

УДК: 616-089+616.447

DOI: <https://doi.org/10.25040/aml2019.04.011>

ВПЛИВ РІВНЯ ПРОДУКТІВ ОКИСНОЇ МОДИФІКАЦІЇ БІЛКІВ ТА ФЕРМЕНТІВ АНТИОКСИДАНТНОГО ЗАХИСТУ НА ПРОЦЕС ВИНИКНЕННЯ ПІСЛЯОПЕРАЦІЙНОГО ГІПОПАРАТИРЕОЗУ

Пасько А.Я.

ДВНЗ "Івано-Франківський національний медичний університет", м. Івано-Франківськ
Кафедра хірургії стоматологічного факультету ІФНМУ (зав. - д.мед.н., проф. Пуптюк О.В.)

Реферат

Мета. Покращити результати лікування і профілактики післяопераційного гіпопаратиреозу шляхом врахування патогенетичних універсальних механізмів пошкодження клітин і процесів захисту їх життєдіяльності на основі аналізу оперованих пацієнтів з патологією щитоподібної залози, а також довести необхідність призначення в післяопераційному періоді препаратів, які мають антигіпоксанти-антиоксидантну дію.

Матеріал і методи. В основу дослідження покладено результати комплексного обстеження і лікування 70 осіб з різною патологією ЩЗ, які перебували на стаціонарному лікуванні в хірургічному відділенні Івано-Франківської центральної міської клінічної лікарні та в Івано-Франківському Прикарпатському онкологічному диспансері з 2014 по 2017 роки. Серед обстежених хворих було 46 жінок (65,7%) та 24 чоловіків (34,3%). У 26 із 70 хворих (37,1%) була проведена гемітиреоїдектомія, у 16 із 70 хворих (22,9%) - субтотальна резекція долі ЩЗ, в 14 із 70 хворих (20,0%) - тиреоїдектомія, у 14 із 70 хворих (20,0%) - тиреоїдектомія із центральною та периферичною лімфодисекцією. Визначення продуктів окисної модифікації білків в сироватці крові проводили за допомогою реакції білків з 2,4-динітрофенілгідразином. Оптичну густину реєстрували на спектрофотометрі СФ-16. Визначення каталази проводили за методом А.Баха і С. Зубкової. Статистичне опрацювання отриманих результатів проводили з використанням стандартного пакету програм "Statistica 6.0 for Windows" (StatSoft, США).

Результати й обговорення. У результаті дослідження встановлено, що дисбаланс систем активні форми кисню - антиоксидантного захисту виникає у всіх пацієнтів в післяопераційному періоді, проте патологічний процес значно поглиблюється у хворих з наявністю ознак гіпопаратиреозу після операції. Порушення балансу систем перекисного окислення ліпідів - окисної модифікації білків з одного боку і системи антиоксидантного захисту з іншого боку виявляються вже починаючи з першої доби після операції і посилюються на 3 добу, а при відсутності корекції значним є і на 7 добу післяопераційного періоду. Перспективним напрямком комплексної терапії хворих з ознаками післяопераційного гіпопаратиреозу є застосування препаратів з антиоксидантною дією. Тому в післяопераційному періоді у хворих, оперованих з

приводу захворювань щитоподібної залози, простежується підвищення продуктів окисної модифікації білків і перекисного окислення ліпідів на тлі зниження ферментів каталази, супероксиддисмутази, церулоплазміну.

Висновки. У післяопераційному періоді у хворих, оперованих з приводу захворювань щитоподібної залози простежується підвищення продуктів окисної модифікації білків на тлі зниження ферментів антиоксидантного захисту. Встановлено, що дисбаланс систем окисна модифікація білків-антиоксидантний захист поглиблюється у хворих з наявністю ознак гіпопаратиреозу. Встановлено, що максимальне підвищення продуктів окисної модифікації білків відбувається у хворих на 1-шу добу післяопераційного періоду, тоді як максимальне зниження ферментів антиоксидантного захисту відзначається у хворих на 6-7 добу, що вказує на важливу роль окисного стресу у патогенезі післяопераційного гіпопаратиреозу. Застосування препаратів з антиоксидантно-антигіпоксантиною дією, а саме препарату Цитофлавін в ранньому післяопераційному періоді, є перспективним напрямком комплексної терапії хворих з ознаками післяопераційного гіпопаратиреозу.

