

СОСТАВ АЦИЛЬНЫХ ЗАМЕСТИТЕЛЕЙ ПОЛЯРНЫХ И НЕЙТРАЛЬНЫХ ЛИПИДОВ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ХРОНИЧЕСКОМ СТЕАТОПАНКРЕАТИТЕ У КРЫС

Денисенко Ю.К., Бочарова Н.В., Новгородцева Т.П., Ковалевский Д.А.

Владивостокский филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания» – Научно-исследовательский институт медицинской климатологии и восстановительного лечения, Владивосток, e-mail: karaman@inbox.ru

Методом газожидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием проведена идентификация молекулярных видов и состав ацильных заместителей (жирных кислот) основных субклассов липидов – глицерофосфолипидов (ГФЛ), триацилглицеролов (ТАГ), эфиров стеролов (ЭС) поджелудочной железы (ПЖ) крыс линии Вистар при хроническом стеатопанкреатите. Экспериментальное жировое повреждение ПЖ вызывали высокожировой диетой в течение 12-24 недель. Показано, что 12 недель воздействия экспериментальным рационом на крыс приводит к развитию стеатоза ПЖ. Исследование морфологии тканей ПЖ через 24 недели выявило формирование стеатопанкреатита. Результаты исследования показали, что независимо от стадии жирового повреждения ПЖ во всех исследуемых полярных и нейтральных липидах происходит преимущественная эстерификация стеариновой и олеиновой кислот при дефиците полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК). Ключевой особенностью молекулярной структуры ТАГ при жировой болезни ПЖ стало снижение доли миристиновой и пальмитиновой кислот. В ГФЛ происходила переэстерификация n-3 и n-6 ПНЖК на кислоты из семейства n-9. Таким образом, развитие и прогрессирование жировой болезни ПЖ характеризуется нарушением молекулярной структуры основных липидных макромолекул и процессов эстерификации ацильных фрагментов, что может являться одним из ключевых механизмов патогенеза заболеваний органов пищеварительной системы.

Ключевые слова: поджелудочная железа, стеатопанкреатит, липиды, метаболизм жирных кислот, крысы линии Вистар.

THE COMPOSITION OF ACYL GROUPS OF POLAR AND NEUTRAL PANCREAS LIPIDS IN EXPERIMENTAL CHRONIC STEATOPANCREATITIS IN RATS

Denisenko Yu.K., Bocharova N.V., Novgorodtseva T.P., Kovalevskii D.A.

Vladivostok Branch of Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration – Research Institute of Medical Climatology and Rehabilitation Treatment, Vladivostok, e-mail: karaman@inbox.ru

This study was conducted to investigate molecular species and composition acyl groups (fatty acids) of glycerophospholipids (GPL), triacylglycerides (TAG), sterol esters (SE) of the pancreas in Wistar rats by GL/MS method. Experimental pancreatic fat damage was induced by a high-fat diet for 12-24 weeks. It has been shown that 12 weeks of exposure to the experimental diet on rats leads to the development of pancreatic steatosis. The study of pancreatic tissue morphology after 24 weeks revealed the formation of steatopancreatitis. It was found that in all studied polar and neutral lipids of the pancreas, preferential esterification of stearic and oleic acids occurs with a significant deficiency of long-chain polyunsaturated fatty acids (PUFA). A key feature of the molecular structure of TAG is a decrease in the proportion of myristic and palmitic acids. It has been shown the transesterification of n-3 and n-6 PUFAs into acids from the n-9 family in GPL. The revealed violation of the homeostasis of the acyl group in the main lipid subclasses may be one of the causes of the destructive and pathological mechanisms of steatopancreatitis development.

Keywords: pancreas, steatopancreatitis, lipids, fatty acid metabolism, Wistar rats.

