

УДК 616-092+616.24+616.37-002+616-08
DOI:10.24061/2413-0737/XXI.2.82.2.2017.70

В.В. Черкасова

РОЛЬ ОКИСНОЇ МОДИФІКАЦІЇ БІЛКІВ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ГОСТРОМУ ПАНКРЕАТИТІ ТА ЗА УМОВ КОРЕКЦІЇ ДЕКСАМЕТАЗОНОМ

ДВНЗ «Івано-Франківський національний медичний університет»

Резюме. У статті представлені результати дослідження, проведеного на 82 білих щурах-самцях лінії Вістар масою 180-220 г, яким було змодельовано гострий панкреатит (ГП) та проведено дексаметазонову корекцію. У крові та гомогенаті легень тварин через 12, 24 та 48 годин визначали процеси окисної модифікації білків (ОМБ) для оцінки інтенсивності оксидативного стресу.

Встановлено, що при експериментальному ГП розвивається ферментемія та загальна відповідь на запалення з утворенням великої кількості вільних радика-

лів, які накопичуються в легенях та можуть спричинити незворотні зміни.

Доведено, що при введенні дексаметазону на початкових етапах розвитку ГП відбувається сповільнення процесів ОМБ, тоді як відтерміноване введення препарату не супроводжується достовірним зниженням окисних процесів у крові та гомогенаті легень.

Ключові слова: гострий панкреатит, окисна модифікація білків, щури.

Вступ. Захворювання підшлункової залози (ПЗ) за поширеністю і впливом на формування показників тимчасової та постійної непрацездатності населення становлять важливу соціально-економічну проблему. Крім того, гострий деструктивний панкреатит – одне із найбільш тяжких захворювань ПЗ, яке за частотою нещодавно посідало третє місце після гострого апендициту й гострого холециститу [2].

Відомим є факт, що ГП є гострим запальним процесом ПЗ, з можливим залученням інших тканин або органів, зокрема легень. Згідно з класифікацією (Атланта), є дві форми гострого панкреатиту: легкого і тяжкого ступеня. Так, ГП легкого ступеня характеризується інтерстиціальним набряком залози, у той час як тяжкий перебіг викликає некроз частини ПЗ і пов'язаний з органною недостатністю і місцевими ускладненнями, такими, як утворення псевдокіст або абсцесу ПЗ [13].

Тяжкий ГП розвивається приблизно у 20 % пацієнтів із даною патологією та має високий рівень смертності, яка сягає 55 %. За результатами досліджень багатьох авторів значна летальність на ранніх стадіях пояснюється розвитком полісистемної відмови органів (ПСВО), зокрема серцево-легеневою недостатністю [11].

Ранній тяжкий ГП визначається наявністю щонайменше відмови одного органа під час надходження пацієнта до лікарні. Так, ПСВО розвивається або прогресує, незважаючи на лікування у відділеннях інтенсивної терапії майже у 80% пацієнтів. Рівень смертності в цій групі становить 42 % порівняно з 12 % у пацієнтів без поліорганної недостатності [12]. Гострий панкреатит тяжкого перебігу часто асоціюється із збільшенням проникності мікросудин, що призводить до великих втрат внутрішньосудинної рідини в тканини, тим самим зменшуючи перфузію легень, нирок та інших органів [14].

Дексаметазон (ДКМ) є синтетичним глюкокортикоїдом, який широко використовується в клінічній практиці. Глюкокортикоїди мають потужну протизапальну, імуносупресивну та проти-

алергічну дію. Цей стероїд впливає на всі стадії запального процесу. Знижує проникність кровоносних судин, гальмує міграцію лейкоцитів, фагоцитів, вивільнення кінінів, утворення антитіл. Внаслідок поширеної інгібуючої дії препарату на запальний процес його, зазвичай, використовують при багатьох захворюваннях органів дихання, у тому числі гострому легеневому ушкодженні (ГЛУ) і гострому респіраторному дистрес-синдромі (ГРДС) [7].