Ключові слова: гіпопаратиреоз, окисна модифікація білків, каталаза, супероксиддисмутаза

Abstract

THE INFLUENCE OF THE LEVEL OF PRODUCTS OF OXIDAL MODIFICATION OF PROTEINS AND ENZYMES OF ANTIOXIDANT PROTECTION ON THE PROCESS OF POST-OPERATION HYPOPARATHYROIDISM

PASKO A.Ya.

SHEI "Ivano-Frankivsk National Medical University",
Ivano-Frankivsk

Aim. To improve the results of treatment and prophylaxis of postoperative hypoparathyroidism by considering pathogenetic universal mechanisms of cell damage and processes of protection of the cells vital functions on the basis of the analysis of operated patients with pathology of the thyroid gland, as well as to prove the necessity of the prescription of preparations with antihypoxant-antioxidant action in the postoperative period.

Material and Methods. The research is based on the results of a comprehensive examination and treatment of

70 patients with different thyroid gland pathology who were inpatients at the Surgery Department of the Ivano-Frankivsk Central City Clinical Hospital and at the Ivano-Frankivsk Precarpathian Cancer Dispensary from 2014 to 2017. Among the examined patients there were 46 women (65.7%) and 24 men (34.3%). Hemithyroidectomy was performed in 26 out of 70 patients (37.1%), in 16 out of 70 patients (22.9%) - subtotal resection of thyroid gland lobe; in 14 out of 70 patients (20.0%) - thyroidectomy; in 14 out of 70 patients (20.0%) - thyroidectomy with central and peripheral lymph node dissection. Determining of the products of oxidative modification of proteins in blood serum was performed by reaction of proteins with 2,4-dinitrophenylhydrosine. The optical density was recorded using a spectrophotometer SF-16. Determination of catalase was performed using the method of A. Bakh and S. Zubkova. The statistical processing of the obtained results was performed using the standard program package "Statistica 6.0 for Windows" (StatSoft, USA).

Results and Discussion. As a result of the study it was determined that an imbalance of systems of active forms of oxygen - antioxidant protection occurred in all patients in the postoperative period, but the pathological process was significantly deepened in patients with signs of hypoparathyroidism after surgery. Disturbance of the balance of peroxidation systems of lipid-oxidative modification of proteins on the one hand and antioxidant defense systems on the other hand were detected from the first day after the operation and were increased during the 3rd day, and in the absence of correction, they were significant during the 7th day of the postoperative period. A promising direction of complex therapy in patients with signs of postoperative hypoparathyroidism was the use of medicines with antioxidant effect. Therefore, in the postoperative period in patients operated for thyroid diseases, an increase in the products of the oxidative modification of proteins and lipid peroxidation, along with the reduction of catalase enzymes, superoxide dismutase, ceruloplasmin, was observed.

Conclusions. In the postoperative period in patients operated on for thyroid gland diseases, the increase of oxide modification of proteins (OMP) products against the background of reduction of enzymes of antioxidant defense (AOD) could be traced. It was determined that imbalance of OMP-AOD system deepened in patients with presence of signs of hypoparathyroidism. It was determined that the maximum increase in OMP products occurred in patients within the 1st day of post-operative period, while the maximum decrease in AOD enzymes was observed in patients during the 6th-7th days, indicating an important role of oxidative stress in the pathogenesis of post-operative hypoparathyroidism. The use of drugs with antioxidant-antihypoxant action, namely the drug Citoflavin in the early postoperative period is a promising area of complex therapy for patients with signs of postoperative hypoparathyroidism.

Keywords: hypoparathyroidism, oxide modification of proteins, catalase, superoxide dismutase

Вступ

Технічно складні хірургічні втручання через анатомічне взаємовідношення щитоподібної залози (ЩЗ) з органами ший [7, 12] є надзвичайно важливим моментом в хірургії цього органа - збереження неушкодженими нерви гортані і прищитоподібні залози (ПЩЗ) [5, 9], а також профілактика їх післяопераційної гіпофункції.

