стадією хронічного панкреатиту вміст МСМ в плазмі крові тварин залишався вищим від контролю на 57% ($P<0,01$), тоді як у щурів I групи на стадії відновлення вміст показника значно знижувався, порівняно з попередніми значеннями на 6 та 15 добу експерименту.

Окремі фракції МСМ володіють високою біологічною активністю, інгібують метаболізм різних сполук, порушують процеси тканинного дихання та мембранного транспорту, еритропоез, володіють імунодепресивною, цитотоксичною, нейро- і психотропну дію. Не виключено, що зміна фракцій МСМ при панкреатиті має безпосереднє відношення до розвитку патологічного процесу, і тому спектр МСМ (МСМ-230, МСМ-254, МСМ-280) можна розглядати в якості об'єктивного критерію метаболічних порушень при даній патології. У ході аналізу рівня МСМ у крові щурів з 6 добовою короткочасною та тривалою оклюзією панкреатичної протоки виявлено вірогідне збільшення нуклеарної фракції МСМ-230 відповідно на 105% ($P < 0,001$) та 115% ($P < 0,001$), з 15 добовою – на 45% ($P < 0,05$) та 55% ($P < 0,01$) та на 30 добу – на 22% ($P < 0,05$) та 64% ($P < 0,01$), у порівнянні з контролем. Можливо, підвищення даної фракції вказує на збільшення в крові залишків нуклеїнових кислот, що може бути наслідком апоптозу, який відіграє провідну роль у загибелі ацинусів при панкреатиті. Доведено, що при лігуванні панкреатичної протоки розвивається апоптоз ацинарних клітин і атрофія підшлункової залози [24].

Вірогідне збільшення вмісту токсичної фракції МСМ-254, що складається із гідрофобних токсинів, відбувалося лише на 6 добу експерименту в I та II групі щурів відповідно на 129% ($P < 0,01$) та 145% ($P < 0,001$) відносно контролю. Фракція ароматичних хромофорів МСМ-280 вірогідно підвищувалася у обох групах щурів з запально-некротичною стадією гострого панкреатиту на 141% ($P < 0,01$) та 181% ($P < 0,001$) відповідно і у II групі тварин на фіброзній стадії хронічного панкреатиту на 48% ($P < 0,001$), у порівнянні з контролем. Як вже згадувалося, багато з компонентів МСМ характеризуються нейротоксичною активністю, викликають зміну проникності ГЕБ [23]. За даними клінічних досліджень, збільшення вмісту МСМ у плазмі крові при різних соматичній патологіях, а також при ряді захворювань ЦНС є несприятливим прогностичним чинником. М.Г. Узбеков (2010) кореляцію збільшення вмісту МСМ і

несприятливого результату захворювання пов'язував з вираженою цито- і нейротоксичною дією МСМ [66]. Зростання в крові вмісту ТБК-активних продуктів при розвитку панкреатиту у II групі щурів супроводжувалося накопиченням фракцій МСМ, що підтверджувалося прямим кореляційним зв'язком між вмістом ТБК-активних продуктів та МСМ-230 ($r=0,590$, $P<0,01$), МСМ-254 ($r=0,671$, $P<0,01$) та МСМ-280 ($r=0,606$, $P<0,01$).

Отже, у щурів з експериментальним хронічним панкреатитом відбувалося вірогідне збільшення в плазмі крові концентрації ТБК-активних продуктів ($P<0,05$) і МСМ ($P<0,01$), що вказує на розвиток неспецифічної ендогенної інтоксикації. І накопичення цих нефізіологічних метаболітів є взаємопов'язаним процесом, що підтверджується позитивною кореляцією цих біомаркерів ендотоксикозу. Спостерігалось вірогідне збільшення нуклеарної фракції МСМ-230 ($P<0,01$) та фракції ароматичних хромофорів МСМ-280 ($P<0,001$). Результати дослідження А.П. Власова зі співавт. (2012) підтверджують, що при розвитку експериментального панкреатиту проявляються ознаки вираженого ендотоксикозу: вірогідне зростання на 5 добу експерименту в крові собак фракцій МСМ-254 (на 65%; $P<0,01$) та МСМ-280 (на 85%; $P<0,01$), у порівнянні з контролем [7].

Більше десяти років тому стало відомо, що панкреатичні зірчасті клітини (ПЗК) відіграють ключову роль в фіброгенезі підшлункової залози при хронічному панкреатиті [88, 161, 203]. Фіброз підшлункової залози – характерна ознака хронічного панкреатиту [161]. При цьому основними продуцентами надлишку фібрилярного колагену і таких молекул позаклітинного матриксу як фібронектин і ламінін, є активовані ПЗК [65].

Як стверджував А. Madro (2011), незалежно від типу пошкоджуючого фактора, ефект від активації ПЗК однаковий – надмірна продукція компонентів позаклітинного матриксу [158]. ПЗК розташовані в периацинарній, периваскулярній і перидуктальній зоні органу. Ці клітини у стані спокою та активованому стані відрізняються за своїми морфологічними характеристиками, молекулярними маркерами та властивостями. Для

активованих ПЗК властиве збільшене ядро та відсутність жирових крапель [88]. Вплив факторів, що провокують розвиток хронічного панкреатиту, призводить до ушкодження ацинарних клітин, протоків і ендотеліальних клітин та збільшеної продукції лейкоцитів. Ушкоджені клітини підшлункової залози здатні продукувати та вивільняти багато цитокінів, факторів росту, ангіотензин II і ендотелін 1, які активують ПЗК. В результаті цього генеруються речовини, які можуть призводити до їхньої постійної активації. Активовані ПЗК можуть бути еліміновані шляхом апоптозу, що було продемонстровано в досліджах *in vivo*, або бути повернені в стан спокою, що спостерігається лише на клітинних культурах. Стійка активація цих клітин, з іншого боку, призводить до прогресуючого фіброзу [158].

Екстрацелюлярний матрикс складається з різноманітних компонентів, які беруть участь у підтримці нормальної архітекtonіки тканини залози та відіграють важливу роль в біологічних функціях органів [108]. Макромолекули екстрацелюлярного матриксу формують складну 3D сітку, що складається з колагенів, еластину, протеогліканів і несультатованого глікозаміноглікану (ГАГ) – гіалуронової кислоти (ГК) [139, 185]. ГК залучається до ангіогенезу, загоєння ран, клітинної адгезії та запалення [134]. Вона крім активації внутрішньоклітинних сигналів через взаємодію з рецепторами клітинної поверхні забезпечує ще і сприятливе мікрооточення для проліферації і міграції клітин [206]. Синтез, секреція та деградація компонентів позаклітинного матриксу динамічно змінюються в процесі тканинного ремоделювання. В основі фіброзу органу лежить дисбаланс між синтезом надлишку компонентів позаклітинного матриксу клітинами-продуцентами та зниженою деградацією його білків цинк-залежними ферментами родини матриксних металопротеїназ (ММП) [65]. Активність ММП може регулюватися на рівнях транскрипції, активації проферментів або гальмування ферментів тканинними інгібіторами матриксних металопротеїназ (ТІМП) 4 підтипів [65, 185]. ТІМП-1 інгібує активність кількох матриксних металопротеїназ (ММП-1, 3, 8, 9, 10, 13 та 18), а ТІМП-2

відіграє важливу роль у гальмуванні лише ММП-2. Порушення балансу експресії між металопротеїназами та їхніми тканинними інгібіторами відбувається при хронічних запальних процесах, у тому числі, при хронічному панкреатиті. При цьому збільшується секреція протеїназ зірчастими клітинами під дією трансформуючого фактору росту $\beta 1$ (ТФР- $\beta 1$), ІІ-6, етанолу й ацетальдегіду, що сприяє відкладенню фібрилярного колагену з подальшим розвитком фіброзу залози. У регуляції фіброгенезу та фібролізу підшлункової залози особливо важливі ММП-2 та ММП-9. Вони частково деградують колагени I та III типів і колаген IV типу базальних мембран [65]. Саме ці три типи колагену приймають участь у процесах фіброзу органу [108].

Оцінка ступеню фіброзу органу традиційно проводиться за результатами біопсії. Але цей метод має ряд недоліків, в тому числі і інвазивний характер, помилки при виборі місця взяття проби, малий розмір біоптату, суб'єктивний фактор змін, які зумовлюють від 15-65% варіабельності результату, ризик ускладнень [51, 113]. Визначення маркерів фіброзу в периферичній крові – це малоінвазивні методи діагностики. Відомо, що при панкреатиті відбувається зміна рівня ГК в екстрацелюлярному матриксі [206]. Таким чином, сироваткова ГК вважається маркером фіброзу, що з'являється ще до виникнення патологічних змін [113]. Зростання концентрації даного ГАГ в плазмі крові обумовлене збільшенням його продукції ПЗК та порушенням деградації гіалуронідазами (HYAL), через зменшення їхньої активності. Гіалуронідази відіграють важливу роль в деградації ГК. HYAL1, HYAL2 і HYAL3 широко експресуються в соматичних тканинах [112, 113]. Таким чином, можна припустити, що із розвитком хронічного панкреатиту відбувається дисбаланс в системі “гіалуронова кислота - гіалуронідаза” в бік збільшення синтезу цього ГАГ. Отже, ГК – це малоінвазивний маркер, поява якого в плазмі крові може мати важливе значення при визначенні стадії фіброзу органу, в тому числі і підшлункової залози при хронічному панкреатиті.

Наше дослідження по визначенню маркерів фіброзу, яке проводилося в плазмі крові щурів з короткочасною і тривалою оклюзією панкреатичної протоки, підтвердило важливість визначення концентрації ГК для діагностики фіброзу підшлункової залози при хронічному панкреатиті, адже фіброз печінки був виключений шляхом гістохімічного аналізу зразків тканини з даного органу. Отриманий у експериментальних тварин фіброз органу дав змогу отримати повніше уявлення про співвідношення “гіалуронова кислота-фіброз”. За нашими даними, отриманими в результаті аналізу плазми крові тварин II групи на вміст в ній ГК, встановлено, що при відсутності ознак фіброзних змін підшлункової залози на запально-некротичній стадії гострого панкреатиту достовірних змін концентрації ГК не відзначається; на перехідній, атрофічно-префіброзній стадії трансформації підшлункової залози рівень ГК на 25% ($P < 0,05$) перевищує контроль; на фіброзній стадії перебудови підшлункової залози – на 46,9% ($P < 0,001$). Достовірних змін концентрації ГК у крові щурів I групи не було зареєстровано.

Не зважаючи на те, що метаболізм сполучної тканини широко вивчався, проте все ж існує мало інформації про відхилення та зміни біохімічних параметрів при фіброзних переродженнях підшлункової залози при розвитку хронічного панкреатиту. Ще один малоінвазивний біохімічний метод оцінки фіброзу тканини/відкладення колагену – це визначення концентрації оксипроліну вільного (ОПв) та білковозв’язаного (ОПб/зв) в плазмі крові. Дослідження змін рівня цих показників може дати цінну інформацію про біохімічні та патологічні процеси фіброзу в підшлунковій залозі. Підвищення рівня ОПб/зв вказує на посилений синтез, утворення молодого незрілого колагену. ОПв – показник деградації колагену [2, 121, 146, 174, 183]. Результати наших досліджень продуктів метаболізму колагену показали, що вміст ОПб/зв та ОПв в плазмі крові щурів достовірно не змінювався протягом всього експерименту, пов’язаного з короткочасною оклюзією панкреатичної протоки. Отримані дані, а саме тенденція до

підвищення вмісту ОПб/зв та зниження вмісту ОПв, свідчать про незначне колагеноутворення в підшлунковій залозі тварин даної групи, яке супроводжувалося зниженою деградацією колагену.

Аналіз вмісту фракцій оксипроліну в плазмі крові тварин II групи на перехідній, атрофічно-префіброзній стадії трансформації підшлункової залози показав, порівняно з контролем, вірогідне підвищення вмісту ОПб/зв на 24% ($P < 0,05$) і зниження ОПв на 22% ($P < 0,05$), що свідчило про посилення фіброгенезу та зменшення деградації колагену в ураженому органі. Максимальне підвищення рівня ОПб/зв на 39% ($P < 0,001$) і зниження вмісту ОПв на 30% ($P < 0,01$) на 30 добу експерименту означало, що на стадії хронізації панкреатиту превалюють процеси активного колагеноутворення над його деградацією. Отримані дані підтверджувалися високим зворотнім кореляційним зв'язком між вмістом ОПб/зв та ОПв у II групі щурів при розвитку хронічного панкреатиту ($r = -0,748$, $P < 0,001$). Слід також відзначити в цій же групі тварин зворотній кореляційний зв'язок між накопиченням ГК, ОПб/зв та між поступовим зниженням активності ліпази, амілази, трипсину при фіброзній трансформації підшлункової залози: ГК/ліпаза ($r = -0,560$, $P < 0,05$), ГК/ α -амілаза ($r = -0,515$, $P < 0,05$), ГК/трипсин ($r = -0,650$, $P < 0,01$) та ОПб/зв/ліпаза ($r = -0,471$, $P < 0,05$). Спостерігався позитивний кореляційний зв'язок між поступовим зниженням активності трипсину при хронізації панкреатиту та зниженням концентрації ОПв ($r = 0,609$, $P < 0,01$).

Характер змін вмісту оксипроліну білковозв'язаного та вільного в сироватці крові хворих з хронічним панкреатитом, визначений І.А. Криворучко зі співав. (2011) та К.В. Белобородова зі співав. (2010), відрізнявся від наших результатів при експериментальному панкреатиті у щурів тим, що спостерігалось одночасне прискорення як розпаду, так і біосинтезу колагену [2, 26].

Отримані співвідношення кОПб/зв / кОПв на всіх етапах експерименту у II групі щурів при тривалій оклюзії панкреатичної протоки дозволили визначити числові інтервали коефіцієнтів для характеристики панкреатиту на

гострій та хронічній стадіях: на запально-некротичній стадії гострого панкреатиту – 1,09–1,43, на перехідній, атрофічно-префіброзній стадії гострого панкреатиту – 1,44–1,78, на фіброзній стадії хронічного панкреатиту – 1,79 і >.

Таким чином, біохімічний метод діагностики ступеню колагеноутворення в підшлунковій залозі щурів I та II групи підтвердив фіброзування ураженого органу лише у тварин з тривалою оклюзією панкреатичної протоки, що повністю співпадає з результатами гістохімічного дослідження.

Дослідження на опосумах, проведені M.M. Lerch, A.K. Saluja, M. Runzi (1993) показали, що обструкції панкреатичної протоки достатньо, щоб викликати панкреонекроз та ушкодження ацинарних клітин [149].