Одним із головних механізмів розвитку ГЛУ при ГП є ферментемія та розвиток синдрому системної запальної відповіді (ССЗВ). Активація нейтрофілів та альвеолярних макрофагів спричиняє масивне утворення вільних радикалів кисню, які ушкоджують альвеоло-капілярну мембрану та призводять до некардіогенного набряку легень [6].

У людському організмі в результаті окисно-відновних реакцій постійно відбувається генерація активних форм кисню, які викликають окисну модифікацію біополімерів: білків, ліпідів, нуклеїнових кислот, вуглеводів. При розвитку гострого запального процесу, наприклад ГП, впливу токсичних речовин чи продуктів некротизованих тканин тощо, посилюються окиснювальні процеси, порушується збалансованість антиоксидантної та прооксидантної систем, що веде до потенціації оксидативного стресу. Останній є однією з головних патогенетичних ланок бронхолегеневої патології. Вважається, що деструкція білків є надійнішим маркером окиснювальних ушкоджень тканин, ніж перекисне окиснення ліпідів (ПОЛ), оскільки продукти окисної модифікації білків (ОМБ) стабільніші, порівняно з пероксидами ліпідів, які швидко метаболізуються під дією пероксидаз та низькомолекулярних антиоксидантів [4].

Аналіз джерел літератури свідчить, що ОМБ впливає на показники ізоелектричної точки, термостабільності протеолітичної чутливості і призводить до втрати ферментативної активності. При цьому, відновлення окиснених білків практично не відбувається. Вони стають мішенню для

дії специфічних нейтральних та лужних протеаз, можливо і трипсину [3].

Мета дослідження. Встановити закономірності розвитку окисної модифікації білків при гострому L-аргінін індукованому панкреатиті та за умов дексаметазонової корекції.

Матеріал і методи. Дослідження проводилися на 82 білих щурах-самцях лінії Вістар масою 180-220 г, що утримувалися на стандартному раціоні з вільним доступом до води. Тварини були розподілені на 4 групи: I – інтактна група тварин (n=10); II – контрольна (n=10), – внутрішньо-очеревинно вводили фізіологічний розчин, з розрахунку 1 мл на 100 г маси щура; III – з моделлю гострого панкреатиту (n=32), IV – з експериментальним ГП та корекцією препаратом «Дексаметазон», («Дарниця», Київ, Україна) (n=30). Всі дослідження проводили під загальним знечуленням, з використанням кетаміну (40 мг/кг). Утримання тварин та маніпуляції проводилися відповідно до положень Закону України «Про захист тварин від жорстокого відношення» (N 1759-VI від 15.12.2009). Після закінчення експерименту всі тварини піддавалися евтаназії.

Експериментальний панкреатит відтворювали двома внутрішньоочеревинними ін'єкціями 20 % розчину L-аргініну в сумарній дозі 5 г/кг з одногодинним інтервалом. Розчин дексаметазону вводили внутрішньом'язово з розрахунку 1 мл на 1 кг. Препарат вводили тваринам із моделлю ГП за 1 годину до забору матеріалу (на 11, 23 та 47 год). Забір крові та для біохімічного дослідження проводили через 12, 24 та 48 годин від початку експерименту.

Процеси ОМБ у сироватці крові та гомогенаті легень вивчали методом спектрофотометричного аналізу карбонільних груп із використанням 2,4-динітрофенілгїдразину. Оптичну щільність утворених фенілгїдразонів реєстрували на спектрофотометрі за наступними довжинами хвиль: 356 нм – аліфатичні альдегїднітрофенілгїдрозони нейтрального характеру (АДНФГн), 370 нм – аліфатичні кетодінітрофенілгїдрозони нейтрального характеру (КДНФГн), 430 нм – аліфатичні альдегїднітрофенілгїдрозони основного характеру (АДНФГо), 530 нм – аліфатичні кетодінітрофенілгїдрозони основного характеру (КДНФГо) [3].

Екстракти легень отримували методом [1]. Біля 5,0 г легеневої тканини ретельно подрібнювали гострими ножицями на частинки 2x2 мм, гомогенізували у фарфоровій ступці, додаючи фізіологічного розчину у (1:10). Утворену 10 % суміш центрифугували при швидкості 3000 об/хв.