Післяопераційний гіпопаратиреоз (ГПРТ), частота якого коливається від 0,5% до 4,8% у вузькоспеціалізованих хірургічних медичних закладах і до 63% у загально-хірургічних стаціонарах є найчастішим ускладненням [2, 10]. За рахунок травматизації ПЩЗ, особливо при розширених оперативних втручаннях на щитоподібній залозі з одночасною лімфодисекцією, відбувається порушення кровопостачання та інервації ПЩЗ, що призводить до ішемії та гіпоксії цих залоз [11].

У пошкоджених ПЩЗ відбувається активація процесів вільнорадикального окиснення, як універсального біологічного механізму пошкодження живих тканин [4, 10]. Нині інтерес дослідників підвищився до вивчення механізмів взаємодії АФК з не тільки з ліпідами, але і з білками, що веде відповідно до більш глибоких та часто незворотніх процесів пошкодження та порушення функції органів. Загальновідомо, що при низці патологічних станів саме білки, а не ліпіди та нуклеїнові кислоти, є ефективними пастками генерованих АФК, і їх окисна модифікація розглядається як один із ранніх і надійних маркерів оксидативного стресу [3, 6]. Встановлено, що за умов окисного стресу і надмірної генерації АФК розвиваються процеси неконтрольованої модифікації білків, які спричиняють фрагментацію білків, їх денатурацію, а також утворення первинних амінокислотних радикалів, що далі вступають у вторинну взаємодію із сусідніми амінокислотними залишками, а це в цілому створює досить складну картину дії АФК на білкові макромолеку-

ли. Все це призводить до втрати білками їхньої біологічної активності і порушення обмінних, зокрема регенеративних процесів [3, 6, 10]. На думку дослідників, кисневозалежне окиснення білків є раннім індикатором пошкодження органів і тканин, а процеси ОМБ при всіх патологічних станах повинні перебувати під безперервним лабораторним контролем [4, 10].

Водночас, для знешкодження негативної дії АФК на мембрани клітин, в організмі існує та функціонує антиоксидантна система (АОС) захисту, що об'єднує у своєму понятті декілька етапів знешкодження надлишків АФК: знешкодження кисневих радикалів (супероксиддисмутаза (СОД, церулоплазмін, токоферол та інші), інгібування впливу перекисів на мембранні структури (пероксидази, каталаза (К)): ензимне відновлення гідроперекисів, мембранозв'язаних білків та ліпідів [1, 6, 10].

Отже, в цілому, функціонування АОС захисту, з одного боку, є складовою неспецифічного захисту клітин та тканин від шкідливого та руйнівного впливу АФК, з іншого - разом з оцінкою активності процесів ОМБ - є однією з складових характеристик клітинного імунітету [6].

Матеріал і методи

В основу дослідження покладено результати комплексного обстеження і лікування 70 осіб з різною патологією ЩЗ, які перебували на стаціонарному лікуванні в хірургічному відділенні Івано-Франківської центральної міської клінічної лікарні та в Івано-Франківському Прикарпатському онкологічному диспансері з 2014 по 2017 роки. Серед обстежених хворих було 46 жінок (65,7%) та 24 чоловіків (34,3%). у 26 із 70 хворих (37,1%) була проведена гемітиреоїдектомія, у 16 із 70 хворих (22,9%) - субтотальна резекція долі ЩЗ, в 14 із 70 хворих (20,0%) - тиреоїдектомія, у 14 із 70 хворих (20,0%) - тиреоїдектомія із центральною та периферичною лімфодисекцією.

Визначення продуктів ОМБ в сироватці крові проводили за допомогою реакції біл-

ків з 2,4-динітрофенілгідразином (2,4-ДФГ). Оптичну густину утворених динітрофенілгідразонів реєстрували на спектрофотометрії СФ-16.

Для аліфатичних кетон-динітрофенілгідразонів нейтрального характеру спектр поглинання 353-377 нм, основного характеру - 430-434 і 524-535 нм. 2,4-динітрофенілгідразони, які утворилися, реєстрували при наступних довжинах хвиль: 356, 370, 430 і 530 нм [8].

