



УДК 616.37-002+616.881/589.1+51.082+599.288

Содержание NCAM в головном мозге и поджелудочной железе крыс в условиях эндогенной интоксикации при экспериментальном хроническом панкреатите

В.А. Макаrchук¹, Г.А. Ушакова²

¹ГУ «Институт гастроэнтерологии НАМН Украины», Днепропетровск, Украина

²Днепропетровский национальный университет имени Олеся Гончара, Днепропетровск, Украина

В эксперименте на лабораторных крысах воспроизведена модель хронического панкреатита. Окклюзия панкреатического протока привела к значительной атрофии ацинарных клеток, развитию фиброза поджелудочной железы, нарушению функции данного органа и снижению антиоксидантной защиты организма животных. У экспериментальных крыс развивалась эндогенная интоксикация, проявившаяся достоверным увеличением в плазме крови животных концентрации молекул средней массы вследствие активации процессов липопероксидации. В результате развития моделируемой патологии поджелудочной железы происходит достоверное перераспределение содержания растворимой и мембранной форм нейрональной молекулы клеточной адгезии (NCAM), наиболее выраженное в мозжечке и таламусе экспериментальных животных, что влечет за собой изменение межклеточной адгезии в указанных отделах мозга. Разнонаправленный характер распределения NCAM в мозжечке и таламусе свидетельствует о специфической адаптации нейропластичности в условиях эндотоксикации при развитии хронического панкреатита в зависимости от функциональной нагрузки отделов мозга.

Ключевые слова: молекулы средней массы; ТБК-активные соединения; хронический панкреатит; головной мозг; поджелудочная железа; нейрональная молекула клеточной адгезии

Content of NCAM in the brain and pancreas of rats in response to endointoxication under conditions of experimental chronic pancreatitis

V.A. Makarchuk¹, G.A. Ushakova²

¹SI «Institute of Gastroenterology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine», Dnipropetrovsk, Ukraine

²Oles Gonchar Dnipropetrovsk National University, Dnipropetrovsk, Ukraine

The study was undertaken to examine the influence of chronic pancreatitis on the distribution of neuronal cell adhesion molecule (NCAM) in the pancreas and various brain regions of rats under the conditions of endogenous intoxication. The study was conducted using 36 white nonlinear male rats (6 months old, 190–220 g). To develop the state of chronic pancreatitis, animals were subjected to laparotomy under general anesthesia and prolonged occlusion of the pancreatic duct. The morphological examination of pancreatic tissue has been performed to confirm the chronic pancreatitis development in animals. Biochemical evaluation of the pancreatic fibrosis has been performed by measuring plasma levels of hyaluronic acid, hydroxyproline and protein-free hydroxyproline. The intensity of free radical oxidation has been assessed by the change in the concentration of TBA-active products in plasma. The level of endotoxemia has been determined by the content of average weight molecules in plasma. Protein fractions were extracted from the pancreas and various parts of the rat brain and the

¹ГУ «Институт гастроэнтерологии НАМН Украины», пр. имени Газеты «Правда», 96, Днепропетровск, 49074, Украина

SI «Institute of Gastroenterology of National Academy of Medical Sciences of Ukraine», Gazety «Pravda» Ave., 96, Dnipropetrovsk, 49074, Ukraine

²Дніпропетровський національний університет ім. Олеся Гончара, пр. Гагаріна, 72, Дніпропетровськ, 49010, Україна
Oles' Honchar Dnipropetrovsk National University, Gagarin Ave., 72, Dnipropetrovsk, 49010, Ukraine

Tel.: +38-067-966-48-43, E-mail: viktoriam7@gmail.com

levels of soluble (sNCAM) and membrane (mNCAM) proteins were studied with the use of the competitive ELISA. Total protein in the obtained fractions was measured by the Bradford assay. Occlusion of the pancreatic duct resulted in significant atrophy of acinar tissue, fibrosis and disfunction of the pancreas along with the decreasing in the antioxidant defense of animals. The present study shows developing of endointoxication in experimental rats, signified by considerable increase of molecules with average weight in plasma due to the activation of lipid peroxidation. It was established that, as a result of the experimental pancreas dysfunction, significant redistribution of soluble and membrane forms of NCAM took place, more especially in the cerebellum and thalamus of rats; it caused changing of cell-cell adhesion in these brain regions. Multidirectional NCAM distribution in the cerebellum and thalamus gives evidence of neuroplasticity as specific adaptation under conditions of chronic pancreatitis.

Keywords: molecules with average weight; TBA-active products; chronic pancreatitis; brain; pancreas; neuronal cell adhesion molecule

Введение

Во всем мире возрастает распространенность и заболеваемость панкреатитами, что связано с увеличением потребления алкоголя, ростом частоты курения, широким распространением ожирения среди населения развитых стран (Gubergrits, 2013). Хронический панкреатит является воспалительным заболеванием, которое характеризуется прогрессирующим разрушением ткани поджелудочной железы и приводит к ее экзокринной и эндокринной недостаточности (Grigsby et al., 2012).

Свободнорадикальное окисление, с одной стороны, является неотъемлемой частью нормальной жизнедеятельности организма, а с другой – нарушение этих процессов служит ранним неспецифическим фактором повреждения, лежащим в основе развития различных заболеваний, в том числе острого и хронического панкреатита. Если учитывать, что уровень антиоксидантной активности ткани поджелудочной железы один из самых низких в организме, то высвобождение в кровь продуктов свободнорадикального окисления и эндотоксинов будет способствовать формированию синдрома эндогенной интоксикации (Тропина et al., 2010; Çöl et al., 2010).