Отримані дані статистично обробляли із застосуванням непараметричних критеріїв на персональному комп'ютері за допомогою програми «Statistica 7» («Statsoft, Inc.» – США). Достовірність оцінювали за критерієм Вілкоксона та Sign-тесту. Відмінності вважались достовірними, якщо величина P становила 95 % і більше (p<0,05).

Результати дослідження та їх обговорення. Проведені біохімічні дослідження свідчать про

інтенсифікацію процесів ОМБ у сироватці крові (ОМБс) (рис. 1) та гомогенаті легень (ОМБг) (рис. 2) уже протягом перших 12 годин, на що вказують збільшення рівня АДНФГ та КДНФГ основного і нейтрального характеру (p<0,05) порівняно з контролем в усіх дослідних групах. Так, у III групі при дослідженні сироватки крові АДНФГн достовірно зростали в 1,7 раза, КДНФГн – в 1,8 раза, тоді як АДНФГо – у 2,5 раза, а КДНФГо – у 4,3 раза (p<0,05). Схожа тенденція спостерігалася і в гомогенаті легень: АДНФГн та КДНФГн достовірно перевищували результати здорових щурів у 2,1 та 1,8 раза, а АДНФГо та КДНФГо – аж у 4,5 та 6,7 раза відповідно. Більший приріст ОМБ основного характеру можна пояснити перенавантаженням організму тварин аргініном, однак схильність до потенціювання показників залишається.

У IV групі на 12-ту годину відзначався незначний приріст даних ОМБс (p>0,05) порівняно з контролем. Важливо відзначити, що при корекції дексаметазоном відзначалися нижчі показники порівняно із піддослідними щурами з ГП, так ОМБс: АДНФГн – на 29,5 % (p<0,05), КДНФГн – на 41,1 % (p<0,05), АДНФо – на 10,8 % (p>0,05) та КДНФГо – на 23,1 % (p>0,05). При дослідженні легеневого гомогенату IV групи показники ОМБг нейтрального характеру зростали незначно, тоді як основного характеру достовірно зростали у 3,2 (АДНФГо) та 4,3 (КДНФГо) раза відповідно порівняно з контролем. При зіставленні показників ОМБг при ГП та з корекцією ДМЗ на 12-ту годину визначено, що вони були нижчими: АДНФГн – на 44,5 % (p<0,05), КДНФн – на 19,8 % (p>0,05), АДНФГо – на 29,4 % (p<0,05), а КДНФо – на 35 % (p<0,05). Дубініною Е.Е. встановлено, що модифікація білкових молекул призводить до утворення додаткових карбонільних груп у бічних ланцюгах амінокислот [4]. Дане твердження яскраво корелює з даними результатів проведеного дослідження вже на 12-ту годину після відтворення експериментального панкреатиту. Варто відзначити, що хоча рівень ОМБ зростав як у сироватці крові, так і в гомогенаті легень тварин IV групи, проте корекція ДМЗ значно зменшила активність окисних процесів.

Найбільш виражені зміни щодо вмісту ОМБс та ОМБг відбувалися через 24 год (рис. 1 та рис. 2) від початку дослідження у тварин з експериментальним ГП. Встановлено достовірний їх приріст у сироватці крові, при цьому АДНФГн і КДНФГн – у 3,1 та 2,4 раза, а АДНФГо і КДНФГо – у 2,9 та 5 разів відповідно. Показники у легенях зростали таким чином: АДНФГн – у 4 рази (p<0,05), КДНФГн – у 4,6 раза (p<0,05), АДНФГо – аж у 10 (p<0,05) та КДНФГо – у 10,3 раза (p<0,05). Порівняно з попереднім етапом дослідження на 24-ту годину ГП показники окисних реакцій зростали дуже стрімко, особливо в легеневому гомогенаті. При цьому у щурів з проведеною корекцією ДКМ також відзначалася значна інтенсифікація процесів ОМБ у сироватці і