Согласно современным представлениям, избыточная масса тела и ожирение являются главными триггерами патологических изменений поджелудочной железы (ПЖ), сопоставимых с изменениями при неалкогольной жировой болезни печени [1]. Прогрессирующей стадией течения неалкогольной жировой болезни поджелудочной железы (НЖБ ПЖ) является хронический неалкогольный стеатопанкреатит (НСП),

характеризующийся лимфомоноцитарно-плазмоцитарной инфильтрацией ткани ПЖ, некрозом и фиброзом [2]. Среди диффузных заболеваний пищеварительной железы НСП является одним из менее изученных патологических состояний [3; 4]. Деструкция клеток ПЖ при ожирении в первую очередь происходит в результате повышенного синтеза высокоцитотоксичных окисленных липидных продуктов [5]. Гиперактивация процессов перекисидации липидов сопровождается значительным изменением молекулярного состава и степени окисленности макромолекул липидов. Изменение липидного состава паренхиматозных органов пищеварительной системы при ожирении может являться одним из механизмов формирования хронических заболеваний ПЖ. Исследований, посвященных изучению роли модификации липидов ПЖ и переэстерификации их ацильных заместителей (жирных кислот) в патогенезе хронических заболеваний пищеварительной системы, очень мало. Вместе с тем большую информативную ценность с точки зрения механизма формирования НСП ПЖ может дать изучение спецификации молекулярных видов полярных и нейтральных липидов как индикаторов нарушения липидного обмена и органного патогенеза [6].

Целью исследования явилось изучение особенностей состава ацильных заместителей глицерофосфолипидов, триацилглицеролов, эфиров стеролов ткани поджелудочной железы на разных стадиях развития экспериментальной неалкогольной жировой болезни ПЖ.

Материал и методы исследования

Экспериментальные исследования были проведены на 35 белых крысах-самцах линии Вистар с начальной массой $172,0 \pm 5,6$ г в возрасте 3 месяцев. Ожирение и последующее повреждение ПЖ у крыс вызывали экспериментальным высокожировым и высокохолестериновым рационом. Прототипом выбора модели и сроков эксперимента явилась мультипатологическая модель развития метаболического синдрома по Fraulob, характеризующаяся формированием ожирения, стеатогепатита и стеатопанкреатита [7]. Животные были разделены на 3 группы: интактная группа крыс находилась на стандартном рационе питания; опытная группа 1 - крысы содержались на экспериментальном рационе в течение 12 недель и опытная группа 2 – 24 недели соответственно. Эвтаназию животных проводили путем декапитации под эфирным наркозом согласно требованиям Европейской конвенции по защите экспериментальных животных 86/609 ЕЕС. После вскрытия животных поджелудочная железа сразу же извлекалась, взвешивалась и один фрагмент органа погружался в раствор Фолча (хлороформ+метанол в соотношении 2:1) для липидного анализа, другой фрагмент - в раствор нейтрального забуференного 10% формалина для гистологического исследования. Для гистологических исследований кусочки ткани ПЖ заливались в парапласт (Histomix) и готовились срезы тканей толщиной 7 мкм, которые

окрашивались гематоксилином-эозином по Романовскому [8]. Гистологические препараты исследовали при помощи микроскопа AxioScope A.1 и камеры AxioCam 506 color «Carl Zeiss» (Германия).

Экстракцию липидов из ткани ПЖ проводили по методу Блайя и Дайера [9]. Разделение нейтральных и полярных липидов ткани ПЖ осуществляли методом одномерной микротонкослойной хроматографии на пластинках с закрепленным слоем силикагеля (Sorbfil). В качестве системы растворителей использовали смесь гексана, диэтилового эфира и уксусной кислоты (80:20:1, по объему). Зоны силикагеля, содержащие глицерофосфолипиды (ГФЛ), триацилглицеролы (ТАГ) и эфиры стеролов (ЭС), собирали шпателем, ТАГ и ЭС элюировали хлороформом, ГФЛ – метанолом. Метилловые эфиры ЖК получали по методу Каро и Дубака [10], анализировали на газожидкостном хроматографе Shimadzu GC-2010 (Япония) с пламенно-ионизационным детектором. Идентификацию пиков проводили по значениям эквивалентной длины цепи [11]. Результаты выражали в относительных процентах от суммы ЖК. Статистическую обработку результатов исследования проводили, вычисляя среднее арифметическое значение (M), ошибку среднего арифметического значения (m), и представляли в виде $M \pm m$. Статистическую значимость различий средних величин определяли с помощью критерия Стьюдента после проверки на нормальность распределения.