В настоящее время все большее значение приобретает изучение маркеров эндотоксикоза различного происхождения (Eleeva, 2013). Основная часть эндогенных токсинов принадлежит к молекулам средней массы (МСМ), повышение которых в крови, а также продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) при снижении активности системы биотранспорта и биотрансформации эндотоксинов является неспецифическим тестом эндогенной интоксикации (Eleeva, 2013; Shklovsky et al., 2011; Nikolskaya et al., 2013). Под МСМ следует понимать пул веществ со средней молекулярной массой от 300 до 5000 Да (фрагменты нуклеиновых кислот и ароматические аминокислоты). Накопление их происходит при нарушении функциональной активности систем детоксикации и усиленном катаболизме белков. Нарушение физико-химических свойств клеточных мембран делает их более доступными для разного рода повреждающих воздействий, включая процессы ПОЛ (Eleeva, 2013). Многие компоненты из МСМ проявляют нейротоксическую активность, способны присоединяться к рецепторам и блокировать их, неадекватно изменяя метаболизм и функции клетки. Они вызывают изменение проницаемости гематоэнцефалического барьера, ингибируют митохондриальное окисление, нарушают процессы транспорта аминокислот, ионов калия и натрия в центральную нервную систему, связанные с ингибированием Na^+, K^+ -АТФ-азы, структурно-функциональную организацию мембран клеток крови и эндотелия сосудов, угнетают фагоцитоз и др. (Krotenko et al., 2012;

Catala, 2009; Tereshenko et al., 2012). Так как МСМ способны приобретать свойства вторичных токсинов и оказывать влияние на жизнедеятельность всех систем и органов, их накопление в дальнейшем усугубляет течение патологического процесса (Tereshenko et al., 2012). В результате многочисленных исследований установлено, что повышение уровня МСМ в крови наблюдается при патологических состояниях различной этиологии и степени тяжести, в том числе при остром панкреатите, панкреонекрозе, ряде хирургических заболеваний (Nikolskaya et al., 2013).

Ранним и тяжелым осложнением острого панкреатита является панкреатическая энцефалопатия, патогенез и механизм которой по-прежнему исследуются. В результате ее развития может изменяться проницаемость гематоэнцефалического барьера (Zhen et al., 2012). Патологические изменения в тканях головного мозга при панкреатической энцефалопатии связаны в основном с отеками нейронов и геморрагическими очагами. Li et al. (2003) предполагают, что липаза и фосфолипаза A_2 могут привести к повреждению структуры центральной нервной системы и играют важную роль в патологическом процессе панкреатической энцефалопатии, а низкое содержание натрия и фосфора, гипоксия, азотемия, нарушение углеводного обмена в крови и инфекции могут быть триггерами. Патогенез данной патологии остается до конца не ясен (Xi-Ping and Hua, 2007). Вопрос о развитии панкреатической энцефалопатии при хроническом панкреатите на сегодняшний день недостаточно освещен и представляет значительный интерес для исследователей.

Нейрональная молекула клеточной адгезии (NCAM) является членом суперсемейства иммуноглобулинов, представляет собой гликопротеин, который опосредует гомофильное взаимодействие между соседними клетками и гетерофильное – между клетками и компонентами внеклеточного матрикса (Campodonico et al., 2010). Развитие и поддержание морфологии нейронов имеет большое значение для нормального развития и функционирования мозга. NCAM играет важную роль в этих процессах, участвуя в регуляции миграции нейронов и их дифференциации, принимает участие в механизме регулирования мембранного потенциала, который определяет возбудимость этих клеток (Campodonico et al., 2010, Kleene et al., 2010), взаимодействует с факторами роста и рецепторами факторов роста (Hübschmann and Skladchikova, 2010). NCAM помимо участия в развитии нервной системы также в значительной степени вовлечен в синаптическую пластичность и в когнитивные процессы в зрелом мозге. NCAM принимает участие как в кратковременной пластичности при уже существующих синапсах, так и в длительной пластичности, связан-

ной с синаптическим образованием или элиминацией. По современным представлениям о функциональной роли NCAM, блокировка функций данного белка может привести к когнитивным нарушениям и эмоциональным изменениям, в том числе нарушению пространственного восприятия и памяти, нарушению слуха, усилению тревожности, нарушению восприимчивости запаха и др. (Bisaz et al., 2009).

NCAM существует в трех основных изоформах (NCAM-180, NCAM-140 и NCAM-120), отличающихся по молекулярному весу, а также по распределению и функциям (Bisaz et al., 2011). В то время как NCAM-120 не имеет цитоплазматического домена и прикрепляется к мембране посредством ковалентно связанного фосфатидилинозитол-закоривающего соединения, NCAM-140 и NCAM-180 представлены трансмембранными и интрацитоплазматическими доменами (Campodonico et al., 2010).

Целью нашего исследования была оценка влияния хронического панкреатита на распределение NCAM в поджелудочной железе и различных отделах головного мозга крыс в условиях эндогенной интоксикации.

Материал и методы исследований

В работе использовали альциан голубой (Fluka, Швейцария), гиалуроновую кислоту (Sigma, США), моноспецифические поликлональные антитела против NCAM, очищенные антигены NCAM (Santa Cruze, США), вторичные антитела, меченные пероксидазой хрена (Sigma, США).

Эксперимент проводили на белых лабораторных крысах-самцах (6 месяцев, 190–210 г) согласно Закону Украины № 3447-IV от 21.02.06 г. «О защите животных от жестокого обращения». Крысы находились в стандартных условиях с естественной сменой освещения и соблюдением общего рациона вивария. За сутки до эксперимента крыс не кормили, доступ к воде оставался свободным. Для моделирования хронического панкреатита животным под наркозом (кетамин гидрохлорид, 110 мг/кг) проводили лапаротомию и окклюзию протока поджелудочной железы лигатурой «Prolene» 5/0 (Page et al., 2000).

Экспериментальных животных разделили на две группы: I группа (n = 6) – ложнооперированные крысы, которым проводили лапаротомию и сразу же разрез кожного покрова на брюхе зашивали (контрольная группа); II группа (n = 6) – крысы с хроническим панкреатитом. После окончания эксперимента животных на 30-е сутки декапитировали после предварительного введения наркоза (110 мг/кг). Гепаринизированную кровь разделяли на плазму и эритроциты.

Для подтверждения развития у животных хронического панкреатита проводили морфологическое исследование ткани поджелудочной железы, включающее стандартную фиксацию кусочков ткани в жидкости Буена, проводку и заливку их в парафиновые блоки, приготовление срезов и окраску гематоксилином-эозином (по общепринятому в гистологии методу), 2% кислым пикрофуксином и трехцветную качественную окраску по Маллори – Слинченко (Sapozhnikov and Dorosevich, 2000) с последующим изучением препаратов с помощью

светового микроскопа XSP-139TP и фотографированием фотоаппаратом Canon A630 (Japan).