Принцип визначення К за А. Бахом і С. Зубковою базувався на тому, що до проби, яка містить фермент, додають певну кількість перекису водню і після певного інтервалу часу за допомогою титрування перманганатом калію встановлюють кількість незруйнованого перекису. Каталазне число крові здорової дорослої людини коливається в межах 9,52-12,92 мг перекису водню на 1 мл крові ($\text{мгH}_2\text{O}_2 / \text{мл}$) [8, 10].

Принцип визначення СОД базується на відновленні нітротетразолія супероксидними радикалами, які утворюються при реакції між феназинметасульфатом і відновленою формою нікотинаміддинуклеотида ($\text{NAD} \cdot \text{H}$). Один процент блокування утворення нітроформазана ми приймали за 1 умовну одиницю (ум.од.). Активність СОД здорової людини коливається від 60 до 80 ум. од. [8].

Статистичне опрацювання отриманих результатів проводили з використанням стандартного пакету програм "Statistica 6.0 for Windows" (StatSoft, США). Розподіл кожної з досліджуваних змінних був перевірений "на нормальність" методом Шапіро-Вілкса. Для опису змінних із нормальним розподілом використовували середнє арифметичне значення (M) та середнє квадратичне відхилення (ζ). Опис змінних, розподіл яких відрізнявся від нормального, здійснено за допомогою медіани (Me) та нижнього і верхнього квантилів (q_1 і q_3). Оцінка вірогідності розбіжностей середніх величин для вибірок із нормальним розподілом проведена з використанням критерію Стюдента. При порівнянні у двох незалежних групах показників, розподіл яких не відповідав закону нормальності, викорис-

тано критерій Манна-Уїтні. Критичний рівень значущості (p) при перевірці статистичних гіпотез у даному дослідженні приймали рівним 0,05.

Результати й обговорення

Оскільки процеси ОМБ відіграють ключову роль в молекулярних механізмах окислявального стресу і є пусковими факторами окислювальної деструкції інших молекул (ліпіди, ДНК) дослідження даних показників набуває пріоритетного значення.

Про інтенсивність процесів пероксидації білків судили за оптичною густиною аліфатичних альдегідо- і кетонітротрофенілгідрозонів нейтрального і основного характеру (ОМБ₃₅₆, ОМБ₃₇₀, ОМБ₄₃₀, ОМБ₅₃₀).

Встановлено, що у хворих після операції на ЩЗ відбувається вірогідне зростання інтенсивності ОМБ. Ми виявили, що початковий рівень аліфатичних альдегідо- і кетонітротрофенілгідрозонів основного характеру був нижчим, ніж нейтрального. Виявлено вірогідне зростання ОМБ₃₅₆ та ОМБ₃₇₀ у хворих без ознак ГПТ - в 1,62 та в 1,66 рази, ОМБ₄₃₀ та ОМБ₅₃₀ - в 2,22 та 1,67 рази в порівнянні з контролем ($p < 0,05$). Проте, ми відзначили вірогідно вищі показники ОМБ у хворих з ознаками ГПТ у порів-

нянні з хворими без ознак ГПТ, так ОМБ₃₅₆ та ОМБ₃₇₀ у хворих на СДС з МК - в 1,26 та в 1,31 рази, ОМБ₄₃₀ та ОМБ₅₃₀ - в 1,39 та 2,59 рази ($p < 0,05$) (табл.1). Таким чином, у пацієнтів оперованих з приводу захворювань ЩЗ відмічено підвищення процесів ОМБ, що є захисною реакцією та призводить до руйнування патологічно змінених білків з наступним виведенням їх з організму. Однак, при пролонгації активності ОМБ відбувається їх денатурація, руйнування ферментних систем та лізис клітини, що у свою чергу може сприяти пошкодженню клітин ПЩЗ [6, 11].

Вивчення механізмів функціонування АОС дає можливість регулювати процеси перекисного окислення ліпідів та ОМБ. АОС включає високомолекулярні (СОД, глутатіонпероксидаза і каталаза, глутатіонредуктаза та глутатіонзалежні трансферази) і низькомолекулярні антиоксиданти (відновлений глутатіон, вітаміни Е, С, А і каротиноїди та ін.) [6]. СОД є внутрішньоклітинним ферментом, який бере участь у реакціях дисмутації супероксидного аніон-радикала. К каталізує розщеплення пероксиду водню, який утворюється в результаті дії СОД і органічних гідропероксидів ліпідів [10].