Результаты исследования и их обсуждение. Результаты гистологического исследования показали, что в группе интактных животных структура ткани соответствовала структуре здорового органа. Через 12 недель эксперимента у крыс опытной группы 1 наблюдались признаки жировой инфильтрации панкреатических клеток, что характеризовало формирование стеатоза поджелудочной железы (рис. 1а). Исследование морфологии тканей поджелудочной железы крыс опытной группы 2 через 24 недели эксперимента выявило очаги некроза с воспалительно-клеточной инфильтрацией и нарушение дольчатого строения тканей, формирования фиброзной трансформации (рис. 1 б, в). Следовательно, 12-недельное жировое повреждение поджелудочной железы у крыс соответствует характеру развития НЖБ ПЖ, тогда как через 24 недели формируется прогрессирующая стадия данного заболевания – неалкогольный стеатопанкреатит.

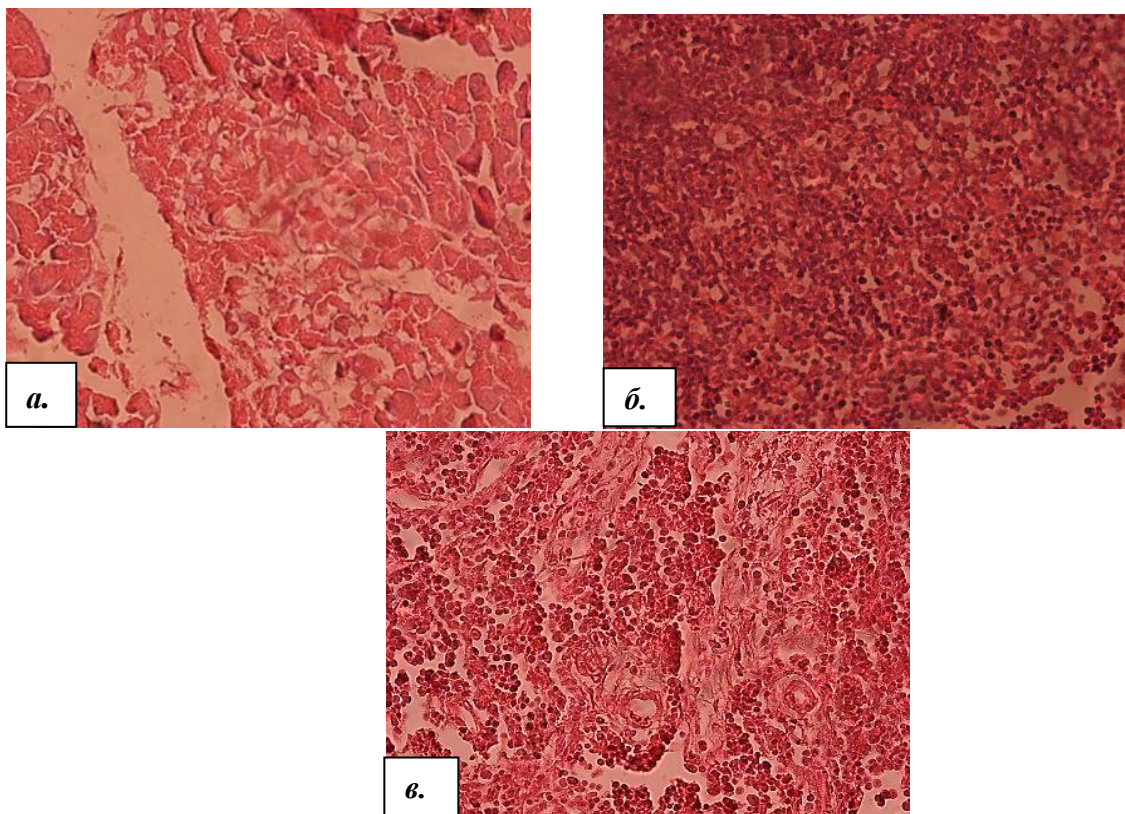


Рис. 1. Гистологическое строение поджелудочной железы у крыс, находившихся на экспериментальном рационе: а) 12-недельная опытная группа. Липидные включения в панкреатических клетках; б) 24-недельная опытная группа. Обширные поля некротизированных клеток и воспалительной инфильтрации; в) 24-недельная опытная группа. Разрастание соединительной ткани в паренхиме органа. Окраска гематоксилин-эозин. Увеличение 40×15