У поставленому нами експерименті, пов'язаному з короткочасовою та тривалою оклюзією панкреатичної протоки, хронічний панкреатит у щурів розвивався лише у другому випадку, що підтверджувалося біохімічними та гістохімічними дослідженнями. Так, перші 6 діб після оперативного втручання на підшлунковій залозі в обох варіантах експерименту можна визначити як період запалення в органі, про що свідчили результати гістохімічного дослідження, яке встановило наявність лімфоцитарної, нейтрофільної та еозинофільної інфільтрації внутрішньодолькових та міждолькових септ. Характерним було розширення протоків, повнокрів'я. У зразках тканини із підшлункової залози відзначалися також осередки некрозу, гіперплазія острівців Лангерганса. Встановлені зміни структури органу свідчили про розвиток запально-некротичної стадії гострого панкреатиту у щурів з 6 добовою оклюзією в обох випадках. Далі гістохімічні зміни підшлункової залози для вказаних типів оклюзії розвивалися двома різними шляхами. У тварин I групи на 15 добу експерименту на встановленій регенераторно-проліферативній стадії спостерігалися лише незначні фіброзні зміни підшлункової залози та відзначалися поодинокі осередки склерозування, а в подальшому виявлявся

незначний рихлий перидуктальний фіброз, ацинарна тканина залишалася практично неушкодженою. Таким чином, ми не виявили значного порушення структури екзокринної паренхіми та фіброзних змін органу. На 30 добу експерименту на стадії відновлення спостерігалось відновлення функції органу, фіброзні зміни були незначні.

У щурів II групи на 15 добу дослідження на перехідній, атрофічно-префіброзній стадії гострого панкреатиту ми спостерігали прогресування змін у структурі підшлункової залози, що проявлялося розростанням міждолькового та внутрішньодолькового фіброзу, продовжувалося загострення, характерною була наявність нейтрофільних сегментоядерних лейкоцитів з домішками еозинофільних в прошарках між розрізненими острівцями Лангерганса. В подальшому відбувалося заміщення ацинарних структур сполучною тканиною, підшлункова залоза зменшувалася в розмірі і ставала щільнішою. Залишки протоків і ацинусів були оточені фіброзними полями, в яких визначалися великі клітини з поліморфними ядрами. Таким чином, на 30 добу експерименту у щурів з тривалою оклюзією панкреатичної протоки визначалася фіброзна стадія перебудови підшлункової залози.

Наші дані співпадають з результати роботи U.K. Bhanot (2009), який стверджував, що пізня стадія хронічного панкреатиту характеризується прогресуючою втратою ендокринної та екзокринної тканин підшлункової залози [88].

Розрахований комп'ютерний індекс фіброзу (КІФ), що представляє собою співвідношення фіброзної тканини до загальної площі біоптату, підтверджував отримані результати. Так, вірогідне зростання КІФ у I та II групі щурів в 11,8 разів ($P < 0,01$) та в 41,6 разів ($P < 0,01$) відповідно спостерігалось на 30 добу експерименту. В свою чергу, даний показник при тривалій оклюзії панкреатичної протоки в 3,5 рази ($P < 0,05$) перевищував аналогічний показник при короткочасовій оклюзії, що вказує на фіброзну трансформацію підшлункової залози саме у II групі щурів.

В розвитку запального процесу або в попередженні його можливих ускладнень бере участь близько 30 білків крові, що мають загальну назву “гострофазні білки”, до яких належить і церулоплазмін. Це мідьвмісний α_2 -гліпопротеїн, який синтезується гепатоцитами та епітеліоцитами легень. При гострофазній відповіді важливим джерелом церулоплазміну є моноцити. Він транспортує Cu^{2+} мідьвмісним ферментам в плазмі крові, має антиоксидазну активність, попереджує окиснення ліпідів в мембрані клітини. Церулоплазмін належить до в групі пізніх реактантів гострої фази захворювання з помірним ступенем збільшення рівня при запаленні, що відображає компенсаторно-приспосувальну реакцію організму [11]. Було встановлено, що у щурів як при короткочасовій, так і при тривалій оклюзії панкреатичної протоки рівень церулоплазміну на 6 добу експерименту достовірно підвищувався відповідно на 40% ($P < 0,05$) та 34,4% ($P < 0,01$) відносно контролю. Достовірно високою, порівняно з контрольним показником, концентрація церулоплазміну залишалася і на 15 добу дослідження у II групі тварин на 26% ($P < 0,05$). А вже на 30 добу дослідження спостерігалось вірогідне зниження вмісту даного показника на 24% ($P < 0,05$) та 19% ($P < 0,05$) відповідно для I та II групи тварин, порівняно з аналогічними показниками на запально-некротичній стадії гострого панкреатиту.

Наслідком встановленого підвищення рівня ліпопероксидації, ендогенної інтоксикації та гістохімічних змін підшлункової залози було дослідження кількісного розподілу нейроспецифічних білків та рівня ГЗАБ міжклітинного матриксу в структурно та функціонально різних відділах головного мозку та підшлунковій залозі.

Проблемі розвитку панкреатичної енцефалопатії при гострому панкреатиті останнім часом приділяється багато уваги з боку дослідників. Питання про розвиток панкреатичної енцефалопатії при хронічному панкреатиті на сьогоднішній день недостатньо висвітлене, механізми її виникнення потребують детального вивчення. Тому нами проведено комплексне дослідження співвідношення рівня нейрон- та астроцит-

специфічних білків та загальної гіалуронат-зв'язуючої активності білків (ГЗАБ) міжклітинного матриксу в центральній та периферичній нервовій системі експериментальних щурів на фіброзній стадії хронічного панкреатиту. Стан астрогліальних клітин зазвичай оцінюють за рівнем специфічних гліальних білків – Ca^{2+} -зв'язуючого білка S-100b та ГФКП. Гліє-нейрональну взаємодію оцінюють за концентрацією НМКА та станом міжклітинного матриксу, його гіалуронат-зв'язуючих компонентів. Актуальним є визначення характеру взаємодій між нейронами, глією та міжклітинним матриксом за умов розвитку панкреатичної енцефалопатії.

У нашому дослідженні проаналізовано розподіл розчинної та мембранної форми нейрональної молекули клітинної адгезії (НМКА) в мозочку, гіпокампі, таламусі та підшлунковій залозі щурів з експериментальним хронічним панкреатитом в умовах ендогенної інтоксикації. В даний час НМКА вважається багатofункціональним глікопротеїном, що опосередковує адгезію по типу “клітина-клітина” через гомофільну транс-взаємодію і бере участь у численних гетерофільних інтра- та екстрацелюлярних взаємодіях білків [133]; здатен індукувати внутрішньоклітинні сигнали, які модулюють різні біологічні властивості, такі як міграція, цитоскелетна перебудова, проліферація, диференціювання та виживання; бере участь у механізмі регулювання мембранного потенціалу, який визначає збудливість нейронів [94, 145]; взаємодіє з факторами росту і рецепторами факторів росту [133].

НМКА крім участі у розвитку нервової системи, також значною мірою залучена в синаптичну пластичність та когнітивні процеси в зрілому мозку. НМКА бере участь як в короткочасовій пластичності при вже існуючих синапсах, так і в тривалій пластичності, пов'язаній з синаптичним утворенням і/або елімінацією. За сучасними уявленнями про функціональну роль НМКА, блокування функцій даного білка може призвести до когнітивних порушень і емоційних змін, у тому числі: порушення просторового сприйняття і пам'яті, слуху, сприйняття запаху, посилення

тривожності та ін. [90]. Збалансований вміст трансмембранних та розчинних форм НМКА має велике значення для нормального розвитку та функціонування мозку [90, 118, 127, 160].

Зміна розподілу НМКА за умов гострих неврологічних розладів (глобальна гіпоксія, ішемічний та геморагічний інсульт, черепно-мозкові травми) були раніше детально описані [93]. На сьогоднішній день існує дуже мало інформації про розподіл даного білка в різних відділах головного мозку при хронічних захворюваннях внутрішніх органів. Отримані нами дані вказують на залежність розподілу досліджуваних адгезивних молекул в мозочку від збільшення ендотоксинів в крові, викликане розвитком патології підшлункової залози, що виражалось зворотнім кореляційним зв'язком між вмістом мембранної НМКА в екстракті із даного відділу мозку та вмістом МСМ в плазмі крові ($r=-0,600$, $P<0,05$) і позитивним кореляційним зв'язком між концентрацією розчинної НМКА в екстракті із мозочка та концентрацією МСМ-230 в плазмі крові ($r=0,943$, $P<0,01$). Мішенню негативного впливу ендотоксинів в головному мозку в першу чергу є мембранозв'язані білки, в тому числі НМКА, що проявилось вірогідним зниженням концентрації цих молекул ($P<0,01$) у фракції, виділеної із мозочку. Паралельно з цим спостерігалось вірогідне збільшення ($P<0,05$) у мозочку відносно контролю вмісту рНМКА, ймовірно, за рахунок ферментативного розщеплення мембранозв'язаних НМКА, "зрізання" цих молекул з мембрани клітин. Ці результати у II групі щурів з фіброзною стадією хронічного панкреатиту підтверджувалися зворотнім кореляційним зв'язком між рівнем рНМКА та мНМКА в екстрактах із мозочка ($r=-0,886$, $P<0,05$). Розвиток даної патології призводить до зниження міжклітинної адгезії в мозочку, який має найважливіше значення для координації та регуляції рухової активності, підтримки рівноваги тіла і його орієнтації в просторі.

Розчинна форма НМКА існує в різних ізоформах (від 180 до 100 кДа). Білок може продукуватися різними способами, наприклад, шляхом альтернативного сплайсингу НМКА1, ферментативного процесингу

позаклітинного домену на клітинній мембрані і відриву НМКА-місних фрагментів мембран. Розчинна НМКА перешкоджає гомофільній взаємодії між мембранозв'язаними ізоформами НМКА і знижує НМКА-опосередковану адгезію. Розчинна НМКА може модулювати відростання аксонів і їх розгалуження *in vitro*. Надлишкова експресія рНМКА у мишей *in vivo* порушує синаптичний зв'язок і призводить до аномального стану. Рівень рНМКА в тканинах головного мозку, спинномозковій рідині та сироватці крові змінюються при багатьох захворюваннях, а в багатьох випадках концентрація рНМКА пов'язана з прогресуванням клінічного стану або захворювання [187].

Основна функція розчинної НМКА полягає в регуляції позаклітинного сигналювання [125]. Мембранна НМКА регулює міжклітинну адгезію, міграцію нейронів [115]. Трансмембранні адгезивні молекули є не лише посередниками в процесі розпізнавання між клітинами, але й також можуть перетворювати сигнали в середині клітини і таким чином викликати клітинну відповідь, що регулює онтогенез та синаптичну пластичність (у тому числі при навчанні та пам'яті) [145, 167]. Тому в результаті перерозподілу НМКА між фракціями при експериментальному хронічному панкреатиті, коли в мозочку спостерігалось збільшення кількості розчинних та зниження мембранних молекул, змінюються функції як рНМКА, так і мНМКА.

Чутлива реакція таламусу, що приймає ноцицептивні сигнали, на інтоксикацію організму внаслідок захворювання підшлункової залози підтверджувалася прямим кореляційним зв'язком між вмістом мНМКА в даному відділі та МСМ-280 в плазмі крові ($r=0,829$, $P<0,05$) та виражалася вірогідним ($P<0,01$) зростанням концентрації мНМКА відносно контролю. Вміст рНМКА у фракції, екстрагованій із цього ж відділу, мав тенденцію до зниження. Певний дисбаланс вмісту НМКА в мозочку та таламусі свідчив про перерозподіл цього білка між зазначеними відділами головного мозку, завдяки чому, можливо, забезпечується пластичність нервової системи в умовах розвитку фіброзної стадії хронічного панкреатиту у щурів.

Концентрація як мНМКА, так і рНМКА у фракціях, виділених із гіпокампа, мала тільки тенденцію до зниження, що вказує на нормальне функціонування відділу мозку, відповідального за пізнавальну діяльність. Як видно з представлених результатів, розвиток хронічного панкреатиту найбільш суттєво впливає на функціонування мозочка і таламуса.

Паралельно з дослідженням вмісту рНМКА та мНМКА в мозочку, гіпокампі та таламусі ми визначали концентрацію цих же форм даного білка в екстракті із підшлункової залози щурів з експериментальним хронічним панкреатитом. І в цьому випадку достовірних відмінностей рівня розчинної і мембранної форми НМКА не відзначалося, порівняно з контролем. Слід визначити, що вміст мНМКА в мозку був у середньому більше ніж в 100 разів вищим, у порівнянні з підшлунковою залозою.

Отже, в результаті ендогенної інтоксикації за умов розвитку хронічного панкреатиту відбувається достовірний протилежно направлений перерозподіл розчинної та мембранної форм НМКА в мозочку та таламусі дослідних щурів.

Підвищення рівня S-100b розглядається в якості біохімічного маркера патологічного стану нервової системи. Ми досліджували вміст даного Ca²⁺-зв'язуючого білка S-100b в екстракті із відділів мозку (мозочка, гіпокампа і таламуса) і підшлункової залози щурів з експериментальним хронічним панкреатитом, яким здійснювали 30 добову тривалу оклюзію панкреатичної протоки. Спостерігалось вірогідне зростання концентрації S-100b в гіпокампі на 78% (P<0,01) та в таламусі – на 60% (P<0,01) відносно контролю. Дане підвищення вмісту S-100b, який продукується переважно астроцитами мозку, вказує на активацію астроглії внаслідок інтоксикації мозку при фіброзній стадії хронічного панкреатиту. S-100b, вивільняючись із ушкодженої тканини, може посилювати нейродегенерацію шляхом S-100b-індукованого апоптозу.

Проведений кореляційний аналіз виявив прямий зв'язок у тварин з 30 добовою тривалою оклюзією панкреатичної протоки між накопиченням

MCM-230 та концентрацією S-100b у фракції, екстрагованій із гіпокампа ($r=0,900$, $P<0,05$). Виявили вірогідне підвищення розчинної форми S-100b в екстракті із підшлункової залози на 120% ($P<0,01$), порівняно з контрольною групою, що свідчило про активацію ушкодження Ca^{2+} -залежних механізмів за допомогою цього білка у периферичних нервах і взаємодію з рецептором до кінцевих продуктів глікірування (RAGE) цитоплазматичної мембрани, що може призводити до збудження сигнальних внутрішньоклітинних кіназ MAPK – екстрацелюлярних сигнальних кіназ, p38 і jun-термінальних кіназ, які беруть участь в процесах синтезу прозапальних цитокінів. Збудження RAGE активує внутрішньоклітинні сигнальні шляхи, які обумовлюють індукцію НФ-кВ [192]. Вміст S-100b у фракціях, екстрагованих із відділів головного мозку, був у середньому у 10 разів вищим, ніж у екстракті із підшлункової залози.

Підвищена експресія гліального фібрилярного кислого протеїну ГФКП є важливим маркером активації глії після пошкодження ЦНС, але що дане збільшення значить для виживання оточуючих нейронів і який його потенціал для регенерації аксонів не зовсім зрозуміло. Тоді як підвищення вмісту ГФКП як маркеру реактивності глії повинно вважатися як негативний результат для нейронів, є докази того, що це може бути не так, і що гліальна реактивність та зміни експресії даного білка слід розглядати в контексті їхнього виникнення. ГФКП здатен позитивно впливати на здатність до регенерації нейронів, змінюючи локалізацію білків, які можуть взаємодіяти з нейронами в гліальних клітинних мембранах; здатен контролювати експресію інших молекул, що секретуються, таких як гліальний нейротрофічний фактор або позаклітинний матриксний білок ламінін, які змінюють регенерацію аксонів. ГФКП може виступати в якості каркасів для нових нейритів [200].