Ми провели визначення стану АОС у хворих оперованих з приводу захворювань

Таблиця 1

Показники окислювальної модифікації білків у хворих оперованих з приводу захворювань ЩЗ, $M \pm \zeta$

Довжина хвилі, нм	Контрольна група (n=25) од. опт. густ.	Хворі без ознак ГПТ (n=17) од. опт. густ.	Хворі з ознаками ГПТ (n=53) од. опт. густ.
ОМБ ₃₅₆	1,158±0,234	1,878±0,143 $p < 0,01$	2,378±0,224 $p < 0,001$ $p_1 < 0,05$
ОМБ ₃₇₀	1,221±0,118	2,025±0,203 $p < 0,05$	2,646±0,274 $p < 0,001$ $p_1 < 0,05$
ОМБ ₄₃₀	0,561±0,119	1,245±0,185 $p < 0,05$	1,725±0,212 $p < 0,001$ $p_1 < 0,05$
ОМБ ₅₃₀	0,104±0,027	0,174±0,018 $p < 0,05$	0,451±0,025 $p < 0,01$ $p_1 < 0,05$

p - вірогідність різниці показників ОМБ у хворих оперованих з приводу захворювань ЩЗ з та без ознак ГПТ у порівнянні з групою контролю;

p_1 - вірогідність різниці показників ОМБ у хворих оперованих з приводу захворювань ЩЗ з ознаками ГПТ у порівнянні з хворими без ознак ГПТ;

n - кількість хворих

Таблиця 2

Вміст каталази та супероксиддисмутази у сироватці крові хворих оперованих з приводу захворювань ШЗ, Ме (q_1 ; q_3)

Показник	Контрольна група n=25	Хворі без ознак ГПТ, n=17	Хворі з ознаками ГПТ n=53
К, мг H_2O_2 / мл	11,82 (10,42; 12,45)	8,07 (7,58; 8,87) $p<0,01$	5,23 (4,54; 5,93) $p<0,001$ $p_1<0,001$
СОД, ум. од.	67,00 (65,45; 68,56)	43,45 (38,68; 46,47) $p<0,001$	27,45 (18,72; 36,14) $p<0,001$ $p_1<0,001$

p - вірогідність різниці показників ОМБ у хворих оперованих з приводу захворювань ШЗ з та без ознак ГПТ у порівнянні з групою контролю;

p_1 - вірогідність різниці показників ОМБ у хворих оперованих з приводу захворювань ШЗ з ознаками ГПТ у порівнянні з хворими без ознак ГПТ;

n - кількість хворих

ШЗ (табл. 2).

Встановлено вірогідне зниження ферментів АОС у хворих оперованих на ШЗ, як з, так і без наявності ознак ГПТ. Так, рівень К у хворих без ознак ГПТ був нижчий у 1,46 разів, а СОД - у 1,54 рази в порівнянні з контролем ($p<0,01$; $p<0,001$). Також відзначали вірогідно нижчі показники ферментів АОС у групі хворих з наявністю ознак ГПТ, так, рівень К був нижчий у 1,54 рази, а СОД - у 1,58 разів в порівнянні з групою хворих без ознак ГПТ ($p_1<0,01$; $p_1<0,001$).

Ми проаналізували залежність рівня продуктів ОМБ від часу, який пройшов після операції.

Отримані результати вказують, що вміст продуктів ОМБ найбільше зростає у

хворих одразу після операції. На 6-7 добу рівень продуктів ОМБ наближався до значень групи норми (рис. 1).

Аналізуючи активність системи АОЗ залежно від ступеня МК, можна стверджувати, що при збільшенні часу післяопераційного періоду відбувається зниження рівнів антиоксидантних ферментів (рис. 2).