Липидомный анализ ацильных заместителей глицерофосфолипидов (ГФЛ), триацилглицеролов (ТАГ) и молекулярных видов эфиров стеролов (ЭС) ткани поджелудочной железы крыс представлен в таблице. Специфической особенностью молекулярной структуры глицерофосфолипидов ткани поджелудочной железы крыс опытной группы 1 (12 недель жирового повреждения ПЖ) стало увеличение в их составе доли миристиновой (14:0), стеариновой (18:0), олеиновой (18:1n9) кислот по сравнению с интактной группой крыс. Среди полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) отмечалось повышение эстерификации в ГФЛ линолевой (18:2n6) кислоты и кислоты Мида (20:3n9). Модификация длинноцепочечных ПНЖК молекул ГФЛ в ткани ПЖ характеризовалась двукратным уменьшением эйкозапентаеновой (20:5n3) и гамма-линоленовой (18:3n6) кислот. Через 24 недели развития модели НСП направленность изменений ацильных заместителей в молекулах ГФЛ была идентично изменениям 12-недельной модели. У крыс опытной группы 2 (24 недели развития НСП) в глицерофосфолипидах ПЖ отмечалось значительное увеличение доли олеиновой

кислоты при уменьшении концентрации гамма-линоленовой, арахидоновой и докозатетраеновой кислот по сравнению как с интактной группой, так и с 12-недельной опытной группой крыс.

Состав ацильных заместителей липидных фракций поджелудочной железы крыс $M \pm m$

Ацильный заместитель, %	Фракция липидов	Интактная группа, n=15	12-недельная группа НЖБ ПЖ, n=10	24-недельная группа НЖБ ПЖ, n=10
14:0	ГФЛ	0,78±0,04	***1,22±0,05	0,69±0,04
	ТАГ	2,26±0,01	***1,10±0,15	***1,53±0,11
	ЭС	0,35±0,06	***0,84±0,06	***0,92±0,05
16:0	ГФЛ	24,00±0,33	23,88±0,83	*21,02±0,36
	ТАГ	25,61±2,24	*20,23±1,66	**20,5±0,52
	ЭС	17,32±3,49	***11,47±1,43	***11,32±0,12
18:0	ГФЛ	14,80±0,37	**16,92±0,14	**16,97±0,72
	ТАГ	4,87±0,03	***7,35±0,91	*6,27±0,34
	ЭС	3,75±0,54	***6,35±0,22	***6,15±0,56
18:1n9	ГФЛ	10,77±0,41	*13,28±0,19	***16,52±0,34
	ТАГ	32,27±2,26	***48,66±1,87	***43,55±1,14
	ЭС	22,3±3,7	***36,8±2,7	***46,57±0,82
18:2n6	ГФЛ	13,9±0,6	***17,75±1,21	***17,3±0,2
	ТАГ	18,62±2,86	**13,23±1,40	**15,12±0,16
	ЭС	19,25±1,19	21,08±0,96	***13,12±0,23
18:3n6	ГФЛ	0,42±0,01	*0,3±0,02	***0,10±0,01
	ТАГ	0,46±0,16	0,42±0,01	**0,26±0,06
	ЭС	0,56±0,12	*0,28±0,02	*0,26±0,09
18:3n3	ГФЛ	0,18±0,01	0,20±0,05	**0,26±0,01
	ТАГ	0,68±0,03	*0,57±0,18	*0,55±0,04
	ЭС	0,46±0,06	***0,21±0,10	**0,82±0,11
20:3n9	ГФЛ	0,33±0,02	***1,53±0,09	0,31±0,02
	ТАГ	-	-	-
	ЭС	0,96±0,17	***0,45±0,05	*0,75±0,17
20:4n6	ГФЛ	16,53±0,72	*14,44±0,72	**13,1±0,6
	ТАГ	0,27±0,65	*0,15±0,05	*0,18±0,02

	ЭС	28,73±7,34	***10,96±0,86	***10,55±0,90
20:5n3	ГФЛ	0,95±0,13	***0,46±0,11	**0,63±0,01
	ТАГ	0,70±0,03	*0,92±0,13	-
	ЭС	0,7±0,2	***0,24±0,12	***0,25±0,11
22:4n6	ГФЛ	1,15±0,05	***0,9±0,06	***0,78±0,04
	ТАГ	0,30±0,01	-	***0,61±0,02
	ЭС	0,54±0,04	-	-
22:5n3	ГФЛ	0,62±0,13	0,57±0,08	0,55±0,06
	ТАГ	0,32±0,02	***0,12±0,01	***0,10±0,07
	ЭС	0,36±0,05	***0,26±0,09	***0,17±0,02
22:6n3	ГФЛ	2,43±0,47	2,07±0,24	2,10±0,35
	ТАГ	0,32±0,13	***0,16±0,33	***0,21±0,32
	ЭС	1,65±0,38	**1,14±0,12	***0,87±0,14

Примечание: (*) – статистическая значимость различий относительно контрольной группы: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$.