Концентрацию гиалуроновой кислоты оценивали по оптической плотности раствора, содержащего комплекс, образованный этим гликозаминогликаном (ГАГ) с красителем альцианом голубым (Gold, 1981). Щелочной раствор (рН 8,6), который используется для окраски несульфатированных ГАГ, содержит 0,5 М CH_3COONa и 1% раствор альциана голубого. Микрометод определения гиалуроновой кислоты: 20 мкл пробы приливают в лунку планшета и добавляют 200 мкл красителя. Через 15 мин. проводят измерение на спектрофотометре «Anthos 2010» (Финляндия) при 480 нм. Концентрацию оксипролина белковосвязанного и свободного определяли по методу М.А. Осадчук (Osadchuk, 1979).

Интенсивность свободнорадикального окисления оценивали по изменению концентрации ТБК-активных продуктов в плазме крови. Последнюю определяли по методу Л.М. Овсянниковой и соавт. (Ovsyannikova et al., 1999). Уровень эндотоксемии определяли по содержанию МСМ в плазме крови в соответствии со стандартизированной методикой, предложенной В.В. Николайчиком (Nykolaychik et al., 1991). Концентрацию МСМ по белку определяли по методу Лоури (Loury et al., 1951). Результаты определения МСМ по белку представлены в мг/л, результаты для каждой длины волны – в опт. ед.

Для получения белковых фракций из поджелудочной железы и мозга крыс мозг очищали от поверхностной пленки и капилляров, изымали отдельно мозжечок, гиппокамп и таламус. Гомогенизацию ткани поджелудочной железы и отделов мозга проводили в буфере А, который содержал трис- HCl – 25 мМ (рН 7,4), ЭДТА – 1 мМ, β -меркаптоэтанол – 2 мМ, фенолметилсульфонилфторид – 0,2 мМ, мертиолат – 0,01%, в соотношении 1:10 при +4 °С. В ходе последовательных стадий центрифугирования (I стадия – центрифугирование 60 мин. при 20 000 g, II стадия – инкубация осадка 24 часа после первого центрифугирования в буфере А, который дополнительно содержал Тритон X-100 – 2%, и центрифугирование 90 мин. при 100 000 g) выделены фракции, содержащие растворимые NCAM (soluble – sNCAM, выделенные на I стадии центрифугирования) и мембранные NCAM белки (membrane – mNCAM, выделенные на II стадии центрифугирования).

Полученные фракции белков использовали для количественного определения содержания в них NCAM методом твердофазного иммуноферментного анализа (Ngo et al., 1988) с использованием моноспецифических поликлональных антител против NCAM, а также вторичных антител против IgG кроликов, меченых пероксидазой хрена. Для построения калибровочных кривых использовали очищенные антигены NCAM. Оценку результатов проводили в спектрофотометре «Anthos 2010» при длине волны 492 нм. Содержание NCAM определяли как отношение его количества в пробе к количеству общего белка (ОБ) в данной пробе (мкг NCAM/мг ОБ). Количество общего белка в полученных фракциях мозга определяли методом Бредфорд (Bradford, 1985).

Статистическую обработку результатов осуществляли методами вариационной статистики с использованием стандартного пакета прикладных программ SPSS 13.0 for Windows. Для показателя определяли выборочное

среднее значение (M) и ошибку среднего (m). Исследуемые соотношения считали достоверными при $P < 0,05$, $P < 0,01$ и $P < 0,001$. Корреляционный анализ проводили по Пирсону (для данных, выраженных в интервальной шкале) (Petri and Sabin, 2003).

Результаты и их обсуждение

Морфологический анализ. Развитие хронического панкреатита у животных с 30-суточной окклюзией панкреатического протока подтверждалось морфологическим анализом ткани поджелудочной железы. С помощью окраски по Ван-Гизону в образцах из хвостовой части органа, где и осуществлялась окклюзия панкреатического протока, был выявлен междольковый и внутридольковый фиброз, а также внутридольковая фибробластическая

реакция в виде узких и широких разветвленных междольковых тяжей вокруг сосудов. Хронизация панкреатита сопровождалась значительной атрофией ацинарной ткани поджелудочной железы и замещением ее фиброзной тканью. Мелкие протоки органа расширены, наблюдались признаки гиперплазии эпителия. В сохранившейся части протоковой структуры имела место парциальная атрофия ацинарных клеток. Вокруг магистральных и внутридольковых протоков наблюдалась плотная фиброзная ткань, а рыхлая фиброзная ткань заполняла междольковое пространство и содержала остатки разрушенных частиц островков, протоки и сосуды (рис. 1 а, б). Анализ образцов из железы контрольных крыс изменений не выявил: среди экзокринной ткани находились островки Лангерганса различной формы и размера, ацинарная ткань без особенностей (рис. 1 в).

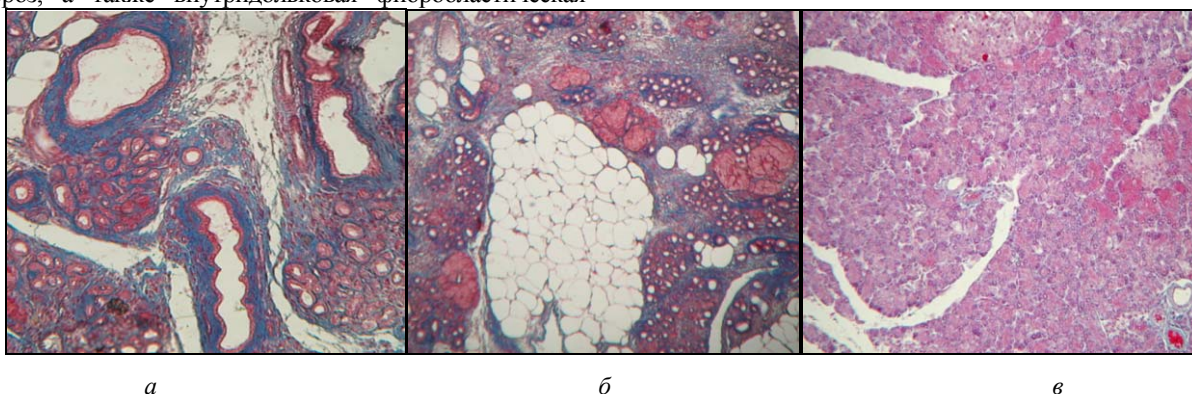


Рис. 1. Образцы ткани поджелудочной железы крыс при экспериментальном хроническом панкреатите (30 суток): атрофия ацинарной ткани, гиперплазия островков, рыхлый (а) и плотный (б) вокругдольковый и внутридольковый фиброз; образец ткани нормальной структуры поджелудочной железы (в); окраска по Маллори – Слинченко, $\times 40$