Багато клітин за межами ЦНС в нейронній та ненеуронній тканині мають морфологічну і функціональну подібність з астроцитами. Периферичні ганглії містять клітини-сателіти, які експресують ГФКП.

Периферичні нерви мають немієлінізовані шванівські клітини, що синтезують ГФКП та оточують немієлінізовані аксони. Він широко експресується в багатьох тканинах за допомогою різних видів клітин, включаючи мезенхімальні зірчасті клітини, що мають структурну та функціональну подібність з астроцитами, в тому числі в печінці, нирках і підшлунковій залозі. Функціональна роль цих клітин та їх потенційна подібність з астроцитами тільки починає досліджуватися. Наприклад, з'являється все більше доказів того, що ГФКП-експресія ПЗК відіграє важливу роль в тканинній репарації, фіброзі і формуванні рубців [190].

Слід відзначити середній зворотній кореляційний зв'язок між підвищенням в гіпокампі вмісту S-100b та зниженням фГФКП ($r=-0,657$, $P<0,05$) та між підвищенням в таламусі вмісту S-100b та зниженням фГФКП ($r=-0,714$, $P<0,05$). Відомо, що S-100b пригнічує збирання проміжних філаментів шляхом інгібування полімеризації ГФКП за наявності Ca^{2+} [186, 194]. Тому в нашому експерименті при зростанні концентрації S-100b в таламусі та гіпокампі і відбувається зниження вмісту філаментної форми ГФКП у вказаних відділах мозку.

Відомо, що енцефалопатія може призводити до легких та тяжких психоневрологічних симптомів, набряку мозку з підвищенням внутрішньочерепного тиску. Астроцити відіграють центральну роль в патофізіології енцефалопатії. Набряк мозку в значній мірі відбувається в результаті набряку астроцитів, що, в свою чергу, викликано поглинанням цими клітинами NH_4^+ . Хоча таке поглинання розглядається спочатку в якості нейропротекторних механізмів, воно також призводить до синтезу глутаміну із глутамату за допомогою глутаматсинтетази, в результаті чого виникають зміни в гомеостазі нейромедіаторів, що може викликати поведінкові симптоми. Накопичення глутаміну в астроцитах також призводить до осмотичного стресу, що викликає набряк астроцитів і прогресування цитотоксичного набряку [190].

Ми досліджували вміст ГФКП в екстракті із відділів головного мозку (мозочка, гіпокампа і таламуса) та підшлункової залози щурів на фіброзній стадії хронічного панкреатиту. В екстракті із мозочку тварин з хронічним панкреатитом визначалося вірогідне зростання вмісту рГФКП на 31% ($P < 0,05$), а з гіпокампа спостерігалася тенденція до збільшення на 12%, порівняно з контролем. Вміст філаментної форми даного білка вірогідно знижувався відносно контролю у всіх досліджуваних відділах мозку експериментальних щурів на 18% ($P < 0,05$), 44% ($P < 0,001$) та 42% ($P < 0,01$) відповідно для мозочка, гіпокампа та таламуса. Слід відмітити, що у відділах мозку щурів вміст рГФКП та фГФКП був відповідно у 5 та 10 разів вищим, порівняно із підшлунковою залозою.

Виявили вірогідне зниження розчинної та філаментної форми ГФКП в екстракті із підшлункової залози щурів відповідно на 42% ($P < 0,05$) та 19% ($P < 0,05$) відносно контролю.

Отже, в результаті розвитку фіброзної стадії хронічного панкреатиту спостерігався перерозподіл вмісту ГФКП між розчинною та філаментною фракціями в мозочку та таламусі. Збільшення рівня рГФКП в цих відділах головного мозку відбувалося за рахунок зниження рівня фГФКП. Дані зміни в цитозольній фракції досліджуваного білка свідчили про активацію астроглії внаслідок інтоксикації мозку при прогресуванні патології підшлункової залози, а перерозподіл між фракціями – про реорганізацію проміжних філаментів астроцитів, про порушення структурної підтримки цих клітин.

Кореляційним аналізом визначено, що з накопиченням МСМ-280 при хронізації панкреатиту зростає концентрація рГФКП в екстракті з мозочка тварин ($r = 0,829$, $P < 0,05$). Встановлено, що підвищення рівня в таламусі рГФКП пов'язане зі зниженням фГФКП ($r = -0,878$, $P < 0,05$), а підвищення рівня в мозочку рГФКП – зі зниженням фГФКП ($r = -0,886$, $P < 0,05$).

Оскільки при розвитку хронічного панкреатиту нами було встановлено підвищення рівня гіалуронової кислоти (ГК) в крові щурів, то важливо було

з'ясувати як це впливає на гіалуронат-зв'язуючу активність білків (ГЗАБ) міжклітинного матриксу в мозку та підшлунковій залозі.

Результати нашого експерименту підтверджують важливу роль ГК і білків, що її зв'язують, у патогенезі хронічного панкреатиту. Накопичення цього ГАГ часто пов'язане з порушенням експресії гіалуронат-зв'язуючих білків під час ураження тканин при патологічних станах. Порушення регуляції експресії ГК та білків, що її зв'язують, призводить до істотних змін у скоординованому регуляторному процесі, направленому на подолання захворювання, за допомогою клітинних і молекулярних регуляторних механізмів. У багатьох випадках ці компоненти беруть участь у регуляції таких функцій клітин, як вивільнення цитокінів, міграція клітин, апоптоз, регуляція клітинної рухливості, адгезії та активації тощо. ГК та гіалуронат-зв'язуючі білки здатні посилювати сигнал для прискорення імунного захисту. Водночас вони можуть виконувати захисну функцію, перешкоджаючи подальшому ураженню тканини, а також позитивно або негативно впливати на організм залежно від їх розташування, розміру ГК (при високій молекулярній масі має протизапальні властивості, при низькій – прозапальні, проангіогенні) і тривалості накопичення [78, 135, 138, 141, 156, 208].

Гіалуронова кислота взаємодіє з різноманітними рецепторами клітинної поверхні, кожен з яких має свої функції. Таким чином, її функції визначаються білками, з якими вона асоціюється. Незважаючи на те, що CD44 зв'язується з різними лігандами екстрацелюлярного матриксу, цей ГАГ, напевне, його основний ліганд. CD44 впливає на клітину за допомогою регулювання актинового цитоскелета. ГК існує з високою або низькою молекулярною масою і сигналювання за участю CD44 залежить від того, які ізоформи цього ГАГ зв'язуються з даним рецептором. Рецептор для гіалуронат-опосередкованої рухливості (RHAMM) взаємодіє з ГК як поза-, так внутрішньоклітинно. Позаклітинний RHAMM відіграє ключову роль у забезпеченні рухливості клітин, зв'язуючись із ГК, а внутрішньоклітинний – тісно пов'язаний з мікротрубочками, що відіграє важливу роль у контролі

клітинного циклу і в мітотичному формуванні веретена та стабільності. Чутливий до гіалуронату рецептор лімфатичних судин – мембранний рецептор з високою специфічністю до ГК. З її допомогою він опосередковує клітинну адгезію і міграцію в лімфатичній системі. Чутливий до гіалуронату рецептор для ендоцитозу був вперше ідентифікований Zhou і співавт. в 2000 р., знаходиться в серці, мозку, нирках, епендимальних клітинах, що вистилають шлуночки головного мозку [135, 184, 189].

Порушення в системі “гіалуронат-зв’язуючі рецептори-гіалуронова кислота”, пов’язані зі зниженням або підвищенням гіалуронат-зв’язуючої активності білків, є результатом токсикації організму внаслідок розвитку хронічного панкреатиту. Нами було встановлено, що при хронізації панкреатиту активність гіалуронат-зв’язуючих рецепторів як розчинної, так і цитоскелетної/екстрацелюлярної фракцій, які екстраговані із підшлункової залози, була приблизно на одному рівні і в середньому в 3,1 рази перевищувала активність зв’язування гіалуронату мембранними рецепторами. Слід відзначити чутливу реакцію на несприятливий вплив, викликаний захворюванням підшлункової залози, саме мембранних білків, що проявилось вірогідним зростанням ГЗАБ. Характерною особливістю розчинних білків-рецепторів, отриманих з досліджуваних відділів мозку, є їхня відносно висока активність, яка в середньому (для мозочка, гіпокампа і таламуса) в 10 разів перевищувала активність мембранних та в 4,1 рази – цитоскелетних/екстрацелюлярних білків, які зв’язують гіалуронат. У таламусі відбувалося вірогідне підвищення ГЗАБ розчинної фракції. Так, активність зв’язування гіалуронату мембранними рецепторами із гіпокампа достовірно зростала, тоді як у мозочку та таламусі ГЗАБ знижувалася, що вказує на зміни афінності мембранних рецепторів до гіалуронату та про зміни в процесах передачі сигналів від однієї клітини до іншої. Найвища активність зв’язування гіалуронату цими рецепторами відзначалася в таламусі, найнижча – в гіпокампі (рис. 4.2).

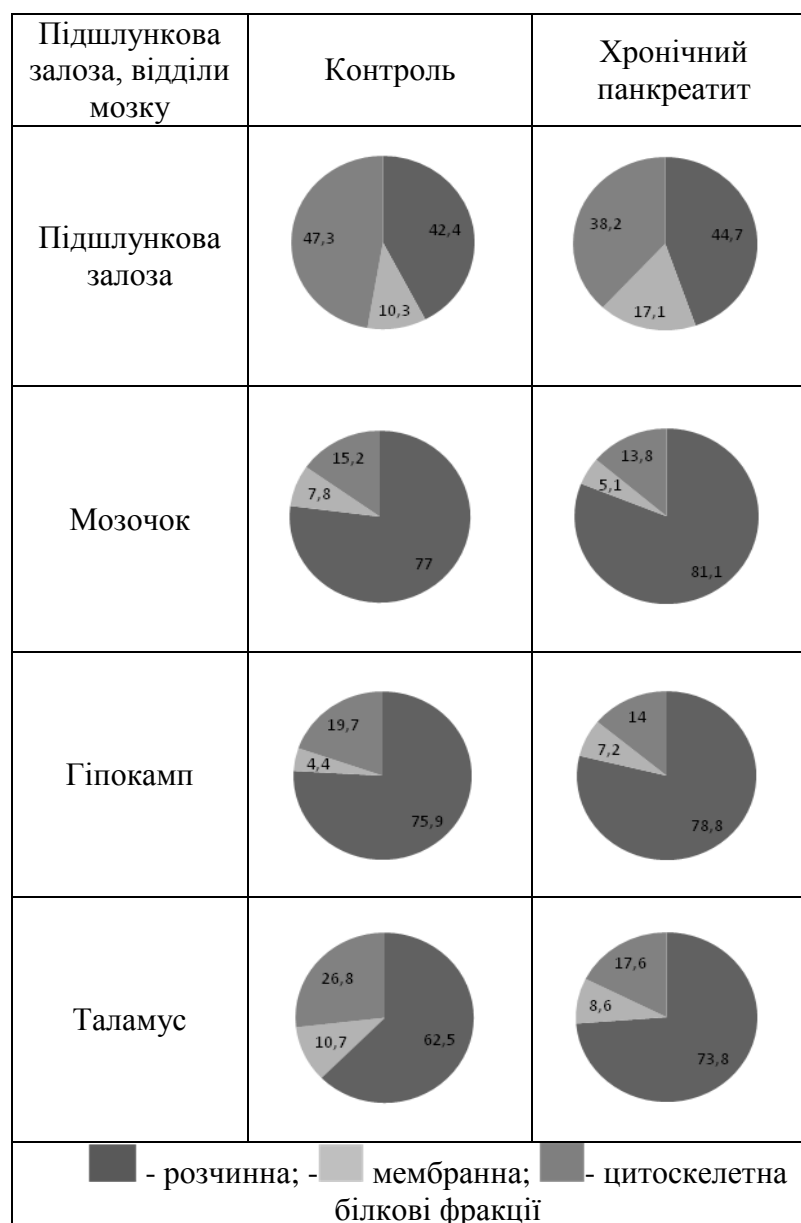


Рис. 4.2. Відсоткове співвідношення гіалуронат-зв'язуючих білків у різних фракціях що отримані із підшлункової залози та різних відділів мозку

Розвиток хронічного панкреатиту викликав зниження ГЗАБ цитоскелетної/екстрацелюлярної фракцій із мозочка, гіпокампа та таламуса. Найвища гіалуронат-зв'язуюча активність цих білків спостерігалася в таламусі, а найнижча – в мозочку (див. рис. 4.2).

На підставі отриманих експериментальних даних можна представити загальну схему перерозподілу рівня нейрон- та астроцит-специфічних білків

та ГЗАБ в головному мозку дослідних щурів за умов розвитку панкреатичної енцефалопатії представлена на рис. 4.3.

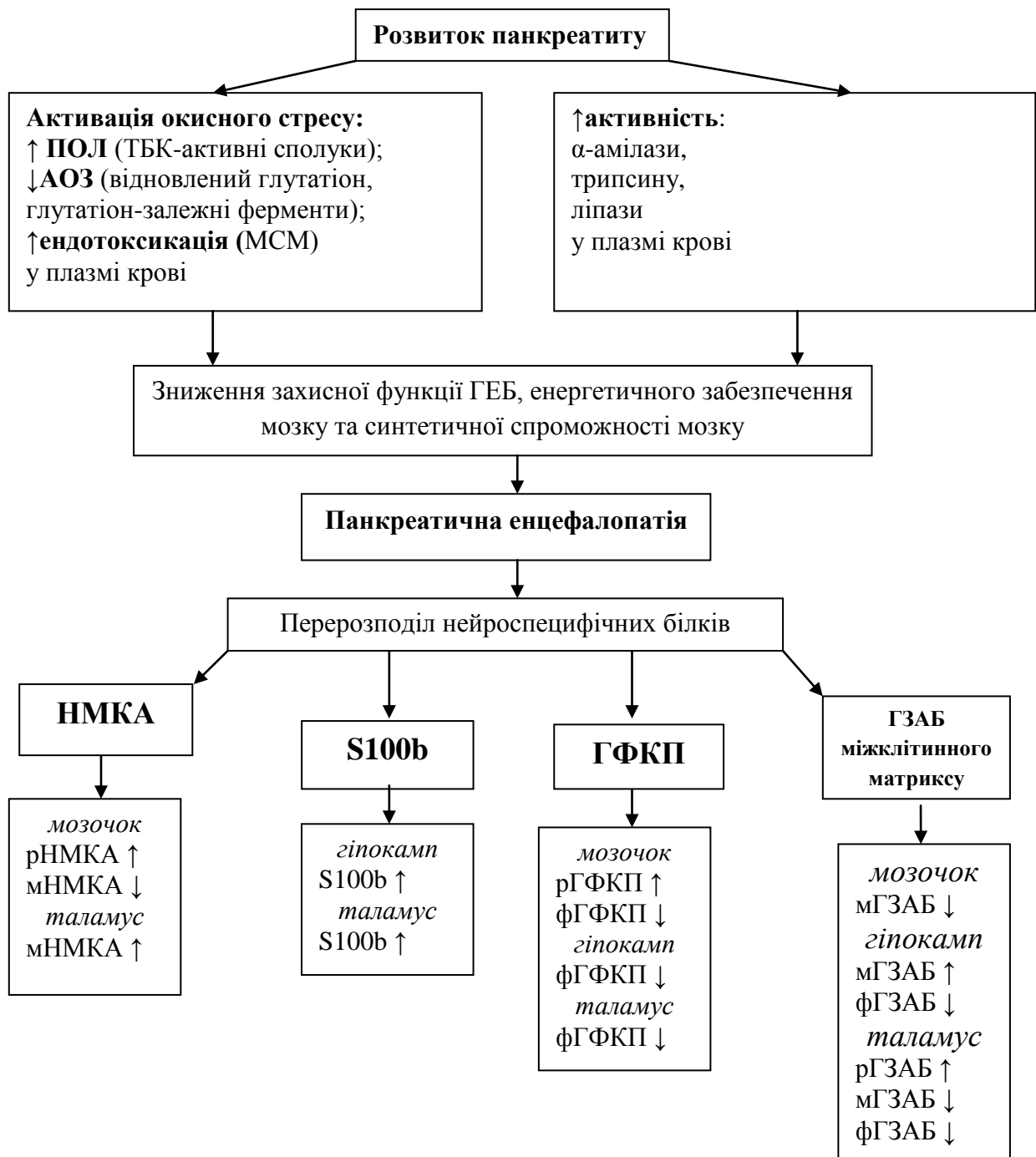


Рис. 4.3. Схема перерозподілу рівня нейрон- та астроцит-специфічних білків та гіалуронат-зв'язуючих білків за умов панкреатичної енцефалопатії