Состав ацильных фрагментов молекул ТАГ поджелудочной железы у крыс опытных групп характеризовался снижением миристиновой и пальмитиновой кислот и замещением на стеариновую и олеиновые кислоты, содержание которых значительно повышалось по сравнению с интактной группой. У крыс опытной группы 1 химическая структура ТАГ пищеварительной железы имела пониженное содержание арахидоновой кислоты, в том числе доля ее метаболита - докозатетраеновой кислоты не идентифицировалась на спектрах при ГЖ/МС анализе. Относительное содержание n-3 ПНЖК, таких как 18:3n3, 20:5n3, 22:5n3, 22:6n3, уменьшалось в ТАГ поджелудочной железы на протяжении всего эксперимента.

Развитие неалкогольного стеатопанкреатита значительным образом сказалось на молекулярной структуре эфиров стеролов (ЭС). Среди молекулярных видов ЭС в ткани поджелудочной железы опытных крыс преобладали молекулы с 14:0, 18:0, 18:1n9 ацильными заместителями. У крыс с 12-недельной НЖБ ПЖ в ЭС снижалась эстерификация 16:0, 18:3n6, 18:3n3, 20:3n9, 20:4n6, 22:6n3 и ее предшественника 22:5n3. Логичным итогом уменьшения доли молекул ЭС с арахидоновой кислотой (20:4n6) стало отсутствие эфиров стеролов с ацильным заместителем в виде докозатетраеновой кислоты (22:4n6). Через 24 недели развития неалкогольного стеатопанкреатита доля ЭС с эссенциальной линолевой кислотой (18:2n6) снижалась в 1,5 раза по сравнению с интактной группой, что, соответственно, сказалось на уменьшении уровня всех n-6 ПНЖК данного метаболического ряда, эстерифицированных в стеролы.

Обобщая результаты исследования состава ацильных заместителей липидных фракций

поджелудочной железы крыс при НЖБ ПЖ, можно выделить ключевые особенности молекулярной структуры ГФЛ, ТАГ и ЭС. Установлено, что уже на начальных этапах жирового повреждения ПЖ происходит существенная перестройка химической структуры всех субклассов липидов с последующим прогрессированием нарушения липидома ткани поджелудочной железы. Во всех исследуемых полярных и нейтральных липидах ПЖ происходит преимущественная эстерификация стеариновой и олеиновой кислот, тогда как доля большинства ПНЖК уменьшалась. Доля миристиновой кислоты значительно возрастала в ЭС на всех этапах эксперимента и в ГФЛ через 12 недель развития НЖБ ПЖ. Интересно, что в ТАГ доля всех исследуемых насыщенных ЖК значительно уменьшалась. В ГФЛ происходила переэстерификация n-3 и n-6 ПНЖК на кислоты из семейства n-9 ЖК. Перенагрузка глицерофосфолипидов и эфиров стеролов насыщенными жирными кислотами создает основу для липоэндотоксинемии, панкреонекроза и воспалительной инфильтрации. Известно, что в норме основными носителями насыщенных и моноеновых кислот являются ТАГ, тогда как ГФЛ и ЭС преимущественно эстерифицируются ПНЖК [12; 13]. При этом в формировании молекулярной структуры сложных липидов играют роль не только экзогенные, алиментарные факторы, но и эндогенные факторы, такие как активность ферментов синтеза жирных кислот и липидных макромолекул [14].

Заключение. Анализ результатов исследования показал, что развитие экспериментального хронического стеатопанкреатита характеризуется нарушением процессов эстерификации и синтеза ацильных фрагментов, что приводит к изменению молекулярной структуры основных липидных макромолекул, способствуя тем самым дестабилизации клеточных мембран и формированию некротического повреждения. Причем патологические изменения молекулярной структуры полярных и нейтральных липидов проявляются на ранней стадии развития жировой болезни ПЖ и прогрессируют при стеатопанкреатите. Таким образом, нарушение гомеостаза ацильных заместителей в основных субклассах липидов может являться одной из причиной деструктивно-патологических механизмов развития стеатопанкреатита.