Анализ содержания маркеров фиброза. К малоинвазивным методам диагностики фиброза поджелудочной железы следует отнести определение молекулярных соединений, участвующих в патогенезе процесса образования внеклеточного матрикса, в том числе гиалуроновой кислоты. Содержание ее в плазме крови отражает степень прогрессирования фиброза органа при хроническом панкреатите. В опытной группе крыс содержание гиалуроновой кислоты в крови увеличилось на 46,9% ($P < 0,001$) по сравнению с контролем. Изменение в плазме крови концентрации оксипролина белковосвя-

занного и оксипролина свободного рассматривается как показатель метаболизма коллагена и дает важную информацию о биохимических и патологических особенностях фиброгенеза. С прогрессированием панкреатита и фиброзной трансформацией данного органа концентрация оксипролина белковосвязанного увеличилась на 38,5% ($P < 0,001$) при одновременном снижении концентрации оксипролина свободного на 30,0% ($P < 0,01$) относительно контроля, что свидетельствует о нарушении метаболизма коллагена в сторону фиброгенеза (табл.).

Таблица

Значения биохимических показателей крови экспериментальных крыс

Показатель	Контрольная группа, n = 6	Хронический панкреатит, n = 6
Гиалуроновая кислота, мкг/мл	1,28 ± 0,06	1,88 ± 0,10***
Оксипролин белковосвязанный, мкмоль/л	166,7 ± 9,2	230,8 ± 8,8***
Оксипролин свободный, мкмоль/л	9,96 ± 0,60	6,97 ± 0,39**
ТБК-активные продукты, нмоль/мл	4,50 ± 0,23	6,16 ± 0,18*
МСМ, мг/л	781,3 ± 31,7	1228,3 ± 109,5**
МСМ-230, опт. ед.	0,394 ± 0,012	0,647 ± 0,070**
МСМ-254, опт. ед.	0,031 ± 0,004	0,039 ± 0,002
МСМ-280, опт. ед.	0,042 ± 0,002	0,062 ± 0,003***

Примечание: * – $P < 0,05$, ** – $P < 0,01$, *** – $P < 0,001$ – различия достоверны по сравнению с группой контроля.

Анализ показателей перекисного окисления липидов и эндотоксикации. Деструктивный процесс в поджелудочной железе сопровождался увеличением в плазме крови концентрации ТБК-активных продуктов на

36,9% ($P < 0,05$) по сравнению с контрольным значением (табл.). Проведенные исследования позволили установить, что при развитии патологии поджелудочной железы у крыс определяется статистически значимое увели-

чение концентрации МСМ в плазме крови (на 57,2%, $P < 0,05$) относительно группы контроля (табл.). При определении взаимосвязи между процессами избыточной липопероксидации и образованием продуктов распада протеинов в группе крыс с хроническим панкреатитом выявлена умеренная положительная корреляционная связь между соответствующими показателями (уровнем ТБК-активных продуктов и МСМ, $r = 0,529$, $P < 0,05$), которая не отмечалась в контроле.

Анализ спектров поглощения света кислоторастворимой фракции сыворотки крови в диапазоне 230–280 нм показал, что все исследованные фракции МСМ в опытной группе крыс превышали контрольные показатели. Средняя концентрация МСМ-230, содержащая преимущественно эндогенные патогены в виде белков-гистонов, продуктов разрушения ДНК, вышедшими из цитозоля в межклеточную среду, лимфоток и кровь при нарушении целостности клеточных мембран (нуклеарная фракция) и измеряемая при длине волны 230 нм, увеличивалась в группе крыс с хроническим панкреатитом на 63,5% ($P < 0,01$) относительно контрольной группы. Токсическая фракция, определяемая при длине волны 254 нм, состоит из гидрофобных токсинов, обладающих высоким сродством к биологическим структурам, находящимся в плазме в практически полностью связанном состоянии в виде комплексов с альбумином или липопротеинами низкой плотности, изменяется в меньшей степени. Концентрация пептидной фракции МСМ-254 в группе крыс с окклюзией панкреатического протока имела тенденцию к увеличению на 25,8% по сравнению с контролем. Средняя концентрация МСМ-280 (фракция ароматических хромофоров, которая измерялась при длине волны 280 нм) у группы крыс с

хроническим панкреатитом на 47,6% ($P < 0,001$) превышала таковую контрольной группы (табл.).

Анализ содержания нейрональной молекулы клеточной адгезии NCAM во фракциях поджелудочной железы и отделов мозга. Количественный анализ нейрональной молекулы клеточной адгезии NCAM в ткани поджелудочной железы и различных отделах мозга исследуемых крыс показал специфичность перераспределения растворимой и мембранной форм NCAM только в мозге при развитии хронического панкреатита.

На 30-е сутки окклюзии панкреатического протока у крыс не происходит достоверного изменения концентрации как растворимой, так и мембранной форм исследуемого нейроспецифического белка в экстракте из поджелудочной железы относительно контрольной группы. При развитии хронического панкреатита наблюдалось наиболее выраженное изменение уровня данного белка в мозжечке: увеличение растворимой sNCAM на 19,7% ($P < 0,05$) до $2,18 \pm 0,14$ мкг/мг ОБ по отношению к контрольной группе животных $1,75 \pm 0,14$ мкг/мг ОБ (рис. 2 а) и достоверное снижение содержания mNCAM (на 46,0%, $P < 0,01$) с $212,5 \pm 29,2$ мкг/мг ОБ (контроль) до $114,8 \pm 9,5$ мкг/мг ОБ (рис. 2 б).

В таламусе отмечено противоположно направленное изменение уровня NCAM по сравнению с мозжечком. Отмечена тенденция к снижению sNCAM (но не достоверно значимая) и увеличение mNCAM на 34,2% ($P < 0,05$) с $153,8 \pm 7,6$ мкг/мг ОБ (контрольная группа) до $206,5 \pm 21,7$ мкг/мг ОБ (рис. 2 а, б). В гиппокампе исследуемых крыс достоверных различий в содержании как растворимой, так и мембранной формы NCAM при панкреатите не установлено.