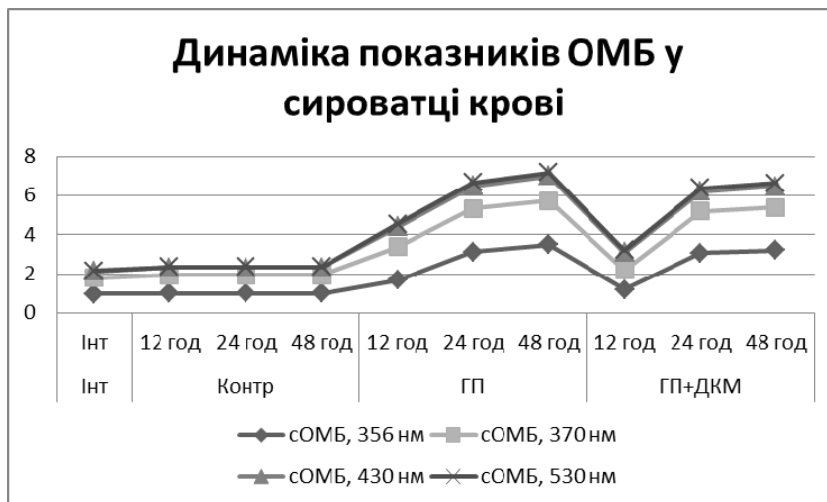


Рис. 1. Графічний аналіз рівня окисної модифікації білків (ОМБс) у щурів при експериментальному гострому панкреатиті

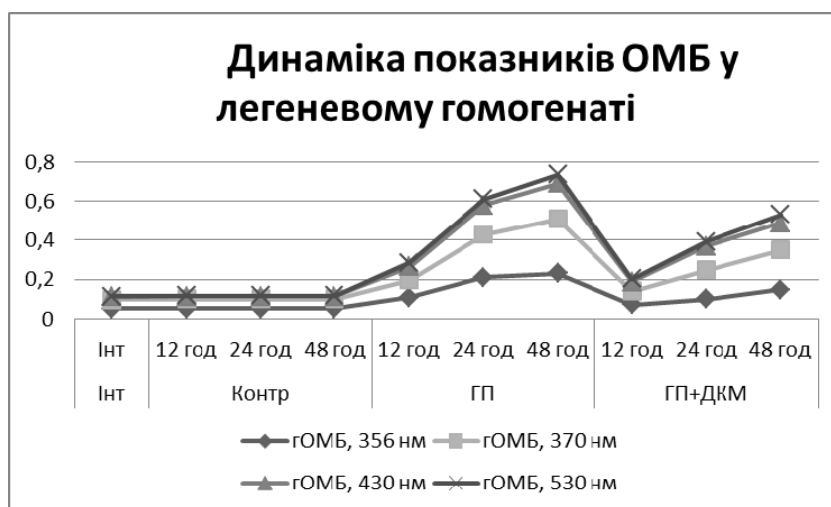


Рис. 2. Графічний аналіз рівня окисної модифікації білків (ОМБг) у щурів при експериментальному гострому панкреатиті

легенях. Порівняно з контролем IV група тварин достовірно продемонструвала сильний приріст окисних процесів: АДНФГн – у 3,1 раза, КДНФГн – 2,3 раза, АДНФГо – у 2,6 та КДНФГо – у 4,8 раза. У легенях відбувалися подібні зміни. Так, ОМБг при дексаметазонавій терапії вірогідно підвищувались: АДНФГн – на 90 %, КДНФГн – у 3,1 раза, АДНФГо – у 8 разів та КДНФГо – аж в 7,6 раза. Дані тенденції можуть свідчити про те, що при використанні дексаметазону на 24-ту годину, коли розвивається некротичний панкреатит, не має протективної дії препарату на легені. При порівнянні щурів у групах з ДМЗ корекцією на 12 і 24 години, чітко видно, що окиснення білків відбувається значно інтенсивніше з прогресуванням експериментального панкреатиту. Так, ОМБс збільшувалась: АДНФГн – у 2,6 раза ($p < 0,05$), КДНФГн – у 2,1 раза ($p < 0,05$), АДНФГо – на 14,9 % ($p > 0,05$) та КДНФГо – на 45,5 % ($p < 0,05$). Результати ОМБг давали схожі варіанти достовірного приросту: АДНФГн – на 37,5 %, КДНФГн – у 2,2 раза, АДНФГо – у 2,5 раза, а КДНФГо – на 76,9 %, порівняно з глюкокортикоїдною терапією на 12-ту годину ГП.