Результати кореляційного аналізу виявили, що при зростанні в плазмі крові концентрації МСМ, підвищується рівень ГЗАБ розчинної фракції,

екстрагованої з таламуса ($r=0,829$, $P<0,05$), і мембранної фракції з гіпокампа ($r=0,611$, $P<0,01$). Також було встановлено, що при накопиченні МСМ знижується ГЗАБ мембранної фракції із таламуса ($r=-0,510$, $P<0,05$), а при зростанні вмісту МСМ-280 знижується ГЗАБ цитоскелетної/екстрацелюлярної фракції із мозочку ($r=-0,900$, $P<0,05$).

Слід також відзначити, позитивний кореляційний зв'язок між зниженням ГЗАБ в розчинній та цитоскелетній/екстрацелюлярній фракціях із мозочку ($r=0,493$, $P<0,05$), а також між зниженням даного показнику в цитоскелетній/екстрацелюлярній фракціях із гіпокампа та таламуса ($r=0,886$, $P<0,05$). Зворотній кореляційний зв'язок спостерігався між підвищенням ГЗАБ в розчинній фракції та зниженням її у мембранній фракції, екстрагованих із таламуса ($r=-0,723$, $P<0,01$).

Методи дослідження поведінки тварин є чутливими та доступними для використання тестами, що свідчать про стан координуючої та інтегруючої функції мозку [18, 25]. Тест “відкрите поле”, що включає реакції, які характеризують рухову активність та вегетативні функції, застосовується для вивчення емоційної реактивності дрібних тварин. Тобто він спрямований на дослідження їх поведінки у нових стресогенних умовах та дозволяє оцінити: вираженість та динаміку окремих елементів поведінкових реакцій; емоційно-поведінкову реактивність тварини; стратегію дослідницької поведінки; звикання; запам'ятовування обстановочних стимулів. У “відкритому полі” на тварину впливає заміна звичного зовнішнього середовища незнайомою обстановкою тесту [3, 30, 39, 53].

В.В. Кальян (2007) проаналізував ряд робіт, присвячених дослідженню фізіологічної активності тварин, і встановив, що факторами, які визначають поведінку щурів у “відкритому полі”, є дослідницька мотивація та емоційна реактивність (Чуян та ін., 2003). Фактор емоційності при проведенні даного тесту проявляється через локомоторну активність щурів (Титов, Каменский, 1980; Candland, Nagy, 1969; Tamasy et al., 1973) та вегетативну функцію у вигляді уринації та дефекації (Кулагин, Федоров, 1969). Згідно даних (Hall,

1934), емоційність вказує на пасивно-оборонну поведінку щурів, для яких характерні низька рухова активність та високий рівень вегетативної реакції, відповідно проводять деяку аналогію між неемоційністю та активно-оборонною поведінкою. В той же час вертикальні стійки, грумінг та заглядання в нірки вважають видоспецифічними проявами орієнтувально-дослідницької діяльності (Silverman, 1996). Встановлено, що зі збільшенням величини дефекації знижується рухова активність тварин (Кулагин, Федоров, 1969). Але також існують дані, що ці два показники взаємно не пов'язані (Титов, Каменский, 1980). Цей факт пояснюють тим, що локомоторна реакція тварин при розміщенні їх в нових обставинах може здійснюватись у зв'язку з двома абсолютно різними мотиваціями: уникнення та дослідження нової території (Маркель, Хусаинов, 1976) [18].

Підсумовуючи результати проведених нами досліджень по моделюванню панкреатиту шляхом короткочасової та тривалої оклюзії панкреатичної протоки, можна стверджувати, що розвиток патології підшлункової залози здатний впливати на нервову систему щурів та змінювати їх поведінку у “відкритому полі”. Так, при реєстрації локомоторної активності на 5 добу експерименту спостерігалось її зниження у тварин обох дослідних груп (кількість перетинів ліній зовнішніх квадратів знизилася на 39% ($P < 0,05$) та 51% ($P < 0,01$) та кількість перетину ліній внутрішніх квадратів – на 42% та 92% ($P < 0,01$) відповідно для I та II групи щурів), що є проявом збільшення страху, чого ми не спостерігали в контрольній групі. Паралельно з цим зростала кількість уринацій (на 24% та 75%) та дефекацій (на 34% та 166% відповідно для двох типів оклюзії). Подібний загальний спад горизонтальної рухової активності та зростання показників вегетативного балансу у II групі щурів виявлявся при повторній оцінці даних характеристик на 14 добу (кількість перетинів ліній зовнішніх квадратів знизилася на 81% ($P < 0,001$), а внутрішніх квадратів – на 92% ($P < 0,01$), кількість дефекацій зросла на 124% ($P < 0,05$)) та на 29 добу експерименту (кількість перетинів ліній зовнішніх квадратів знизилася на

85% ($P < 0,001$), а внутрішніх квадратів – на 100%, кількість уринацій зростає на 52%, а дефекацій – на 66%), тоді як у щурів з короткочасною оклюзією панкреатичної протоки спостерігалася поступова нормалізація цих показників. Таким чином, зниження локомоторної активності та зростання показників вегетативної функції вказує на посилення тривожно-фобічних реакцій у щурів після моделювання їм хронічного панкреатиту.

Метою нашої роботи було також простежити динаміку орієнтувально-дослідницької поведінки тварин протягом експериментального періоду. Різновидом даної поведінки щурів є кількість здійснених ними вертикальних стійок та обстежених отворів (нірок), що вказує на здатність тварини досліджувати “відкрите поле”. Дані показники характеризують пізнавальну активність щурів. Моделювання панкреатиту сприяло статистично вірогідному зниженню на 5 добу експерименту пізнавальної активності тварин, що проявлялося зменшенням відносно контролю на 35% ($P < 0,05$) та 38% ($P < 0,05$) кількості стійок та зниженням на 40% ($P < 0,05$) та 60% ($P < 0,01$) кількості зазирань у нірки відповідно для I та II групи щурів. Надалі достовірні зміни показників орієнтувально-дослідницької поведінки стосувалися лише II групи тварин. Так, кількість вертикальних стійок знижувалася відповідно на 14 та 29 добу дослідження на 88% ($P < 0,001$) та 95% ($P < 0,001$), а кількість зазирань у нірку зменшувалася на 85% ($P < 0,001$) та 85% ($P < 0,001$), порівняно з контролем. Грумінг щурів (косметична поведінка) також характеризує поведінку тварин у “відкритому полі”. Вірогідне зростання даного показника спостерігалася у тварин з короткочасною оклюзією протоки підшлункової залози лише на 5 добу дослідження на 76% ($P < 0,05$), порівняно з контролем, а в подальшому спостерігалися лише незначні коливання значення даного показника.

В залежності від тривалості розвитку захворювання у щурів I групи спостерігалася пряма кореляційна залежність між високим вмістом ТБК-активних продуктів та зростанням грумінгу ($r = 0,527$, $P < 0,05$) та обернена залежність між накопиченням МСМ-280 та зниженням кількості зазирань у

нірки ($r=-0,562$, $P<0,05$). Слід відмітити і від'ємний зв'язок між зростанням грумінгу та зниженням перетину тваринами ліній внутрішніх квадратів ($r=-0,609$, $P<0,01$). Встановлено, що у щурів II групи на фіброзній стадії хронічного панкреатиту із накопиченням продуктів ліпопероксидації, ТБК-активних продуктів, знижується кількість вертикальних стійок ($r=-0,473$, $P<0,05$). Кореляційний аналіз також виявив зворотну залежність між високою концентрацією МСМ та зниженням вертикальної активності щурів II групи ($r=-0,486$, $P<0,05$) і між накопиченням МСМ-254 і МСМ-280 та зниженням кількості перетину цими тваринами ліній зовнішніх квадратів (відповідно $r=-0,637$, $P<0,01$ та $r=-0,552$, $P<0,05$). В залежності від тривалості захворювання відмічається також прямий зв'язок між зниженням у цих щурів зазирань у нірки та кількості вертикальних стійок ($r=0,503$, $P<0,05$).

Оскільки метою даної роботи було дослідження розподілу нейроспецифічних білків за умов розвитку панкреатиту, то доцільне ми вважали визначити кореляцію між рівнем даних білків у різних відділах мозку та поведінкою тварин. Перебіг хронічного панкреатиту та перерозподіл форм нейрональної молекули клітинної адгезії (НМКА) у мозку експериментальних тварин супроводжувалися істотним зниженням інтенсивності локомоторної та орієнтувально-пізнавальної активності щурів, а також проявами стресового стану (про що свідчило деяке збільшення кількості актів уринації і дефекації). Кореляційні зв'язки між рівнями фракцій НМКА та показниками поведінки щурів були різноспрямованими. Для кількостей перетину тваринами зовнішніх квадратів та рівня рНМКА у мозочку r складав $-0,638$ ($P<0,05$), а аналогічний коефіцієнт для рівня рНМКА у таламусі був позитивним ($r=0,638$; $P<0,05$). Між рівнем мНМКА у мозочку та кількістю вертикальних стійок кореляція була також позитивною ($r=0,828$, $P<0,05$). Таким чином, зміна характеристик міжклітинної адгезії в зазначених структурах мозку може бути одним із факторів, що сприяють розвитку панкреатичної енцефалопатії, і це супроводжується пригніченням моторної активності тварин та розвитком стану стресу. При фіброзній стадії

хронічного панкреатиту виявлено також пряму залежність між зниженням концентрації фГФКП, екстрагованого із мозочка, та зниженням перетину тваринами ліній зовнішніх квадратів ($r=0,941$, $P<0,01$) і між зростанням вмісту рГФКП, екстрагованого з мозочка, та збільшенням грумінгу ($r=0,812$, $P<0,05$). Відмічався різнонаправлений зв'язок між зниженням рівня фГФКП із мозочка та зростанням кількості дефекацій ($r=-0,926$, $P<0,01$).

Групою вчених (О.З. Фоменко, Г.О. Ушакова, 2009–2011 рр.) було проведено дослідження розподілу нейроспецифічних білків (НМКА, S-100b та ГФКП) в головному мозку щурів при хронічному гепатиті С [68–70, 75, 204, 205]. Порівняння результатів розподілу даних білків при хронічному панкреатиті та хронічному гепатиті С дає змогу виявити особливості розподілу цих білків при патології підшлункової залози та печінки.

Так, у роботах О.З. Фоменко та Г.О. Ушакової (2009–2011 рр.) показано, що рівень Ca^{2+} -зв'язуючого білка S-100b збільшується у мозочку, гіпокампі та таламусі при патологічному стані печінки. Аналогічні зміни рівня S-100b у досліджуваних відділах головного мозку відбувалися і при захворюванні підшлункової залози. При хронічному гепатиті С в мозочку відбувається підвищення рівня рНМКА та мНМКА, що вказує на збільшення адгезії між нейронами за даних умов. При хронічному панкреатиті відбувається різнонаправлена зміна цих форм білка: зниження мембранної та зростання розчинної фракції НМКА, що пов'язано із ферментним “зрізанням” мембранозв'язаних молекул з мембрани клітини. При патологічних змінах печінки в гіпокампі також спостерігається збільшення кількості рНМКА та мНМКА, тоді як при захворюванні підшлункової залози змін рівня даного білка в жодній з фракцій не встановлено. В таламусі і при хронічному гепатиті С, і при хронічному панкреатиті відбувається зростання кількості мНМКА, що вказує на зростання адгезивності нервових клітин та ущільнення синаптичних контактів у цьому відділі мозку як результат активації ноцицептивних шляхів за умов хронізації хвороб печінки та підшлункової залози. В гіпокампі при хронічному гепатиті С спостерігалось

зростання кількості рГФКП і фГФКП, тоді як при хронічному панкреатиті при нормальній концентрації рГФКП відбувалося зниження філаментної форми даного білка. В таламусі при захворюванні печінки рівень рГФКП значно підвищувався, а рівень фГФКП знижувався, при захворюванні підшлункової залози на тлі нормальної концентрації рГФКП також було виявлено зниження фГФКП.

Встановлені особливості розподілу НМКА і ГФКП за умов хронічного гепатиту та панкреатиту. Рівень S-100b підвищувався у відділах мозку за обох патологій.

ВИСНОВКИ

В дисертаційній роботі вирішено важливу наукову задачу – визначений характер перерозподілу адгезивних та астрогліальних білків і загальної гіалуронат-зв'язуючої активності білків міжклітинного матриксу у різних відділах мозку та підшлунковій залозі щурів за умов розвитку панкреатиту.

1. Показано, що розвиток експериментального хронічного панкреатиту призводить до порушення екзокринної функції підшлункової залози (зростання активності α -амілази та ліпази на 46%, а трипсину – на 81%), інтенсифікації ліпопероксидації (збільшення рівня ТБК-активних продуктів на 37%) на тлі зниження антиоксидантних показників. При хронічному панкреатиті розвивався фіброз підшлункової залози (зростання вмісту ОПб/зв на 39% та ГК на 47% та зниження вмісту ОПв на 30%).

2. Встановлено, що у щурів з хронічним панкреатитом у крові збільшувався вміст молекул середньої маси на 57%, зростала нуклеарна фракція МСМ-230 на 64% та фракція ароматичних хромофорів МСМ-280 на 48%, що вказує на розвиток неспецифічної ендогенної інтоксикації в організмі тварин.