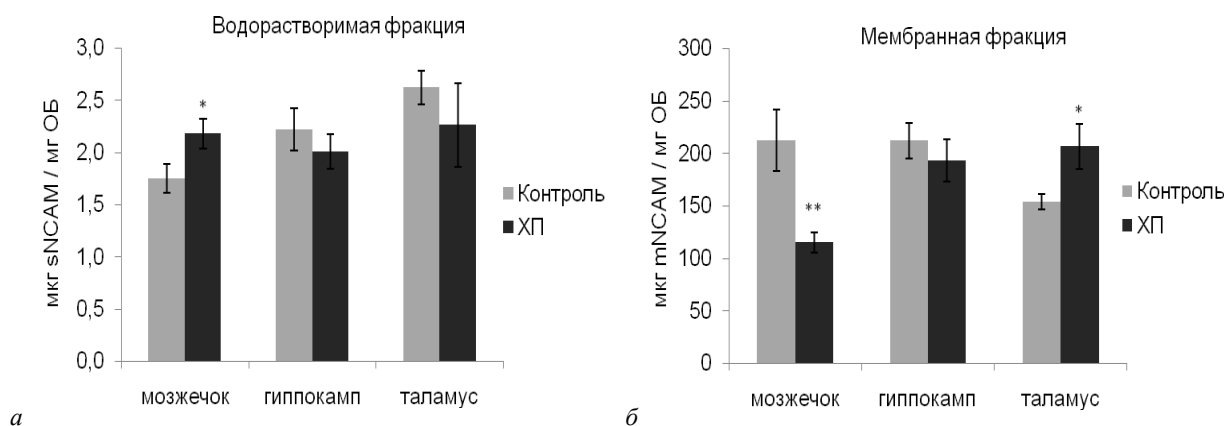


Рис. 2. Концентрация NCAM в водорастворимой (а) и мембранной (б) фракциях, экстрагированной из различных отделов головного мозга крыс: контроль – псевдооперированные крысы, XP – крысы с экспериментальным хроническим панкреатитом, * – $P < 0,05$, ** – $P < 0,01$ – различия достоверны по сравнению с группой контроля, $n = 6$

Корреляционный анализ в группе крыс с хроническим панкреатитом показал высокую положительную связь между концентрациями sNCAM в экстракте из мозжечка и МСМ-230 в плазме крови ($r = 0,943$, $P < 0,01$) и между mNCAM в экстракте из таламуса и МСМ-280 в плазме крови ($r = 0,829$, $P < 0,05$), а также отрицательную среднюю связь между содержанием mNCAM в экстракте из мозжечка и МСМ в плазме крови ($r = -0,600$, $P < 0,05$). Отмечена обратная связь между уровнем растворимой и

мембранной фракции NCAM, которые экстрагированы из мозжечка, sNCAM/mNCAM ($r = -0,886$, $P < 0,05$).

Таким образом, в данном эксперименте у животных наблюдались признаки хронического панкреатита, развитие которого подтверждалось морфологическими и биохимическими исследованиями. На 30-е сутки исследования происходило замещение ацинарных структур соединительной тканью, поджелудочная железа уменьшалась в размере и становилась более плотной. Ранее

нами было показано, что с потерей значительной части паренхимы поджелудочной железы и развитием в ней фиброза у крыс с экспериментальным хроническим панкреатитом происходит нарушение внешнесекреторной функции органа (Makarchuk et al., 2013).

При панкреатите происходит изменение содержания гиалуроновой кислоты в экстрацеллюлярном матриксе (Masamune et al., 2009; Madro et al., 2011; Venkatasubramanian, 2012). Рост концентрации данного ГАГ в плазме крови обусловлен увеличением его продукции панкреатическими звездчатыми клетками и нарушением деградации гиалуронидазой (El-Shabrawi Mortada et al., 2012; Duterme et al., 2009). Высокое содержание гиалуроновой кислоты, которое определялось в крови крыс на 30-е сутки эксперимента, свидетельствует о значительной степени фиброзной трансформации поджелудочной железы при хроническом панкреатите. Еще один малоинвазивный метод оценки фиброза ткани – определение концентрации оксипролина свободного и белковосвязанного в плазме крови – подтвердил развитие фиброза. Достоверное повышение концентрации оксипролина белковосвязанного и снижение содержания оксипролина свободного в опытной группе крыс означало, что на стадии хронизации панкреатита превалируют процессы активного коллагенообразования над его деградацией.

Интегральная оценка выраженности эндогенной интоксикации получена с помощью комплекса биохимических тестов, включающих определение МСМ и ТБК-активных продуктов. По уровню ТБК-активных продуктов в плазме крови можно косвенно судить о степени риска мембранной патологии клеток при хроническом панкреатите. В эксперименте нами установлено достоверное увеличение ($P < 0,05$) данного показателя в плазме крови крыс с длительной лигатурой панкреатического протока, свидетельствующее об активации процессов липопероксидации у этих животных, что может вызвать окислительное повреждение мембран ацинарных клеток поджелудочной железы.

Реактивные кислородные метаболиты являются редокс-активными соединениями, и в зависимости от их концентрации они могут оказывать как положительный (пролиферация клеток), так и отрицательный (остановка клеточного роста, клеточная гибель) эффект на нервные клетки (Dugaskova, 2010). Активные формы кислорода увеличивают реактивность нейрональной ткани в отношении возбуждающих нейротрансмиттеров. Эти молекулы атакуют глиальные клетки и нейроны, а последние, являясь постмитотическими клетками, оказываются особенно уязвимыми к действию свободных радикалов (Gomazkov, 2011).

Высвобождение в системный кровоток продуктов свободнорадикального окисления и эндотоксинов способствует развитию эндогенной интоксикации, которая, вызывая дисбаланс многочисленных биохимических и нейрофизиологических процессов, может влиять на тяжесть течения заболевания (Tropina et al. 2010; Alfuyogova et al., 2011). Накопление МСМ и ТБК-активных продуктов в плазме крови крыс с хроническим панкреатитом, вероятно, является взаимосвязанным процессом, что подтверждается положительной корреляционной связью ($r = 0,529$, $P < 0,05$).