Так, порівняно з контролем, рівень К і СОД у хворих на 1-шу добу вірогідно був вищим в порівнянні з іншими групами ($p<0,05$). Рівень К і СОД вірогідно відрізнявся у всіх групах ($p<0,05$) і зменшувався із збільшенням термінів післяопераційного періоду. Безумовно, це є реакцією на тривале підвищення вільнорадикальних процесів, яке призводить до виснаження ферментів АОЗ організму.

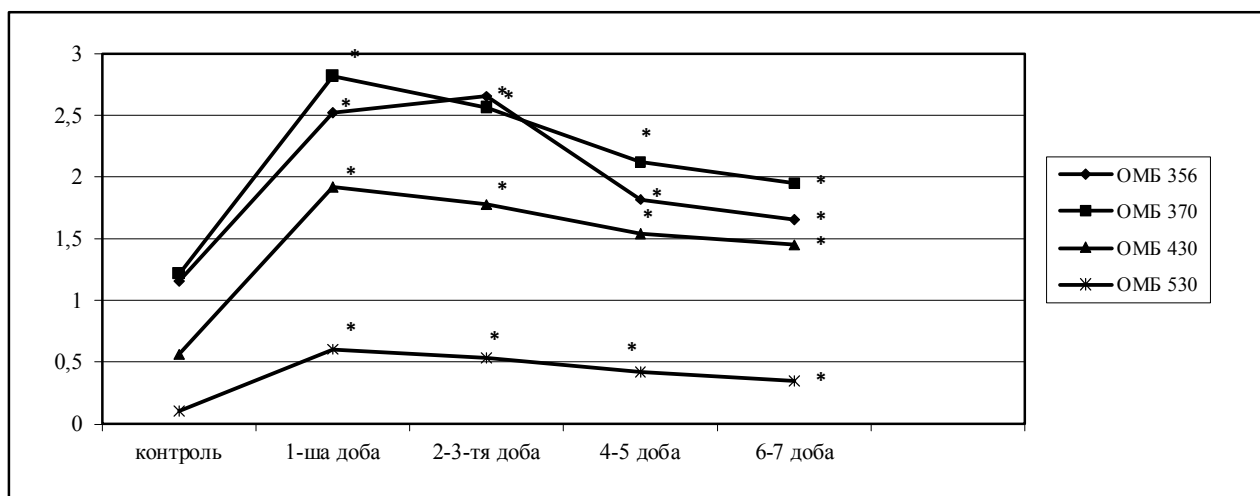


Рис. 1

Показники ОМБ залежно від доби післяопераційного періоду.

* - вірогідність різниці порівняно із групою контролю ($p<0,05$)

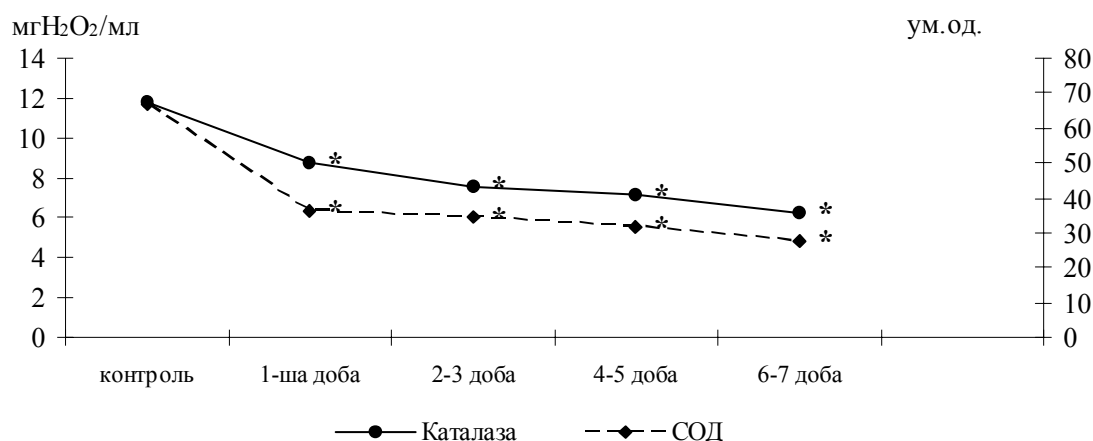


Рис. 2

Показники АОЗ залежно від доби післяопераційного періоду.