3. За умов розвитку експериментальної панкреатичної енцефалопатії встановлено різнонаправлений характер співвідношення вмісту розчинної та мембранної форм адгезивних молекул у мозочку та таламусі щурів (у мозочку підвищення рівня рНМКА на 24% та зниження мНМКА на 46%, а в таламусі зниження рНМКА на 14% та підвищення мНМКА на 34%), що вказує на пластичність центральної нервової системи за даних умов.

4. За умов розвитку панкреатичної енцефалопатії встановлено зростання вмісту білка S-100b у гіпокампі та таламусі на 78% і 60% відповідно, що вказує на активацію астроглії внаслідок інтоксикації мозку. Збільшення вмісту S-100b індукує деполімеризацію проміжних філаментів цитоскелета астроцитів, що підтверджується підвищенням вмісту розчинної ГФКП у мозочку на 31%, у таламусі на 12% і зниженням її філаментної форми у мозочку на 18%, у гіпокампі на 44%, у таламусі на 42%. У

підшлунковій залозі розвиток панкреатиту супроводжувався підвищенням вмісту білка S-100b на 120% та зниженням рГФКП на 42%, фГФКП – на 19%.

5. За умов розвитку хронічного панкреатиту виявлено зростання активності гіалуронат-зв'язуючих білків мембранної фракції із підшлункової залози на 35% та підвищення вмісту гіалуронату у крові щурів під час розвитку фіброзу органу. Встановлено зниження активності мембранних гіалуронат-зв'язуючих білків у мозочку на 41%, у таламусі – на 23%, а у гіпокампі – зростання на 60%, а також зниження даної активності цитоскелетних/ екстрацелюлярних білків в гіпокампі на 31%, таламусі – на 37%. Встановлені зміни вказують на перерозподіл афінності до гіалуронату між різними відділами мозку та клітинними компартментами, що може бути сигналом для певних адаптивних процесів у мозку при хронізації панкреатиту.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Алферова В.В. Серологические маркеры эндогенной интоксикации в комплексной оценке реабилитационного потенциала больных, перенесших ишемический инсульт / В. В. Алферова, М. Г. Узбеков, Э. Ю. Мисионжник [и др.] // Социальная и клиническая психиатрия. – 2011. – Т. 21. – Вып. 3. – С. 54–57.
2. Белобородова Е.В. Активность эластазо-, коллагеназоподобных протеиназ и их ингибиторов в плазме крови при метаболизме коллагена в условиях хронического течения заболеваний печени вирусной и токсической этиологии / Е. В. Белобородова, Э. И. Белобородова, О. Е. Акбашева [и др.] // Бюллетень СО РАМН. – 2010. – Т. 30. – №2. – С. 94–100.
3. Бессалова Е.Ю. Методика исследования поведения крыс в условиях “открытого поля” / Е.Ю. Бессалова // Нейронауки: теоретичні та клінічні аспекти. – 2011. – Т.7. – №1–2. – С. 106–109.
4. Бойко В.В. Патологические аспекты развития острого панкреатита после травмы поджелудочной железы / В.В. Бойко, И.А. Криворучко, И.Л. Соханева [и др.] // Международный медицинский журнал. – 2003. – №2. – С. 81–88.
5. Буреш Я. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения / Я. Буреш, О. Бурешова, Д.П. Хьюстон. – М.: Высшая школа, 1991. – 399 с.
6. Вережкина И.В. Колориметрический метод определения SH-групп и –S-S- связей в белках при помощи 5,5'-дитиобис(2-нитробензойной) кислоты / И.В. Вережкина, А.И. Точилкин, Н.А. Попова // Современные методы в биохимии. – М.: Медицина, 1977. – С. 223–231.
7. Власов А.П. Влияние реамберина на эффект фототерапии при эндогенной интоксикации, обусловленной острым панкреатитом / А.П. Власов, Т.И. Григорьева, И.В. Потянова [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2012. – Т. 75. – №7. – С. 27–31.

8. Власов А.П. Коагуляционно-литическое состояние при остром панкреатите / А.П. Власов, С.Г. Анашкин, Е.А. Николаев [и др.] // *Фундаментальные исследования*. – 2012. – №8. – С. 289–293.
9. Власов А.П. О влиянии антиоксидантов на течение экспериментального панкреатита / А.П. Власов, В.А. Трофимов, И.В. Мишарин [и др.] // *Экспериментальная и клиническая фармакология*. – 2007. – Т. 70. – №3. – С. 25–28.
10. Волкова О.В. Основы гистологии с гистологической техники / О. В.Волкова, Ю. К. Елецкий. – М.: Медицина, 1982. – 304 с.
11. Воробьёва А.А. Острофазные белки лактоферрин и церулоплазмин при язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки / А.А. Воробьёва, А.А. Демидов // *Вестник ВолГМУ*. – 2007. – Т. 23. – №3. – С. 62–64.
12. Воронкин Д.А. Метаболические изменения в органах и крови при экспериментальном хроническом алкогольном панкреатите: автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата медицинских наук: спец. 03.01.04 “Биохимия”: Краснодар. – 2011. – 24 с.
13. Горячковський О.М. Клінічна біохімія: / О.М. Горячковський // *Довідковий посібник*. – Одеса: Астропринт, 1998. – 608 с.
14. Губергриц Н.Б. Динамика внешнесекреторной функции поджелудочной железы у больных хроническим панкреатитом в сочетании с хроническим бронхитом под влиянием терапии препаратом магния / Н.Б. Губергриц, Л.А. Ярошенко // *Гастроэнтерологія*. – 2013. – Т. 49. – №3. – С. 102–108.
15. Елеева М.А.-К. Состояние прооксидантной системы крови и уровень молекул средней массы у больных с инсультом / М.А.-К. Елеева // *Вестник новых медицинских технологий (Электронный журнал)*. – 2013. – №1. – 5 с.
16. Ельский В.Н. Роль нейроиммуноэндокринных механизмов в формировании синдрома эндогенной интоксикации при травматической болезни / В.Н. Ельский, С.В. Зяблицев, С.В. Пищулина [и др.] // *Таврический медико-биологический вестник*. – 2012. – Т. 15. – №3. – Ч.1(59). – С. 115–117.

17. Иммуноферментный анализ / Под ред. Т.Т. Нго, Г. Ленхоффа. – М.: Мир, 1988. – 446 с.
18. Кальян В.В. Поведінкові реакції самиць-щурів, матері яких підлягали дії різних рухових режимів, в умовах відкритого поля / В.В. Кальян // Вісник Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна. Серія: біологія. – 2007. – Вип. 6. – №788. – С. 134–140.
19. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике / В.С. Камышников. – 3-е изд. – М.: МЕДпресс-информ, 2009. – 896 с.
20. Карпова Л.Н. Клинико-метаболические особенности церебральной ишемии у доношенных новорожденных с анемией / Л.Н. Карпова, Т.Е. Таранушенко, А.Б. Салмина [и др.] // Педиатрия. – 2011. – Т. 90. – №1. – С. 23–29.
21. Корнева О.А. Клинико-функциональная характеристика течения хронического панкреатита у лиц пожилого возраста: автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата медицинских наук: спец. 14.00.05 “Внутренние болезни”: Ижевск. – 2006. – 25 с.
22. Кротенко Н.В. Нарушение биохимических показателей периферической крови у пациентов с рассеянным склерозом / Н.В. Кротенко, В.М. Алифирова, С.А. Иванова // Бюллетень сибирской медицины. – 2008. – Приложение 1. – С. 238–244.
23. Кротенко Н.М. Показатели окислительного стресса и эндогенной интоксикации в периферической крови у больных с экзогенно-органическими расстройствами в динамике фармакотерапии / Н.М. Кротенко, А.С. Бойко, Е.М. Епанчинцева, С.А. Иванова // Бюллетень сибирской медицины. – 2012. – №1. – С. 179–185.
24. Крилова О.О. Локалізація проапоптичних протеаз ДНКазі I та ендонуклеазі-G у підшлунковій залозі хворих на хронічний панкреатит / О.О. Крилова // Сучасна гастроентерологія. – 2011. – Т. 59. – №3. – С. 42–47.

25. Кривова Н.А. Влияние диоксида титана на некоторые функции центральной нервной системы крыс / Н.А. Кривова, М.Ю. Ходанович, Т.А. Замощина [и др.] // Вестник Томского государственного университета. Биология. – 2011. – Т. 14. – №2. – С. 96–109.
26. Криворучко И.А. Метаболизм соединительной ткани у больных при осложненном хроническом панкреатите // И.А. Криворучко, В.В. Бойко, В.И. Жуков [и др.] // Клінічна хірургія. – 2011. - №10. – С. 10–14.
27. Кулинский В.И. Изучение глутатиона и ферментов его метаболизма у больных старших возрастных групп с хронической церебральной ишемией / В.И. Кулинский, Л.С. Колесниченко, В.В. Шпрах [и др.] // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2005. – Т. 1. – №39. – С. 63–65.
28. Логинов А.С. Скрининг-метод определения общей липолитической активности крови / А. С. Логинов, К. Ю. Асташенкова // Лабораторное дело. – 1986. – №8. – С. 463–466.
29. Мазуркевич А.Й. Патолофізіологія тварин / А.Й. Мазуркевич, В.Л. Тарасевич, Д. Клугі // Підручник. – К.: Вища школа, 2000. – 352 с.
30. Майоров О.Ю. Оценка индивидуально-типологических особенностей поведения и устойчивости интактных белых крыс-самцов на основе факторной модели нормального этологического спектра показателей в тесте “открытое поле” / О.Ю. Майоров // Клиническая інформатика и Телемедицина. – 2011. – Т. 7. – Вып. 8. – С. 21–32.
31. Макарчук В.А. Гіалуронат-зв'язуюча активність білків мозку та підшлункової залози щурів за умов експериментального хронічного панкреатиту / В.А. Макарчук, О.В. Зеленюк, Г.О. Ушакова // Фізіологічний журнал. – 2014. – №3. – С. 80–88.
32. Макарчук В.А. Динаміка зміни показників системи ПОЛ-АОЗ, вуглеводного і ліпідного обміну в крові експериментальних щурів при переході гострого панкреатиту у хронічну форму / В.А. Макарчук, Г.О. Ушакова // Вісник Дніпропетровського університету. Біологія. Медицина. – 2013. – Вип. 3. – Т. 2. – С. 48–53.

33. Макарчук В.А. Морфо-біохімічні особливості підшлункової залози щурів за умов короткочасної та тривалої оклюзії панкреатичної протоки / В.А. Макарчук, Г.О. Ушакова, О.М. Бабій, Б.Ф. Шевченко, Н.Ю. Ошмянська // Світ медицини та біології. – 2014. – Т. 43, №1. – С. 127–134.
34. Макарчук В.А. Особливості розподілу S-100b та гліального фібрилярного кислого протеїну в головному мозку та підшлунковій залозі щурів за умов панкреатичної енцефалопатії / В.А. Макарчук, Г.О. Ушакова // Медична хімія. – 2014. – Т. 16. – №2(59). – С. 5–12.
35. Макарчук В.А. Содержание NCAM в головном мозге и поджелудочной железе крыс в условиях эндогенной интоксикации при экспериментальном хроническом панкреатите / В.А. Макарчук, Г.А. Ушакова // Вісник Дніпропетровського університету. Біологія, екологія. – 2014. – Т. 22, №2. – С. 169–177.
36. Макарчук В.А. Стан системи глутатіону в крові щурів та особливості морфологічних змін тканини підшлункової залози за умов експериментального гострого та хронічного панкреатиту / В.А. Макарчук, Г.О. Ушакова, О.О. Крилова // Український біохімічний журнал. – 2013. – Т. 80. – № 1. – С. 45–52.
37. Максим'юк В.В. Особливості клінічного перебігу гострого деструктивного панкреатиту в осіб із поліморфізмом R122H гена катіонного трипсिनотрипсину (PRSS1) / В.В. Максим'юк // Буковинський медичний вісник. – 2012. – Т. 16. – №1 (61). – С. 45–48.
38. Малахова М.Я. Методы биохимической регистрации эндогенной интоксикации (сообщение 1-е) / М.Я. Малахова // Эфферентная терапия. – 1995. – Т. 1. – №1. – С. 61–64.
39. Мамылина Н.В. Физиологические аспекты поведенческой активности животных в условиях эмоционального стресса / Н.В. Мамылина, В.И. Павлова // Монография – Челябинск: Изд-во ЗАО «Цицеро», 2013. – 298 с.
40. Меринова Н.И. Малоновый диальдегид и система глутатиона в крови у больных хроническим панкреатитом в зависимости от длительности

- заболевания / Н.И. Меринова, Н.М. Козлова, Л.С. Колесниченко [и др.] // Сибирский медицинский журнал. – 2013. – № 4. – С. 67–69.
41. Морозов С.В. Маркеры эндотоксикоза и система антиоксидантной защиты при экспериментальном панкреонекрозе / С.В. Морозов, В.Т. Долгих, В.Л. Полуэктов // Вестник ВолГМУ. – 2006. – №1. – 74–77.
42. Наглядная статистика в медицине // Под ред. А. Петри, К. Сэбин. М.: Гэотар-Мед, 2003. – 144 с.
43. Ничитайло М.Е. Ингибирование активированных звездчатых клеток лизиноприлом для предупреждения фиброза поджелудочной железы в модели хронического алкогольного панкреатита. / М.Е. Нечитайло, Д.А. Кравченко, Е.Б. Медвецкий [и др.] // Клінічна хірургія. – 2012. – №7. – С. 52–56.
44. Николайчик В.В. Способ определения «средних молекул» / В.В. Николайчик, В.М. Моин, В.В. Кирковский [и др.] // Лабораторное дело. – 1991. – №10. – С. 13–18.
45. Никольская В.А. Биохимический аспект рассмотрения роли молекул средней массы в организме / В.А. Никольская, Ю.Д. Данильченко, З.Н. Меметова // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского, Серия “Биология, химия”. – 2013. – Т. 26(65). – №1. – С. 139–145.
46. Овсяннікова Л.М. Біохімічні та біофізичні методи оцінки порушень окислювального гомеостазу в осіб, що зазнали радіаційного впливу внаслідок аварії на ЧАЕС / Л.М. Овсяннікова, С.М. Альохіна, О.В. Дробінська [та ін.] // Методичні рекомендації. К.: Вид. “Чорнобильінтерінформ”, 1999. – 18 с.
47. Осадчук М.А. Методы исследования оксипролина в крови и моче / М.А. Осадчук // Лабораторное дело. – 1979. – №8. – С. 456–458.
48. Осадчук М.А. Белковосвязанный оксипролин плазмы крови при остром вирусном гепатите / М.А. Осадчук, В.М. Капустин // Лабораторное дело. – 1987. – №7. – С. 16–18.