Анализ результатов показал определяющее влияние поражения поджелудочной железы на уровень МСМ, что выражалось достоверным увеличением данного показателя ($P < 0,01$) в плазме крови крыс с хроническим панкреатитом и свидетельствовало о высоком уровне эндотоксикации организма. Не исключено, что изменение фракций МСМ имеет непосредственное отношение к развитию патологического процесса. Поэтому спектр МСМ-230, МСМ-254 и МСМ-280 можно рассматривать в качестве объективного критерия метаболических нарушений при хроническом панкреатите. В ходе исследования МСМ у опытных крыс выявлено достоверное увеличение ($P < 0,05$) нуклеарной фракции МСМ-230 относительно контроля. Возможно, повышение содержания данной фракции МСМ вызвано увеличением в крови остатков нуклеиновых кислот, что связано с усилением апоптоза панкреатитов, которому в последние годы отводится существенная роль в патогенезе хронического панкреатита (Merinova, 2013). Наблюдалась тенденция увеличения токсической фракции МСМ-254, состоящей из гидрофобных токсинов, и достоверно повышался ($P < 0,001$) уровень фракции ароматических хромофоров МСМ-280.

Многие компоненты из МСМ характеризуются нейротоксической активностью, вызывают изменение проницаемости гематоэнцефалического барьера (Krotenko et al., 2012). По данным клинических исследований, увеличение МСМ в плазме крови при различной соматической патологии, а также при ряде заболеваний центральной нервной системы является неблагоприятным прогностическим признаком. Корреляцию увеличения МСМ и неблагоприятного исхода заболевания связывают с выраженным цито- и нейротоксическим действием МСМ (Uzbekov et al., 2010).

На сегодняшний день имеется очень мало информации о перераспределении NCAM в различных отделах головного мозга при хронических заболеваниях внутренних органов. В нашем исследовании проанализировано распределение растворимой и мембранной формы NCAM в поджелудочной железе, мозжечке, гиппокампе и таламусе крыс с экспериментальным хроническим панкреатитом в условиях эндогенной интоксикации. Сбалансированное содержание трансмембранных и растворимых изоформ данного белка имеет большое значение для нормального развития и функционирования мозга (Fogel et al., 2011; Mao et al., 2012; Hinkle et al., 2006).

Полученные данные указывают на зависимость распределения исследуемых адгезивных молекул в мозжечке от увеличения концентрации эндотоксинов в крови, вызванное развитием патологии поджелудочной железы, что выражалось отрицательной корреляционной связью между содержанием mNCAM в экстракте из данного отдела мозга и содержанием МСМ в плазме крови ($r = -0,600$, $P < 0,05$) и положительной корреляционной связью между концентрацией sNCAM в экстракте из мозжечка и концентрацией МСМ-230 в плазме крови ($r = 0,943$, $P < 0,01$). Мишенью негативного влияния эндотоксинов в головном мозге в первую очередь являются мембраносвязанные белки, в том числе NCAM, что проявилось достоверным снижением концентрации этих молекул ($P < 0,01$) во фракции, выделенной из мозжечка.

Параллельно с этим наблюдалось достоверное увеличение ($P < 0,05$) в мозжечке относительно контроля содержания растворимой формы NCAM за счет энзиматического расщепления мембраносвязанных NCAM, «срезания» этих молекул с мембраны клеток. Эти результаты в группе крыс с хроническим панкреатитом подтверждались высокой обратной корреляционной связью между концентрациями растворимой и мембранной формы NCAM в экстрактах из мозжечка ($r = -0,886$, $P < 0,05$). Развитие данной патологии приводит к снижению межклеточной адгезии в мозжечке, который имеет огромное значение для координации и регуляции двигательной активности, поддержания равновесия тела и его ориентации в пространстве.

Основная функция растворимой формы NCAM заключается в регуляции внеклеточного сигналинга (Nagiya et al., 2009). NCAM регулирует межклеточную адгезию, миграцию нейронов (Zecchini et al., 2011). Трансмембранные адгезивные молекулы не только являются посредниками в процессе распознавания между клетками, но еще и могут преобразовывать сигналы внутри клетки и таким образом вызывать клеточный ответ, регулирующий онтогенез и синаптическую пластичность (в том числе при обучении и памяти) (Kleene et al., 2010, Nielsen et al., 2009). Поэтому в результате перераспределения NCAM между фракциями при экспериментальном хроническом панкреатите, когда в мозжечке наблюдалось увеличение количества растворимых и снижение мембранных молекул, нарушается нормальное функционирование как sNCAM, так и mNCAM.

Чувствительная реакция таламуса, принимающего ноцицептивные сигналы, на токсикацию организма вследствие заболевания поджелудочной железы подтверждалась прямой корреляционной связью между содержанием mNCAM в данном отделе и MCM-280 в плазме крови ($r = 0,829$, $P < 0,05$) и выражалась достоверным ($P < 0,01$) ростом концентрации mNCAM относительно контроля. Содержание sNCAM во фракции, экстрагированной из этого же отдела, имело тенденцию к снижению. Определенный дисбаланс содержания NCAM в мозжечке и таламусе свидетельствует о перераспределении этого протеина между указанными отделами головного мозга, благодаря чему, возможно, обеспечивается пластичность нервной системы в условиях развития хронического панкреатита у крыс. Концентрация как mNCAM, так и sNCAM во фракциях, выделенных из гиппокампа, имела только тенденцию к снижению, что свидетельствует о нормальном функционировании отдела мозга, ответственного за познавательную деятельность. Как видно из представленных результатов, развитие хронического панкреатита наиболее существенно влияет на функционирование мозжечка и таламуса.

Мы также определяли концентрацию sNCAM и mNCAM в экстракте из поджелудочной железы крыс с экспериментальным хроническим панкреатитом. Достоверных различий в концентрации как растворимой, так и мембранной форм NCAM не наблюдалось по сравнению с контрольными животными.

Выводы

У крыс с экспериментальным хроническим панкреатитом происходит достоверное увеличение в плазме крови уровня ТБК-активных продуктов ($P < 0,05$) и MCM ($P < 0,01$), свидетельствующее о развитии неспецифической эндогенной интоксикации, и наблюдается достоверное увеличение нуклеарной фракции MCM-230 ($P < 0,01$) и фракции ароматических хромофоров MCM-280 ($P < 0,001$). В результате эндогенной интоксикации при развитии хронического панкреатита происходит достоверное противоположно направленное перераспределение растворимой и мембранной форм NCAM в мозжечке и таламусе экспериментальных крыс, что свидетельствует о пластичности центральной нервной системы при данных условиях.