* - вірогідність різниці порівняно із групою контролю ($p < 0,05$)

Висновки

1. У післяопераційному періоді у хворих, оперованих з приводу захворювань щитоподібної залози простежується підвищення продуктів окисної модифікації білків на тлі зниження ферментів антиоксидантного захисту. Встановлено, що дисбаланс системи окисна модифікація білків-антиоксидантний захист поглиблюється у хворих з наявністю ознак гіпаратиреозу.
2. Максимальне підвищення продуктів окисної модифікації білків відбувається у хворих на 1-шу добу післяопераційного періоду, тоді як максимальне зниження ферментів антиоксидантного захисту відзначається у хворих на 6-7 добу, що вказує на важливу роль окисного стресу у патогенезі післяопераційного гіпаратиреозу.
3. Застосування препаратів з антиоксидантною-антигіпоксантаю дією, а саме препарату Цитофлавін в ранньому післяопераційному періоді, є перспективним напрямком комплексної терапії хворих з ознаками післяопераційного гіпаратиреозу.

Література

1. Buryak O.H. Diagnostic value of the indices of oxidative modification of proteins for the diagnostics of respiratory failure in critically ill newborns. *Sovremennaya pediatriya* 2011; 6: 100-102. Ukrainian (Буряк О. Г. Діагностична значимість показників окисної модифікації білків в діагностиці дихальної недостатності у новонароджених при

критичних станах. Современная педиатрия 2011; 6: 100-102).

2. Zenkova A.V. Functioning of parathyroid before and after surgical treatment of thyroid. *Vesti OHU* 2010; 6: 74-77. Russian (Зенкова А.В. Состояние функции околощитовидных желез до и после хирургического лечения заболеваний щитовидной железы. Вести ОГУ 2010; 6: 74-77).
3. Zyn' A. Pro-oxidative and anti-oxidative homeostasis and membrane transport in living organisms. *Visnyk Lvivskoho Universytetu. Seriya Biologichna* 2012; 60: 21-36. Ukrainian (Зинь А. Прооксидантно-антиоксидантний гомеостаз і мембранний транспорт у живих організмах. Вісник Львівського університету. Серія біологічна 2012; 60: 21-36).
4. Kalinina A.P. Methods of visualizing of parathyroid and parathyroid surgery: guide for doctors. M.: VIDAR-M; 2010. Russian (Калинина А.П. Методы визуализации околощитовидных желез и паратиреоидная хирургия: руководство для врачей. М.: ВИДАР-М; 2010).
5. Kusnetsov N.S., Simakina O.V., Kim I.V. Predictors of post-operational hypoparathyreosis after thyroidectomy and methods of its treatment. *Klinicheskaya i eksperimentalnaya tireodolohiya* 2012; 2: 20-27. Russian (Кузнецов Н. С., Симакина О. В., Ким И. В. Предикторы послеоперационного гипопаратиреоза после тиреоидэктомии и методы его лечения. Клиническая и экспериментальная тиреодология 2012; 2: 20-27).
6. Rybakov S. Y., Shydlovskiy V.O. Thyroid surgery. Ternopil: TDMU Ukrmedknyha; 2008. Ukrainian (Рибаків С.Й., Шидловський В.О. Тиреоїдна хірургія. - Тернопіль: ТДМУ Укрмедкнига; 2008).
7. Roy van Zuidewijn D. B. de [et al.] Complications of thyroid surgery. *Ann. Surg. Oncol* 2010; Vol. 2: 56-60.
8. Bures C., Klatte T., Friedrich G. et al. Guidelines for complications after thyroid surgery: pitfalls in

- diagnosis and advices for continuous quality improvement. *Eur Surg* 2014; 46: 38-47.
9. Prevalence and incidence of hypoparathyroidism in the United States using a large claims database / J. Powers, K. Joy, A. Ruscio // *J Bone Miner Res.* - 2013. - Vol. 28 (12). - P. 2570
6. 10. Relationship between hypoparathyroidism and the number of parathyroid glands preserved during thyroidectomy / M. S. Chang, H. J. Joo, B. J. Yong [et. al.] // *World J. Surg. Oncol.* 2014. Vol. 12. P. 200-210.