Список литературы

1. Косюра С.Д., Павловская Е.В., Стародубова А.В., Строкова Т.В., Красилова А.А., Поленова Н.В. Поражение поджелудочной железы при ожирении // Лечебное дело. 2016. № 3. С. 100-104.
2. Бацков С.С., Инжеваткин Д.И., Пронина Г.А. Хронический неалкогольный стеатопанкреатит как продвинутая стадия течения неалкогольной жировой болезни

поджелудочной железы у ликвидаторов последствий аварии на Чернобыльской АЭС // Медико-биологические и социально-психологические проблемы безопасности в чрезвычайных ситуациях. 2016. № 1. С. 15-20.

3. Tariq H., Nayudu S., Akella S., Glandt M., Chilimuri S. Non-Alcoholic Fatty Pancreatic Disease: A Review of Literature. *Gastroenterology Res.* 2016. vol. 9. no 6. P. 87-91. DOI:10.14740/gr731w.

4. Della Corte C., Mosca A., Majo F., Lucidi V., Panera N., Giglioni E., Monti L., Stronati L., Alisi A., Nobili V. Nonalcoholic fatty pancreas disease and Nonalcoholic fatty liver disease: more than ectopic fat. *Clin. Endocrinol (Oxf)*. 2015 vol. 83. No. 5. P. 656-662. DOI: 10.1111/cen.12862.

5. Kawai T., Autieri M.V., Scalia R. Adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction in obesity. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2021. vol. 320. no. 3. [Электронный ресурс]. URL: <https://journals.physiology.org/doi/abs/10.1152/ajpcell.00379.2020?journalCode=ajpcell>. (дата обращения: 10.10.2021). DOI: 10.1152/ajpcell.00379.2020.

6. Denisenko Yu.K., Kytikova O.Yu., Novgorodtseva T.P., Antonyuk M.V., Gvozdenko T.A., Kantur T.A. Lipid-induced mechanisms of metabolic syndrome. *J. Obesity*. 2020. no 5762395. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7491450/> (дата обращения: 10.10.2021). DOI: 10.1155/2020/5762395.

7. Fraulob J.C., Ogg-Diamantino R., Fernandes-Santos C., Aguila M.B., Mandarim-de-Lacerda C.A. A mouse model of metabolic syndrome: insulin resistance, fatty liver and non-alcoholic fatty pancreas disease (NAFPD) in c57bl/6 mice fed a high fat diet. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 2010. vol. 46. no 3. P. 212-223.

8. Долгушина М.В., Васильева Л.С., Малиновская Н.А. Практическая гистология. Гистохимия. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2021. 96 с.

9. Bligh E.G., Dyer W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 1959. vol. 37. no 8. P. 911-917.

10. Carreau J.P., Duback J. P. Adaptation of a macroscale method to the microscale for fatty acid methyl transesterification of biological lipid extract. *J. Chromatogr.* 1978. vol.151. no3. P. 384-390.

11. Stransky K., Jursik T., Vitek A., Skorepa J. An improved method of characterizing fatty acids by equivalent chain length values. *J. High. Res. Chromatogr.* 1992. vol.15. P. 730-740.

12. Новгородцева Т.П., Караман Ю.К., Жукова Н.В. Модификация состава жирных кислот полярных и нейтральных липидов крови и ткани печени крыс в условиях пролонгированной высокожировой диеты // Биомедицинская химия. 2013. Т. 59. вып. 6. С. 644-654.

13. Zhukova N.V., Novgorodtseva T.P., Denisenko Yu.K. Effect of the prolonged high-fat diet on the fatty acid metabolism in rat blood and liver. *Lipids in health and disease*. 2014. no.13(49). P. 13-

49.

14. Кытикова О.Ю., Новгородцева Т.П., Денисенко Ю.К., Ковалевский Д.А. Метаболические и генетические детерминанты нарушения липидного обмена при неалкогольной жировой болезни печени // РЖГГК. 2020. Т.30. №.2. С. 15-25.