49. Паска М.З. Вміст сульфгідрильних груп та глутатіону в бугайців волинської м'ясної породи різних типів вищої нервової діяльності за дії біологічно активних речовин / М.З. Паска // Вісник Полтавської державної аграрної академії. – 2013. – № 1. – С. 100–102.
50. Пат. 90510 Україна, МПК G 01 N 33/48. Спосіб біохімічної оцінки фіброзної трансформації підшлункової залози при запаленні викликаному тривалою оклюзією панкреатичної протоки / В. А. Макаруч, Г.О. Ушакова, О.М. Бабій, Б.Ф. Шевченко, Н.Ю. Ошмянська. - № u 2014 00484; заявл. 20.01.2014; опубл. 26.05.2014, Бюл. №10. – 7 с.: іл.
51. Пентюк Н.О. Біохімічні маркери фіброзу печінки у хворих на хронічні гепатити та їхня діагностична цінність / Н.О. Пентюк // Сучасна гастроентерологія. – 2011. – Т. 57. – №1. – С. 58–63.
52. Переслегина И.А. Активность антиоксидантных ферментов слюны здоровых детей / И.А. Переслегина // Лабораторное дело. –1989. – №11. – С. 20–23.
53. Погосян В.А. Исследование поведения крыс в условиях гипокинезии и под влиянием пирасетама / В.А. Погосян // Медицинская наука Армении НАН РА. – 2010. – № 4. – С. 50–55.
54. Показники здоров'я населення та використання ресурсів охорони здоров'я в Україні за 2013 рік: довідники / Центр медичної статистики МОЗ України. – Київ, 2014.
55. Разыграев А.В. Активность глутатионпероксидазы в ткани шишковидной железы крыс и ее изменение при старении / А.В. Разыграев // Успехи гастроэнтерологии. – 2010. – Т. 23. – №3. – С. 392–395.
56. Сапожников А.Г., Доросевич А.Е. Гистологическая и микроскопическая техника / А.Г.Сапожников, А.Е. Доросевич // Руководство. – Смоленск: САУ, 2000. – 476 с.
57. Сіренко О.Ю. Панкреатичні зірчасті клітини як морфологічна основа розвитку фіброзу підшлункової залози / О.Ю.Сіренко // Морфологія. – 2010. – Т. 4. – №1. – С. 5–12.

58. Степанов Ю.М. Болезни поджелудочной железы как одна из ведущих проблем гастроэнтерологии и абдоминальной хирургии / Ю.М. Степанов, Н.Г. Гравировская, И.Ю. Скирда, О.П. Петишко // Гастроэнтерология. – 2014. – Т.49. – №3. – С. 7–14.
59. Степовая Е.А. Роль тиолдисульфидной системы в механизмах изменений функциональных свойств нейтрофилов при окислительном стрессе / Е.А. Степовая, Г.В. Петина, Т.В. Жаворонок [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2010. – №8. – С. 161–165.
60. Степовая Е.А. Участие тиолдисульфидной системы в регуляции окислительной модификации белков в нейтрофилах при окислительном стрессе / Е.А. Степовая, Т.В. Жаворонок, Г.В. Петина [и др.] // Бюллетень СО РАМН. – 2010. – Т. 30. – №5. – С. 64–69.
61. Сухорукова Е.Г. Структурная организация астроцитов неокортекса крысы и человека, содержащих глиальный фибриллярный кислый белок: автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата медицинских наук: спец. 03.03.04 “Клеточная биология, цитология, гистология”: С.-Петербург. – 2011. – 22 с.
62. Терещенко О.А. Синдром эндогенной интоксикации и системной воспалительной реакции при желчном перитоните, осложненном абдоминальным сепсисом / О.А. Терещенко, А.А. Боташев, Ю.В. Помещик [и др.] // Вестник экспериментальной и клинической хирургии. – 2012. – Т. 5. – №4. – С. 722–726.
63. Тимошенко О.П. Ефективність комплексної діагностики панкреатиту у собак, підтверджена морфологічними дослідженнями / О.П. Тимошенко, Ю.М. Бусел // Вісник Полтавської державної аграрної академії. – 2009. – № 1. – С. 87–93.
64. Тропина И.В. Эндогенная интоксикация у больных с постнекротическими кистами поджелудочной железы / И.В. Тропина, С.В. Морозов, В.Т. Долгих [и др.] // Вестник ВолГМУ. – 2010. – Т. 33. – №1. – С. 97–98.

65. Туманський В.О. Імуногістохімічні особливості експресії матриксної металопротеїнази 9 та її тканинного інгібітора TIMP-1 при хронічному фіброзно-індуративному панкреатиті / В.О. Туманський, І.С. Коваленко // Патологія. – 2012. – Т. 24. – №1. – С. 74–76.
66. Узбеков М.Г. К вопросу о патохимических изменениях системы метаболического гомеостаза в остром периоде ишемического инсульта / М.Г. Узбеков, В.В. Алферова, А.Б. Гехт, Э.Ю. Мисионжник // Российский медико-биологический вестник им. акад. И.П. Павлова. – 2010. – №3. – С. 72–76.
67. Фирсова В.Г. Острый панкреатит: современные аспекты патогенеза и классификации / В.Г. Фирсова, В.В. Паршиков, В.П. Градусов // Современные технологии в медицине. – 2011 – №2. – С. 127–134.
68. Фоменко О.З. Вплив неалкогольного стеатогепатиту та хронічного гепатиту С на розподіл нервово специфічних білків у мозку щурів / О.З. Фоменко, Г.О. Ушакова // Нейронауки: теоретичні та клінічні аспекти. – 2009. – Т. 5, №1-2. – С. 24–28.
69. Фоменко О.З. Изменение поведенческих реакций крыс при развитии экспериментального хронического гепатита / О.З. Фоменко, Г.А. Ушакова, С. Г. Пиержиновський // Материалы Международной научно-практической конференции “Теоретические и прикладные проблемы современной науки и образования”, Курск, Россия. – 2011.– Ч. 1. – С. 222–228.
70. Фоменко О.З. Протеїни астроглії у мозку щурів в умовах експериментального хронічного гепатиту та дії 2-оксоглутарата / О.З. Фоменко, Г.О. Ушакова, С.Г. Пиержиновський // Український біохімічний журнал. – 2011. – Т. 83, № 1. – С. 69–75.
71. Христич Т.М. До питання про лікування оксидативного стресу при хронічному обструктивному захворюванні легенів у поєднанні з хронічним панкреатитом / Т.М. Христич, Я.М. Телекі // Сучасна гастроентерологія. – 2006. – Т. 30. – №4. – С. 80–84.

72. Христич Т.М. Возможна роль функціонального стану підшлункової залози у розвитку та прогресуванні метаболічного синдрому/ Т.М. Христич, Т.Б. Кендзерська // Мистецтво лікування. – 2006. - №4. – С. 53–59.
73. Цимбаліста О.Л. Корекція порушень прооксидантно-антиоксидантної системи у дітей, хворих на ускладнену позалікарняну пневмонію / О.Л. Цимбаліста, Г.М. Ерстенюк, О.І. Гаврилюк // Перинатология и педиатрия. – 2011. – Т. 48. – №.4. – С. 73–75.
74. Чайковская И.В. Синдром эндогенной интоксикации и его роль при патологических процессах / Чайковская И.В., Яворская Л.В. // Питання експериментальної та клінічної медицини. Збірник статей. – 2012. – Вип. 16. – Т. 1. – С. 144–152.
75. Шевченко О.П. Зміни активності матриксних металопротеїназ та глікозаміногліканів за умов індукованого хронічного гепатиту у щурів / О.П. Шевченко, О.З. Фоменко, А.І. Шевцова, Г.О. Ушакова // Одеський медичний журнал. – 2009. – №6. – С. 31–33.
76. Шимунов Г.Я. Особенности изменения метаболических процессов в крови, печени и миокарде на разных стадиях острого экспериментального панкреатита и их коррекция: автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата медицинских наук: спец. 03.00.04 “Биохимия”: Ростов-на-Дону. – 2006. – 18 с.
77. Шкловский В.М. Значение синдрома эндогенной интоксикации для восстановления нарушенных функций после ишемического инсульта / В.М. Шкловский, В.В. Алферова, Э.Ю. Мисионжник [и др.] // Неврология. – 2011. – Т. 63. – №4. – С. 27–30.
78. Adrych K. Coordinated increase in serum platelet-derived growth factor-BB and transforming growth factor- β 1 in patients with chronic pancreatitis / Adrych K., Smoczynski M., Stojek M. [et al.] // Pancreatology. – 2011. – V. 11. – No. 4. – P. 434–440.

79. Aghdassi A.A. Animal models for investigating chronic pancreatitis / A.A. Aghdassi, J. Mayerle, S. Christochowitz [et al.] // *Fibrogenesis & Tissue Repair*. – 2011. – V. 4. – No. 26. – P. 1–16.
80. Apte M. New insights into alcoholic pancreatitis and pancreatic cancer / M. Apte, R. Pirola, and J. Wilson // *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. – 2009. – V. 24. – Suppl. 3. – P. 51–56.
81. Apte M.V. Pancreatic stellate cells: a starring role in normal and diseased pancreas / M.V. Apte, R.C. Pirola, and J.S. Wilson // *Frontiers in Physiology*. – 2012. – V. 3. – Article 344. – P. 1–14.
82. Arana-Guajardo A.C. Wernicke Encephalopathy Presenting in a Patient with Severe Acute Pancreatitis / A.C. Arana-Guajardo, C.R. Cámara-Lemarroy, E. J. Rendón-Ramírez [et al.] // *JOP. Journal of the Pancreas*. – 2012. V. 13. – No. 1. – P. 104–107.
83. Awla D. Rho-kinase signalling regulates trypsinogen activation and tissue damage in severe acute pancreatitis / D. Awla, H. Hartman, A. Abdulla [et al] // *British Journal of Pharmacology*. – 2011. – V.162. – No. 3. – P. 648–658.
84. Bai H. The effect of sulindac, a non-steroidal anti-inflammatory drug, attenuates inflammation and fibrosis in a mouse model of chronic pancreatitis / H. Bai, X. Chen, L. Zhang, and X. Dou // *BMC Gastroenterology*. – 2012. – V. 12. – No. 115. – 11 p.
85. Ballatori N. Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases / N. Ballatori, S.M. Krance, S. Notenboom [et al.] // *Biological Chemistry*. – 2009. – V. 390. – No. 3. – P. 191–214.
86. Behrman S.W. Pathophysiology of Chronic Pancreatitis / S.W. Behrman and E.S. Fowler // *Surg. Clin. N. Am.* – 2007. – V. 87. – P. 1309–1324.
87. Berndt C. Thiol-based mechanisms of the thioredoxin and glutaredoxin systems: implications for diseases in the cardiovascular system / C. Berndt, C.H. Lillig, and A. Holmgren // *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*. – 2007. – V. 292. – No. 3. – P. 1227–1236.

88. Bhanot U.K. Mechanisms of parenchymal injury and signaling pathways in ectatic ducts of chronic pancreatitis: implications for pancreatic carcinogenesis / U.K Bhanot, and P. Moller // *Laboratory Investigation*. – 2009. – V. 89. – No. 5. – 489–497.
89. Bisaz R. Causal Evidence for the Involvement of the Neural Cell Adhesion Molecule, NCAM, in Chronic Stress-Induced Cognitive Impairments / R. Bisaz, M. Schachner, and C. Sandi // *Hippocampus*. – 2011. – V. 21. – P. 56–71.
90. Bisaz R. Learning under stress: A role for the neural cell adhesion molecule NCAM / R. Bisaz, L. Conboy, and C. Sandi // *Neurobiology of Learning and Memory*. – 2009. – V. 91. – No. 4. – P. 333–342.
91. Bradford M. Rapid and sensitive methods for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M. Bradford // *Anal. Biochem*. – 1976. – V. 72. – P. 248–254.
92. Braganza J.M. Chronic pancreatitis / J.M Braganza, S.H. Lee, R.F McCloy, and M.J. McMahon // *Lancet*. – 2011. – V. 377 (9772). – P. 1184–1197.
93. Brennaman L. H. NCAM in Neuropsychiatric and Neurodegenerative Disorders / L. H. Brennaman and P. F. Maness // *Structure and Function of the Neural Cell Adhesion Molecule NCAM*. – 2010. – V. 663. – P. 299–317.
94. Campodonico P.B. The Neural Cell Adhesion Molecule Is Involved in the Metastatic Capacity in a Murine Model of Lung Cancer / P.B. Campodonico, E.D. Bal de Kier Joffe, A. J. Urtreger [et al.] // *Molecular carcinogenesis*. – 2010. – V. 49. – P. 386–397.
95. Cargill R. Astrocytes in aged nonhuman primate brain gray matter synthesize excess hyaluronan / R. Cargilla, S.G. Kohama, J. Struve [et al.] // *Neurobiology of Aging*. – 2012. – V. 33. No.4 – P. 830.e13–830.e24.
96. Catala A. Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions / A. Catala // *Chemistry and Physics of Lipids*. – 2009. – V. 157. – P. 1–11.

97. Chauhan S.S. Antioxidants as Adjunctive Therapy for Pain in Chronic Pancreatitis / S.S. Chauhan, D.S. Pannu, C.E. Forsmark // *Practical Gastroenterology*. – 2012. – Series 103. – P. 42–49.
98. Chen J.-M. Chronic Pancreatitis: Genetics and Pathogenesis / J.-M. Chen and C. Ferec // *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* – 2009. – V. 10. – P. 63–87.
99. Choi K.Y. Hyaluronic acid-based nanocarriers for intracellular targeting: Interfacial interactions with proteins in cancer / K.Y. Choi, G. Saravanakumar, J.H. Park, and Kinam Park // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2012. – V. 99. – P. 82–94.
100. Col C. Oxidative stress and lipid peroxidation products: effect of pinealectomy or exogenous melatonin injections on biomarkers of tissue damage during acute pancreatitis / C. Col, K. Dinler, O. Hasdemir [et al.] // *Hepatobiliary Pancreat Dis. Int.* – 2010. – V. 9. – No. 1. – P. – 78–82.
101. Conwell D.L. Pancreatitis Incidence and Pathophysiology (Clinical Roundtable Monograph) / D.L. Conwell // *Gastroenterology & Hepatology*. – 2010. – V. 6. – No 2. – Supplement 5. – P. 4–5.
102. Criddle D.N. Calcium signalling and pancreatic cell death: apoptosis or necrosis? / D.N. Criddle, J.V. Gerasimenko, H.K. Baumgartner [et al.] // *Cell Death and Differentiation*. – 2007. – V. 14. No. 7. – P. 1285–1294.
103. Cyriac J. Stellate Cell Activation in Tropical Calcific Pancreatitis Compared to Alcoholic Pancreatitis, Adenocarcinoma of Pancreas and Normal Pancreas / J. Cyriac, P. Mahadevan, P. Augustine [et al.] // *JOP*. – 2012. – V.13. – No. 4. – P. 376–386.
104. Dagdan E. Functional Assessment of a Promoter Polymorphism in S100B, a Putative Risk Variant for Bipolar Disorder / E. Dagdan, D.W. Morris, M. Campbell [et al.] // *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*. – 2011. – V. 156. – Issue 6. – P. 691–699.
105. Dawra R. Intra-acinar Trypsinogen Activation Mediates Early Stages of Pancreatic Injury but Not Inflammation in Mice With Acute Pancreatitis / R.