Библиографические ссылки

- Alfyorova, V.V., Uzbekov, M.G., Misionzhnik, E.Y., Loukyanyuk, E.V., Geht, A.B., Shklovsky, V.M., Shikhov, S.N., 2011. Serologicheskie markeri endogennoj intoksikacii v kompleksnoj ocenke reabilitacionnogo potenciala bol'nyh, perenessih ishemiceskij insyl't [Serological markers of endogeneous intoxication in determining rehabilitation potential for the patients after ischemic stroke]. Soc. Klin. Psihiatriia 11(3), 54–57 (in Russian).
- Bisaz, R., Conboy, L., Sandi, C., 2009. Learning under stress: A role for the neural cell adhesion molecule NCAM. Neurobiol. Learn. Mem. 91, 333–342.
- Bisaz, R., Schachner, M., Sandi, C., 2011. Causal evidence for the involvement of the neural cell adhesion molecule, NCAM, in chronic stress-induced cognitive impairments. Hippocampus 21, 56–71.
- Bradford, M., 1985. Rapid and sensitive methods for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248–254.
- Campodonico, P.B., Bal de Kier Joffe, E.D., Urtreger, A.J., Lauria, L.S., Lastiri, J.M., Puricelli, L.I., Todaro, L.B., 2010. The neural cell adhesion molecule is involved in the metastatic capacity in a murine model of lung cancer. Mol. Carcinog. 49, 386–397.
- Catalá, A., 2009. Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. Chem. Phys. Lipids 157, 1–11.
- Çöl, C., Dinler, K., Hasdemir, O., Büyükaşık, O., Buğdayci, G., 2010. Oxidative stress and lipid peroxidation products: Effect of pinealectomy or exogenous melatonin injections on biomarkers of tissue damage during acute pancreatitis. Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int. 9(1), 78–82.
- Ding, Z., Liu, J., Lin, R., Hou, X.H., 2012. Experimental pancreatitis results in increased blood-brain barrier permeability in rats: A potential role of MCP-1. J. Dig. Dis. 13, 179–185.
- Đurackova, Z., 2010. Some current insights into oxidative stress. Physiol. Res. 59, 459–469.
- Duteme, C., Mertens-Strijthagen, J., Tammi, M., Flamion, B., 2009. Two novel functions of hyaluronidase-2 (Hyal2) are formation of the glycocalyx and control of CD44-ERM interactions. J. Biol. Chem. 284(48), 33495–33508.
- Eleeva, M.A.-K., 2013. Sostojanie prooksidantnoj sistemi krvi i uroven' molekul srednej massi u bol'nyh s insul'tom [The condition of prooxidant blood system and medium mass molecules level in the patients under insult]. Vestnik Novih Med. Tehnologij (Elektronij Zh.) 1 (in Russian).