- Dawra, R.P. Sah, V. Dudeja [et al.] // *Gastroenterology*. – 2011. – V. 141. P. 2210–2217.
106. De Dios I. Inflammatory role of the acinar cells during acute pancreatitis / I. De Dios // *World J. Gastrointest Pharmacol. Ther.* – 2010. – V. 1. – No. 1. – P. 15–20.
107. Ding Z. Experimental pancreatitis results in increased blood-brain barrier permeability in rats: A potential role of MCP-1 / Z. Ding, J. Liu, R. Lin, and X.H. Hou // *Journal of Digestive Diseases*. – 2012. – V. 13. – P. 179–185.
108. Divoux A. Architecture and the extracellular matrix: the still unappreciated components of the adipose tissue / A. Divoux and K. Clement // *Obesity Reviews*. – 2011. – V. 12. – No. 5. – P. 494–503.
109. Dolzhenko M. I. A novel methods for evaluation of carbohydrate-binding activity: enzyme-linked carbohydrate-binding assay (ELCBA) / M. I. Dolzhenko, E. A. Lepekhin, and V. A. Berezin // *Biochem. Mol. Biol. Intern.* – 1994. - V. 34. – No. 2. – P. 261–271.
110. Donato R. S100B Protein in the Nervous System and Cardiovascular Apparatus in Normal and Pathological Conditions / R. Donato and C.W. Heizmann // *Cardiovascular Psychiatry and Neurology*. – 2010. – V. 2010. – Article ID 929712. – 2 p.
111. Ďuračková Z. Some Current Insights into Oxidative Stress / Z. Ďuračková // *Physiological Research*. – 2010. – V. 59. – P. 459–469.
112. Duterme C. Two Novel Functions of Hyaluronidase-2 (Hyal2) Are Formation of the Glycocalyx and Control of CD44-ERM Interactions / C. Duterme, J. Mertens-Strijthagen, M. Tammi, and B. Flamion // *The journal of biological chemistry*. – 2009. – V. 284. – No. 48. – P. 33495–33508.
113. El-Shabrawi M.H. Predictive accuracy of serum hyaluronic acid as a non-invasive marker of fibrosis in a cohort of multi-transfused Egyptian children with b-thalassaemia major / M.H. El-Shabrawi, M.Y. Zein El Abedin, N. Omar [et al.] // *Arab Journal of Gastroenterology*. – 2012. – V. 13. – No. 2. – P. 45–48.

114. Ennen C.S. Glial fibrillary acidic protein as a biomarker for neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy treated with whole-body cooling / C.S. Ennen, T.A. Huisman, W.J. Savage [et al.] // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 2011. – V. 205. – No. 3. – P. 251.e1–7.
115. Ermolov A. Endogenous intoxication as the leading cause of acute gastroduodenal haemorrhages in burn patients / A. Ermolov, S. Smirnov, and T. Spiridonova // *Annals Burns Fire Disasters.* – 2001. – V. 14. – No. 3. – P. 119–126.
116. Etemad B. Chronic Pancreatitis: Diagnosis, Classification, and New Genetic Developments / B. Etemad and D.C. Whitcomb // *Gastroenterology.* – 2001. – V. 120. – No. 3. – P. 682–707.
117. Fitzner B. Senescence determines the fate of activated rat pancreatic stellate cells / B. Fitzner, S. Muller, M. Walther [et al.] // *J. Cell. Mol. Med.* – 2012. – V. 16. – No. 11. – P. 2620–2630.
118. Fogel A.I. Lateral assembly of the immunoglobulin protein SynCAM 1 controls its adhesive function and instructs synapse formation / A.I. Fogel, M. Stagi, K. P. Arce, and T. Biederer // *The EMBO Journal.* – 2011. – V. 30. – No. 23. – P. 4728–4738.
119. French J.J. Chronic pancreatitis / J.J. French and R.M. Charnley // *Surgery.* – 2007. – V. 25. – Issue. 2. – 81 – 86.
120. Frischknecht R. The Brain's Extracellular Matrix and Its Role in Synaptic Plasticity / R. Frischknecht and E.D. Gundelfinger // *Advances in Experimental Medicine and Biology.* – 2012. – V. 970. – P. 153–171.
121. George J. Biochemical Abnormalities during the Progression of Hepatic Fibrosis Induced by Dimethylnitrosamine / J. George and G. Chandrakasan // *Clinical Biochemistry.* – 2000. – V. 33. – No. 7. – P. 563–570.
122. Gold E.W. The quantitative spectrophotometric estimation of total sulfated glycosaminoglycan levels / E.W. Gold // *Biochemica et Biophysica Acta.* – 1981. – V. 673. – No. 4. – P. 408–415.

123. Goulden M.R. The pain of chronic pancreatitis: a persistent clinical challenge / Michael R Goulden // *British Journal of Pain*. - 2013. - V. 7. - No. 1. - P. 8–22.
124. Grigsby B. Antioxidants and Chronic Pancreatitis: Theory of Oxidative Stress and Trials of Antioxidant Therapy / B. Grigsby, H. Rodriguez-Rilo, and K. Khan // *Dig. Dis. Sci.* - 2012. - V. 57. - P. 835–841.
125. Hagiyaama M. Expression of a Soluble Isoform of Cell Adhesion Molecule 1 in the Brain and Its Involvement in Directional Neurite Outgrowth / M. Hagiyaama, N. Ichiyanagi, K.B. Kimura [et al.] // *The American Journal of Pathology* - 2009. - V. 174. - No. 6. - P. 2278–2289.
126. Herrera F. Synergistic Effect of Retinoic Acid and Cytokines on the Regulation of Glial Fibrillary Acidic Protein Expression / F. Herrera, Q. Chen, and D. Schubert // *The Journal of Biological Chemistry*. - 2010. - V. 285. - No. 50. - P. 38915–38922.
127. Hinkle C. L. Metalloprotease-Induced Ectodomain Shedding of Neural Cell Adhesion Molecule (NCAM) / C.L. Hinkle, S. Diestel, J. Lieberman, and P.F. Maness // *Journal of Neurobiology*. - 2006. - V. 66. - No. 12. - P. 1378–1395.
128. Hirota M. The role of trypsin, trypsin inhibitor, and trypsin receptor in the onset and aggravation of pancreatitis / M. Hirota, M. Ohmuraya, and H. Baba // *J. Gastroenterol.* - 2006. - V. 41. - No. 9. - P. 832–836.
129. Hohoff C. Risk Variants in the S100B Gene Predict Elevated S100B Serum Concentrations in Healthy Individuals / C. Hohoff, G. Ponath, C.M. Freitag [et al.] // *American Journal of Medical Genetics, Part B*. - 2009. - V. 153B. - P. 291–297.
130. Hornik A. Central and extrapontine myelinolysis affecting the brain and spinal cord. An unusual presentation of pancreatic encephalopathy / A. Hornik, F.J.R. Porcel, C. Agha [et al.] // *Frontiers in Neurology*. - 2012. - V. 3. - Article 135. - 5 p.
131. Hu W. Simultaneous characterization of pancreatic stellate cells and other pancreatic components within three-dimensional tissue environment during chronic

pancreatitis / W. Hu and L. Fu // *Journal of Biomedical Optics*. – 2013. – V. 18. – No. 5. – 9 p.

132. Huang H. Activation of Nuclear Factor- κ B in Acinar Cells Increases the Severity of Pancreatitis in Mice / H. Huang, Y. Liu, J. Daniluk [et al.] // *Gastroenterology*. – 2013. – V. 144. – No. 1. – P. 202–210.

133. Hübschmann M.V. The Role of ATP in the Regulation of NCAM Function / M.V. Hübschmann and G. Skladchikova // *Structure and Function of the Neural Cell Adhesion Molecule NCAN*. – 2010. – V. 663. – P. 81–91.

134. Hull R.L. Hyaluronan and Hyaluronan Binding Proteins Are Normal Components of Mouse Pancreatic Islets and Are Differentially Expressed by Islet Endocrine Cell Types / R.L. Hull, P.Y. Johnson, K.R. Braun [et al.] // *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. – 2012. – V. 60. – No. 10. – P. 749–760.

135. Jackson D.G. Immunological functions of hyaluronan and its receptors in the lymphatics / D.G. Jackson // *Immunological Reviews*. – 2009. – V. 230. – No. 1 – P. 216–231.

136. Jaster R. Molecular regulation of pancreatic stellate cell function / R. Jaster // *Molecular Cancer*. – 2004. – V. 3. – No. 26. – 8 p.

137. Ji B. Intracellular Trypsin Induces Pancreatic Acinar Cell Death but Not NF- κ B Activation / B. Ji, S. Gaiser, X. Chen [et al.] // *The journal of biological chemistry*. – 2009. – V. 284. – No. 26. – P. 17488–17498.

138. Jiang D. Hyaluronan as an immune regulator in human diseases / D. Jiang, J. Liang, and P.W. Noble // *Physiol. Rev.* – 2011. – V. 91. – No. 1. – P. 221–264.

139. Jiang D. Regulation of Non-Infectious Lung Injury, Inflammation, and Repair by the Extracellular Matrix Glycosaminoglycan Hyaluronan / D. Jiang, J. Liang, and P.W. Noble // *Anatomical Record (Hoboken)*. – 2010. – V. 293. – No. 6. – P. 982–985.

140. Jones D.P. Radical-free biology of oxidative stress / D.P. Jones // *American Journal of Physiology - Cell Physiology*. – 2008. – V. 295. – No. 4. – P. 849–868.

141. Johnsson C. Role of hyaluronan in acute pancreatitis / C. Johnsson, R. Hällgren, and G. Tufveson // *Surgery*. – 2000. – V. 127. – Issue 6. – P. 650–658.

142. Jupp J. The epidemiology and socioeconomic impact of chronic pancreatitis / J. Jupp, D. Fine, and C.D. Johnson // *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. – 2010. – V. 24. – P. 219–231.
143. Kiriya S. New diagnostic criteria of acute pancreatitis / S. Kiriya, T. Gabata, T. Takada [et al.] // *J. Hepatobiliary Pancreat Sci*. – 2010. – V. – No. 17. – P. 24–36.
144. Kleene R. Functional Consequences of the Interactions among the Neural Cell Adhesion Molecule NCAM, the Receptor Tyrosine Kinase TrkB, and the Inwardly Rectifying K⁺ Channel KIR3.3 / R. Kleene, C. Cassens, R. Bähring [et al.] // *The journal of biological chemistry*. – 2010. – V. 285. – No. 37. – P. 28968–28979.
145. Kleene R. NCAM-Induced Neurite Outgrowth Depends on Binding of Calmodulin to NCAM and on Nuclear Import of NCAM and fak Fragments / R. Kleene, M. Mzoughi, G. Joshi [et al.] // *The Journal of Neuroscience*. – 2010. – V. 30. – No. 32. – P. 10784–10798.
146. Kliment C.R. A novel method for accurate collagen and biochemical assessment of pulmonary tissue utilizing one animal / C.R. Kliment, J.M. Englert, L.P. Crum, and T.D. Oury // *International Journal of Clinical & Experimental Pathology*. – 2011. – V. 4. – No. 4. – P. 349–355.
147. Kloppel G. Fibrosis of the pancreas: the initial tissue damage and the resulting pattern / G. Kloppel, S. Detlefsen, and B. Feyerabend // *Virchows Arch*. – 2004. – V. 445. – P. 1–8.
148. Kumar R. Role of Macrophages and Substance P in the Pathogenesis of Acute Pancreatitis / R. Kumar and M. Bhatia // *Immuno-Gastroenterology*. – 2012. – V. 1. – No. 2. – P. 90–99.
149. Lerch M.M. Models of Acute and Chronic Pancreatitis / M.M. Lerch and F.S. Gorelick // *Gastroenterology*. – 2013. – V. 144. – Issue 6. – P. 1180–1193.
150. Lesgards J.-F. Effect of reactive oxygen and carbonyl species on crucial cellular antioxidant enzymes / J.-F. Lesgards, C. Gauthier, J. Iovanna [et al.] // *Chemico-Biological Interactions*. – 2011. – V. 190. – No. 1. – P. 28–34.

151. Leung P.S. Role of Oxidative Stress in Pancreatic Inflammation / P.S. Leung and Y.C. Chan // *Antioxidants & Redox Signaling*. – 2009. – V. 11. – No 1. – P. 135–166.
152. Lewis S.L. Encephalopathy // S.L. Lewis // *Emergency Neurology*. Edited by K.L. Roos. Springer New York Dordrecht Heidelberg London: Springer Science+Business Media, LLC 2012. – 2012. – P. 283–294.
153. Lillig C.H. Glutaredoxin systems / C.H. Lillig, C. Berndt, and A. Holmgren // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2008. – V. 1780. – No. 11. – P. 1304–1317.
154. Lillig C.H. Thioredoxin and Related Molecules–From Biology to Health and Disease / C.H. Lillig and A. Holmgren // *Antioxidants & Redox Signaling*. – 2007. – V. 9. – No 1. – P. 25–47.
155. Loury O.H. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O.H. Loury, N.J. Rosenbrough, R. L. Farr, R.J. Randall // *J. Biol. Chem.* – 1951. – V. 193. – No. 2. – P. 265–275.
156. Lu X.L. Ascorbic acid alleviates pancreatic damage induced by dibutyltin dichloride in rats. / X.L. Lu, Y.H. Song, Y.B. Fu [et al.] // *Yonsei Med. J.* – 2007. – V. 48 – No. 6. – P. 1028–1034.
157. Lucas M. Proteomics Characterization of the Secretome from Rat Pancreatic Stellate Cells with ATP-Binding Cassette Transporters (ABCG2) and NCAM Phenotype / M. Lucas, E. Mato, S. Barceló-Batllori [et al.] // *ISRN Cell Biology*. – 2013. – V. 2013. – Article ID 828060. – 18 p.
158. Madro A. Can we expect progress in the treatment of fibrosis in the course of chronic pancreatitis? / A. Madro, M. Slomka, and K. Celinski // *Advances in Medical Sciences*. – 2011. – V. 56. – No. 2. – P. 132–137.
159. Makarchouk V. A. Redistribution of Cell Adhesion Proteins in the Brain and the Peculiarities of Behavioral Phenomena in Rats with Chronic Pancreatitis / V. A. Makarchouk, G. O. Ushakova // *Neurophysiology*. – 2014. – Vol. 46, No. 2. – P. 177–179.
160. Mao X. Expression and Localization of Neural Cell Adhesion Molecule and Polysialic Acid during Chick Corneal Development / X. Mao, T. Schwend, and G.

W. Conrad // *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. – 2012. – V. 53. – No.3. – P. 1234–1243.

161. Masamune A. Roles of Pancreatic Stellate Cells in Pancreatic Inflammation and Fibrosis / A. Masamune, T. Watanabe, K. Kikuta, and T. Shimosegawa // *Clinical gastroenterology and hepatology*. – 2009. – V. 7. – Suppl. 11. – P.48–54.

162. Martinian L. Expression patterns of glial fibrillary acidic protein (GFAP)-delta in epilepsy-associated lesional pathologies / L. Martinian, K. Boer, J. Middeldorp [et al.] // *Neuropathology and Applied Neurobiology*. – 2009. – V. 35. – Issue 4. – P. 394–405.

163. Michalski C.W. Mononuclear cells modulate the activity of pancreatic stellate cells which in turn promote fibrosis and inflammation in chronic pancreatitis / C.W. Michalski, A. Gorbachevski, M. Erkan [et al.] // *Journal of Translational Medicine*. – 2007. – V. 5. – No. 63. – P. 11 p.

164. Miki Y. Morphologic, flow cytometric, functional, and molecular analyses of S100B positive lymphocytes, unique cytotoxic lymphocytes containing S100B protein / Y. Miki, Y. Gion, Y. Mukae [et al.] // *European Journal of Haematology*. – 2012. – V. 90. – P. 99–110.

165. Mossner J. New Advances in Cell Physiology and Pathophysiology of the Exocrine Pancreas / J. Mossner // *Dig. Dis*. – 2010. – V. 28. – No. 6. – P. 722–728

166. Negre-Salvayre A. Pathological aspects of lipid peroxidation / A. Negre-Salvayre, N. Auge, V. Ayala [et al.] // *Free Radical Research*. – 2010. – V. 44. – No. 10. – P. 1125–1171.

167. Nielsen J. Role of Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor (GDNF)–Neural Cell Adhesion Molecule (NCAM) Interactions in Induction of Neurite Outgrowth and Identification of a Binding Site for NCAM in the Heel Region of GDNF / J. Nielsen, K. Gotfryd, S. Li [et al.] // *The Journal of Neuroscience*. – 2009. – V. 29. – No. 36. – P. 11360–11376.

168. Oades R.D. Attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD) and glial integrity: S100B, cytokines and kynurenine metabolism - effects of medication /

- R.D. Oades, M.R. Dauvermann, B.G. Schimmelmann [et al.] // Behavioral and Brain Functions. – 2010. – V. 6. – No. 29. – 14 p.
169. Omary M.B. The pancreatic stellate cell: a star on the rise in pancreatic diseases / M. B. Omary, A. Lugea, A.W. Lowe, and S.J. Pandol // The Journal of Clinical Investigation. – 2007. – V. 117. – No 1. – P. 50–59.
170. Omiecinski C.J. Metabolism, Disposition, and Regulation by Receptors: From Biochemical Phenomenon to Predictors of Major Toxicities / C.J. Omiecinski, J.P. Vanden Heuvel, G.H. Perdew, and J.M. Peters // Toxicological sciences. – 2011. – V. 120. – P. 49–75.
171. Otsuki M. Animal Models of Chronic Pancreatitis / M. Otsuki, M. Yamamoto, and T. Yamaguchi // Gastroenterology Research and Practice. – 2010. – V. 2010. – Article ID 403295. – 8 p.
172. Page B.J. An Immunocytochemical Profile of the Endocrine Pancreas Using an Occlusive Duct Ligation Model / B.J. Page, D.F. du Toit, C.J. Muller [et al.] // Journal of the Pancreas. – 2000. – V. 1. – No. 4. – P. 191–203.
173. Paju A. Biochemistry and clinical role of trypsinogens and pancreatic secretory trypsin inhibitor / A. Paju and U.-H. Stenman // Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences. – 2006. – V. 43. – No. 2. – P. 103–142.
174. Pavlidis E.T. The effect of bevacizumab on colon anastomotic healing in rats / E.T. Pavlidis, K.D. Balla, N.G. Symeonidis [et al.] // Int. J. Colorectal Dis. – 2010. – V. 25. – No. 12. – P. 1465–1473.
175. Pezzilli R. Pancreatic Stellate Cells and Chronic Alcoholic Pancreatitis / R. Pezzilli // JOP. J. Pancreas (Online). – 2007. – V. 8. – No. 2. – P. 254–257.
176. Pezzilli R. Recent Advances in Immune System Activation at Onset of Acute Pancreatitis / R. Pezzilli // Immuno-Gastroenterology. – 2012. – V. 1. – Issue 1. – P. 18–22.
177. Phillips P. Pancreatic stellate cells and fibrosis (Pancreatic Cancer and Tumor Microenvironment) / P. Phillips, Editors: P.J. Grippo and H.G. Munshi // Kerala, India: Transworld Research Network, 2012. – P. 29–53.

178. Phillips P.A. Pancreatic stellate cells produce acetylcholine and may play a role in pancreatic exocrine secretion / P.A. Phillips, L. Yang, A. Shulkes [et al.] // PNAS. – 2010. – V. 107. – No. 40. – P. 17397–17402.
179. Ramanathan R.S. Acute necrotizing pancreatitis leading to pancreatic encephalopathy in a patient undergoing long-term continuous ambulatory peritoneal dialysis / R.S. Ramanathan and T. Ahluwalia // Journal of Academy of Medical Sciences. – 2012. – V. 2. – Issue 2. – P. 85–87.
180. Raraty M. G. T. Mechanisms of acinar cell injury in acute pancreatitis / M. G. T. Raraty, J. A. Murphy, E. Mcloughlin [et al.] // Scandinavian Journal of Surgery. – 2005. – V. 94. – P. 89–96.
181. Restrepo A. Epigenetic regulation of glial fibrillary acidic protein by DNA methylation in human malignant gliomas / A. Restrepo, C.A. Smith, S. Agnihotri [et al.] // Neuro-Oncology. – 2011. – V. 13. – No. 1. – P. 42–50.
182. Ruggieri R.M. Pancreatic encephalopathy: a 7-year follow-up case report and review of the literature / R.M. Ruggieri, I. Lupo, and F. Piccoli // Neurol. Sci. – 2002. – V. 23. – P. 203–205.
183. Saba. Ellagic acid attenuates bleomycin and cyclophosphamide-induced pulmonary toxicity in Wistar rats / Saba, S. Khana, S. Parvez [et al.] // Food and Chemical Toxicology. – 2013. – V. 58. – P. 210–219.
184. Sadowitz B. The role of hyaluronic acid in atherosclerosis and intimal hyperplasia / B. Sadowitz, K. Seymour, V. Gahtan, and K.G. Maier // Journal of Surgical Research. – 2012. – V. 173. – No. 2. – P. 63–72.
185. Sainio A. Extracellular Matrix Macromolecules in Tumour Microenvironment with Special Reference to Desmoplastic Reaction and the Role of Matrix Proteoglycans and Hyaluronan / A. Sainio and H. Jarvelainen // Journal of Carcinogenesis & Mutagenesis. – 2013. – S13: 002. – 7 p.
186. Savchenko V. L. Microglia and astrocytes in the adult rat brain: comparative immunocytochemical analysis demonstrates the efficacy of lipocortin 1 immunoreactivity / V. L. Savchenko, J. A. Mckanna, I. R. Nikonenko, and G. G. Skibo // Neuroscience. – 2000. – V. 96. – No. 1. – P. 195–203.

187. Secher T. Soluble NCAM / T. Secher // Structure and Function of the Neural Cell Adhesion Molecule NCAM. – 2010. – V. 663. – P. 227–242.
188. Sendler M. Tumour necrosis factor a secretion induces protease activation and acinar cell necrosis in acute experimental pancreatitis in mice / M. Sendler, A. Dummer, F.U Weiss [et al.] // Gut. – 2013. – V. 62. – P.430–439.
189. Sleeman J. Regulated clustering of variant CD44 proteins increases their hyaluronate binding capacity / J. Sleeman, W. Rudy, M. Hofmann [et al.] // J. Cell. Biol. – 1996. – V. 135. – No. 4. – P.1139–1150.
190. Sofroniew M.V. Astrocytes: biology and pathology / M.V. Sofroniew and H.V. Vinters // Acta Neuropathol. – 2010. – V. 119. – No. 1. – P. 7–35.
191. Sorci G. 100B Protein, a Damage-Associated Molecular Pattern Protein in the Brain and Heart, and Beyond / G. Sorci, R. Bianchi, F. Riuzzi [et al.] // Cardiovascular Psychiatry and Neurology. – 2010. – V. 2010. – Article ID 656481. – 13 p.
192. Sorci G. S100B protein in tissue development, repair and regeneration / G. Sorci, F. Riuzzi, C. Arcuri [et al.] // World J. Biol. Chem. – 2013. V. 4. – Issue 1. – P. 1–12.
193. Sorci G. The Danger Signal S100B Integrates Pathogen– and Danger–Sensing Pathways to Restrain Inflammation / G. Sorci, G. Giovannini, F. Riuzzi [et al.] // PLoS Pathogens. – 2011. – V. 7. – Issue 3. – e1001315. – 15 p.
194. Steiner J. S100b is expressed in, and released from, oln-93 oligodendrocytes: influence of serum and glucose deprivation / J. Steiner, H.-G. Bernstein, B. Bogerts [et al.] // Neuroscience. – 2008. – V 154. – No. 2. – 496–503.
195. Stern R. Devising a pathway for hyaluronan catabolism: are we there yet? / R. Stern // Glycobiology. – 2003. – V. 13. – No. 12. – P. 105-115.
196. Stevens T. Pathogenesis of Chronic Pancreatitis: An Evidence-Based Review of Past Theories and Recent Developments / T. Stevens, D.L. Conwell, and G. Zuccaro // The American Journal of Gastroenterology. – 2004. – V. 99. – P. 2256–2270.

197. Strate T. Pathogenesis and the natural course of chronic pancreatitis / T. Strate, E. Yekebas, W.T. Knoefel [et al.] // *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*. – 2002. – V. 14. – No. 9. – P. 929–934.
198. Sun G.-H. Pancreatic encephalopathy and Wernicke encephalopathy in association with acute pancreatitis: A clinical study / G.-H. Sun, Y.-S. Yang, Q.-S. Liu [et al.] // *World J. Gastroenterol.* – 2006. – V. 12. – No. 26. – P. 4224–4227.
199. Tandon R.K. Oxidative Stress in Chronic Pancreatitis: Pathophysiological Relevance and Management / R.K. Tandon and P.K. Garg // *Antioxidants & Redox Signaling*. – 2011. – V. 15. – No. 10. – P. 2757–2766.
200. Toops K.A. The effect of glial fibrillary acidic protein expression on neurite outgrowth from retinal explants in a permissive environment / K.A. Toops, T.L. Hagemann, A. Messing, and R.W. Nickells // *BMC Research Notes*. – 2012. – V. 5. – No.693. – 9 p.
201. Tsang S.W. Rhein, a Natural Anthraquinone Derivative, Attenuates the Activation of Pancreatic Stellate Cells and Ameliorates Pancreatic Fibrosis in Mice with Experimental Chronic Pancreatitis / S.W. Tsang, H. Zhang, C. Lin [et al.] // *PLOS ONE*. – 2013. – V. 8. – Issue 12. - e82201. – 15 p.
202. Tsoporis J.N. S100B: a multifunctional role in cardiovascular pathophysiology / J.N. Tsoporis, F. Mohammadzadeh, and T.G. Parker // *Amino Acids*. – 2011. – V. 41. – P. 843–847.
203. Ulmasov B. Differences in the Degree of Cerulein-Induced Chronic Pancreatitis in C57BL/6 Mouse Substrains Lead to New Insights in Identification of Potential Risk Factors in the Development of Chronic Pancreatitis / B. Ulmasov, K. Oshima, M.G. Rodriguez [et al.] // *The American Journal of Pathology*. – 2013. – V. 183. – No. 3. – P. 692–708.
204. Ushakova G. Downregulation of the level of astroglial proteins in the rat brain by dietary alpha-ketoglutarate under experimental chronic hepatitis / G. Ushakova, O. Fomenko, S. Pierzynowski // *International Conference on “Advanced in Microbiology and Biotechnology for Human and Animal Health”*. – 2011. – P. 34–37.

205. Ushakova G. Non-invasive markers of hepatic encephalopathy under chronic hepatitis C and 2-oxoglutarate treatment / G. Ushakova, O. Fomenko, S. Pierzynowski // "Annales Universitatis Mariae Curie-Sklodowska", SECTIO DDD. – 2010 – V. 23, №3. – P. 203–206.
206. Venkatasubramanian P.N. Imaging the pancreatic ECM // P.N. Venkatasubramanian // Pancreatic Cancer and Tumor Microenvironment. Edited by P.J. Grippo and H.G. Munshi. Trivandrum (India): Transworld Research Network. – 2012. – P. 11–27.
207. Waldthaler A. Causes and Mechanisms in Acute Pancreatitis / A. Waldthaler, K. Schutte, and P. Malfertheiner // Dig Dis. – 2010. – V. 28. – No. 2. – P. 364–372.
208. Wang C.H. Effect of emodin on pancreatic fibrosis in rats / C.H. Wang, Z.Q. Gao, B. Ye [et al.] // World J. Gastroenterol. – 2007. – V. 13. – No. 3. – P. 378–382.
209. Wang J. Amelioration of Experimental Acute Pancreatitis with Dachengqi Decoction via Regulation of Necrosis-Apoptosis Switch in the Pancreatic Acinar Cell / J. Wang, G. Chen, H. Gong [et al.] // PLoS ONE. – 2012. – V. 7. – Issue 7. – e40160. – 7 p.
210. Weinstein-Oppenheimer C.R. The effect of an autologous cellular gel-matrix integrated implant system on wound healing / C.R Weinstein-Oppenheimer, A.R Aceituno, D.I. Brown [et al.] // Journal of Translational Medicine. – 2010. – V. 8. – No. 59. – 11 p.
211. Westphal D. Clustering of the Neural Cell Adhesion Molecule (NCAM) at the Neuronal Cell Surface Induces Caspase-8- and -3-dependent Changes of the Spectrin Meshwork Required for NCAM-mediated Neurite Outgrowth / D. Westphal, V. Sytnyk, M. Schachner, and I. Leshchyns'ka // The Journal of Biological Chemistry. – 2010. – V. 285. – No. 53. – P. 42046–42057.
212. Whitcomb D.C. Value of genetic testing in the management of pancreatitis / D.C. Whitcomb // Gut. – 2004. V. 53. P. 1710–1717.

213. Yin H. Free Radical Lipid Peroxidation: Mechanisms and Analysis / H. Yin, L. Xu, and N.A. Porter // *Chem. Rev.* – 2011. V. 111. – P. 5944–5972.
214. Yuan J. Protein kinase D regulates cell death pathways in experimental pancreatitis / J. Yuan, Y. Liu, T. Tan [et al.] // *Frontiers in Physiology.* – 2012. – V. 3. – Article 60. – 17 p.
215. Zecchini S. The adhesion molecule NCAM promotes ovarian cancer progression via FGFR signaling / S. Zecchini, L. Bombardelli, A. Decio [et al.] // *EMBO Molecular Medicine.* – 2011. – V. 3. – No. 8. – P. 480–494.
216. Zhao J.-B. Animal models of pancreatitis: Can it be translated to human pain study? / J.-B. Zhao, D.-H. Liao, and T. D. Nissen // *World J. Gastroenterol.* – 2013. – V. 19. – No. 42. – P. 7222-7230.
217. Zhang D. Astrogliosis in CNS Pathologies: Is There A Role for Microglia? / D. Zhang, X. Hu, L. Qian [et al.] // *Mol. Neurobiol.* – 2010. – V. 41. – No. 2–3. – P. 232–241.
218. Zhang X.-P. Pathogenesis of pancreatic encephalopathy in severe acute pancreatitis / X.-P. Zhang and H. Tian // *Hepatobiliary Pancreat Dis. Int.* – 2007. – V. 6. – No 2. – P. 134–140.