- El-Shabrawi Mortada, H.F., Zein El Abedin, M.Y., Omar, N., Kamal, N.M., Elmakarem, A.S., Khattab, S., El-Sayed, H.M., El-Hennawy, A., Ali Ali, S.M., 2012. Predictive accuracy of serum hyaluronic acid as a non-invasive marker of fibrosis in a cohort of multi-transfused Egyptian children with β -thalassaemia major. *Arab J. Gastroenterol.* 13, 45–48.
- Fogel, A.I., Stagi, M., Arce, K.P., Biederer, T., 2011. Lateral assembly of the immunoglobulin protein SynCAM 1 controls its adhesive function and instructs synapse formation. *EMBO J.* 30(23), 4728–4738.
- Gold, E.W., 1981. The quantitative spectrophotometric estimation of total sulfated glycosaminoglycan levels. *Biochem. Biophys. Acta* 673, 408–415.
- Gomazkov, O.A., 2011. Starenie mozga i nejtrotroficheskaja terapija [The aging of the brain and neurotrophic therapy]. Izdatel'stvo ICAR, Moscow (in Russian).
- Grigsby, B., Rodriguez, H., Khan, K., 2012. Antioxidants and chronic pancreatitis: Theory of oxidative stress and trials of antioxidant therapy. *Dig. Dis. Sci.* 57, 835–841.
- Gubergits, N.B., 2013. Sovremennye dostizhenija evropejskoj pancreatologii [Modern achievements of european pancreatology]. *Gastroenterologija* 47(1), 65–71 (in Russian).
- Hagiya, M., Ichyanagi, N., Kimura, K.B., Murakami, Y., Ito, A., 2009. Expression of a soluble isoform of cell adhesion molecule 1 in the brain and its involvement in directional neurite outgrowth. *Am. J. Pathol.* 174(6), 2278–2289.
- Hinkle, C.L., Diestel, S., Lieberman, J., Maness, P.F., 2006. Metalloprotease-induced ectodomain shedding of neural cell adhesion molecule (NCAM). *J. Neurobiol.* 66, 1378–1395.
- Hübschmann, M.V., Skladchikova, G., 2010. The role of ATP in the regulation of NCAM function. Ed. V. Berezin. Springer Science + Business Media, LLC, 663, pp. 81–89.
- Kleene, R., Cassens, C., Bähring, R., Theis, T., Xiao, M.-F., Dityatev, A., Schafer-Nielsen, C., Doring, F., Wischmeyer, E., Schachner, M., 2010. 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. *J. Biol. Chem.* 285(37), 28968–28979.
- Kleene, R., Mzoughi, M., Joshi, G., Kalus, I., Bormann, U., Schulze, C., Xiao, M.-F., Dityatev, A., Schachner, M., 2010. NCAM-induced neurite outgrowth depends on binding of calmodulin to NCAM and on nuclear import of NCAM and fak fragments. *J. Neurosci.* 32(30), 10784–10798.
- Krotenko, N.M., Boiko, A.S., Yepanchintseva, Y.M., Ivanova, S.A., 2012. Pokazateli oksidativnogo stressa i endogennoj intoksikacii v perifericheskoj krvi u bol'nyh s ekzogenno-organicheskimy rasstrojstvami v dinamike farmakoterapii [Parameters oxidative stress and endogenous intoxication of peripheral blood in patients with exogenous organic disorders in dynamic of the pharmacotherapy]. *Bjulleten' Sibirskoj Medicini* 1, 179–185 (in Russian).
- Loury, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, R.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193(2), 265–275.
- Madro, A., Slomka, M., Celinski, K., 2011. Can we expect progress in the treatment of fibrosis in the course of chronic pancreatitis? *Adv. Med. Sci.* 56, 132–137.
- Makarchuk, V.A., Ushakova, G.A., Krylova, O.O., 2013. Stan sistemi glutationu in krvi schuriv ta osoblivosti morfologichnih zmin tkanini pidshlunkovoi zalozi za umov eksperimentalnogo gostrogo ta hronichnogo pancreatitu [The state of glutathione system in the rat blood and peculiarities of morphological changes of the pancreas under experimental acute and chronic pancreatitis]. *Ukr. Biohim. Zh.* 85(1), 45–52 (in Ukrainian).
- Mao, X., Schwend, T., Conrad, G.W., 2012. Expression and localization of neural cell adhesion molecule and polysialic acid during chick corneal development. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 53(3), 1234–1243.
- Masamune, A., Watanabe, T., Kikuta, K., Shimosegawa, T., 2009. Roles of pancreatic stellate cells in pancreatic inflammation and fibrosis. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 7, 48–54.
- Merinova, N.I., Kozlova, N.M., Kolsnichenko, L.S., Suslov, A.I., Leonov, Z.A., 2013. Pokazateli perekisnogo oksidativnogo lipidov i glutationovoj antioksidantnoj zaschiti u bol'nyh s obostreniem chronicheskogo pankreatita [Indicators of lipid peroxidation and glutathione antioxidant defense in patients with exacerbation of chronic pancreatitis]. *Saratov J. Med. Sci. Res.* 9(2), 259–262 (in Russian).
- Ngo, T.T., Lenhoff, H.M., Yaklich, A., 1988. Immunofermentnij analiz [Enzyme immunoassay]. Ed. T.T. Ngo, G. Lenhoff. Mir, Moscow (in Russian).
- Nielsen, J., Gotfryd, K., Li, S., Kulahin, N., Soroka, V., Rasmussen, K.K., Bock, E., Berezin, V., 2009. 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. Neurosci.* 36(29), 11360–11376.
- Nikolskaya, V., Danilchenko, U., Memetova, Z., 2013. Biohimicheskiy aspekt rassmotrenija roli molekul srednej massi v organizme [Biochemical aspects of the consideration of the role of high molecular mass in the body]. *Uchenie Zapiski Tavricheskogo Nac. Univ. im. V.I. Vernadskogo Serija Biologija, Himija* 26(1), 139–145 (in Russian).
- Nykolaychik, V.V., Moyn, V.M., Kirkovskiy, V., Mazur, L.I., Lobacheva, G.A., Bychko, T.N., 1991. Sposob opredelenija «Srednih molekul» [Method for determining «average molecules»]. *Lab. Delo* 10, 13–18 (in Russian).
- Osadchuk, M.A., 1979. Metodi issledovanija oksiprolina v krvi i moche [Methods of hydroxyproline in blood and urine]. *Lab. Delo* 8, 456–458 (in Russian).
- Ovsyannikova, L.M., Alekhin, S.M., Drobinska, A., 1999. Biohimichni i biofizichni metodi ocinky porushen' oksidativnogo gomeostazu v osib, scho zaznali radiacijnogo vplivu vnaslidok avarii na ChAES [Biochemical and biophysical methods for assessing violations of oxidative homeostasis in individuals exposed to radiation exposure due to the Chernobyl accident]. *Chornobilinterinform*, Kyiv (in Ukrainian).
- Page, B.J., Toit, D.F., Muller, C.J.F., Mattysen, J., Lyners, R., 2000. An immunocytochemical profile of the endocrine pancreas using an occlusive duct ligation model. *Journal of the Pancreas* 4(1), 191–203.
- Petri, A., Sabin, K., 2003. Nagljadnaja statistika v medicine [Visual statistics in medicine]. Geotar-Med, Moscow (in Russian).
- Sapozhnikov, A.G., Dorosevich, A.E., 2000. Histologicheskaja i mikroskopicheskaja tehnika [The histological and microscopic technique]. Izdatel'stvo SAU, Smolensk (in Russian).
- Shklovskiy, V.M., Alfiorova, V.V., Misionzhnik, E.Y., Krasnov, V.N., Gusev, E.I., Uzbekov, M.G., Gekht, A.B., Lukyanuk, E.V., 2011. Znachenie sindroma endogennoj intoksikacii dlja vosstanovlenija narushennih funkcij posle ishemičeskogo insulta [The role of autointoxication in functional rehabilitation after ischemic stroke]. *Nevrologija* 63(4), 27–30 (in Russian).
- Tereshenko, O.A., Botashev, A.A., Pomeshik, Y.V., Petrosyan, E.A., Sergienko, V.I., 2012. Sindrom endogennoj intoksikacii i sistemnoj vospalitel'noj reakcii pri zhelchnom peritonite, oslozhnennom abdominal'nim sepsisom [Endogenous intoxication syndrome and system inflammatory reaction in choleperitonitis, complicated by abdominal sepsis]. *Vestnik Eksp. i Klin. Hirurgii* 5(4), 722–726 (in Russian).
- Tropina, I.V., Morozov, S.V., Dolgih, V.T., Poluektov, V.L., Ershov, A.V., 2010. Endogennaja intoksikacija u bol'nyh s postnekroticheskimy kistami podzheludochnoj zhelezi [En-

- ogenous intoxication in patients with postnecrotic pancreatic cysts]. Vestnik VolGMY 33(1), 97–98 (in Russian).
- Uzbekov, M.G., Alferova, V.V., Gekht, A.B., Misionzhnik, E.Y., 2010. K voprosu o patohimicheskikh izmeneniyah sistemy metabolicheskogo gomeostaza v ostrom periode ishemicheskogo insly'ta [About pathochemical changes of the system of metabolic homeostasis in acute period of ischemic stroke]. Ross. Mediko-Biologicheskij Vestnik im. I.P. Pavlova 3, 72–76 (in Russian).
- Venkatasubramanian, P.N., 2012. Imaging the pancreatic ECM. Ed. P.J. Grippo, H.G. Munshi. Transworld Research Network, pp. 11–27.
- Zecchini, S., Bombardelli, L., Decio, A., Bianchi, M., Mazzarol, G., Sanguineti, F., Aletti, G., Maddaluno, L., Berezin, V., Bock, E., Casadio, C., Viale, G., Colombo, N., Giavazzi, R., Cavallaro, U., 2011. The adhesion molecule NCAM promotes ovarian cancer progression via FGFR signaling. EMBO Mol. Med. 3(8), 480–494.
- Zhang, X.-P., Hua, T., 2007. Pathogenesis of pancreatic encephalopathy in severe acute pancreatitis. Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int. 6(2), 134–140.

Надійшла до редколегії 23.08.2014