Отже, на 24-ту годину розвитку ГП, окиснення білкових молекул під дією активних форм кисню призводить до незворотного ушкодження мембранних структур, збільшення проникності альвеоло-капілярного бар'єру і загибелі клітин, таких, як альвеолоцити [5]. Можна припустити, що внаслідок незворотного ушкодження легень, у ДМЗ на 24-ту годину не має значного впливу на прогресування ГЛУ.

Наступний етап експерименту супроводжувався менш вираженими темпами приросту окисної модифікації білків, про що свідчать наступні значення ОМБс. Так, на 48 год у III групі: АДНФГн – всього на 11,4 % ($p > 0,05$); КДНФГн – на 1,1 % ($p > 0,05$), АДНФГо – на 11,5 % ($p > 0,05$) та КДНФГо – на 12,8 % ($p > 0,05$), порівняно з даними на 24-ту годину. Показники ОМБг також незначно зростали: АДНФГн – на 9,5 % ($p > 0,05$), КДНФГн – на 27,3 % ($p > 0,05$), АДНФГо – на 20 % ($p > 0,05$) та КДНФГо – на 50 % ($p < 0,05$) відповідно до попереднього етапу дослідження. Подібна тенденція недостовірної елевачії ОМБ відзначалась і за умов дексаметазонавої корекції у IV групі. Проте дані показники у крові вірогідно зростали відносно контролю: АДНФГн – у 3,2

раза, КДНФГн – у 2,3 раза, АДНФГо – у 2,7 раза та КДНФГо – у 5,2 раза ($p < 0,05$). У легенях окисдаційні процеси супроводжувались інтенсивнішою елевацією: АДНФГн – у 2,9 раза ($p < 0,05$), КДНФГн – у 4,2 раза ($p < 0,05$), АДНФГо – у 9,3 ($p < 0,05$) та КДНФГо – у 13,7 раза ($p < 0,05$) відповідно. Отримані результати вказують на більшу активність ОМБ у легенях, ніж у сироватці крові шурів.

Інтенсифікація процесів ОМБ при тяжкому панкреатиті може відбуватися за різними механізмами. Наприклад, внаслідок деструкції ацинарних клітин ПЗ – у кровотік вивільняється велика кількість ферментів (трипсин, ліпаза, фосфоліпаза А2), які, у свою чергу, призводять до масивного ушкодження тканин і органів, серед яких чільне місце посідають легені. Так, фосфоліпаза А2 є ферментом, що сприяє деградації сурфактант. Внаслідок цього, нейтрофіли активовані запальними медіаторами, секретують у кровотік різноманітні ефекторні молекули, зокрема мієлопероксидазу та пероксид водню, які вивільнюються з азурофільних гранул. Стимуляція і перехід даних клітин до неспецифічної імунної відповіді спричинює ланцюгову реакцію утворення кисневих радикалів, і як наслідок – ОМБ. Білки окиснюються вторинно, внаслідок дії активних форм кисню та преокисного окиснення ліпідів [3].

Продукти окисної модифікації протеїнів не в змозі виконувати звичайні функції відповідних білків. Більше того, у великих кількостях вони можуть бути небезпечними для клітин [5]. Накопичення ОМБ відображає не тільки швидкість окисного процесу, але також деградацію цих білків, що залежить від активності протеаз, котрі вибірково руйнують окиснені протеїни [9].

Окисдаційний стрес також стимулює вивільнення нейтрофілами запальних цитокінів, таких, як НФк β , ТНФ- α , ІФН- γ , ІЛ-1 β , та ІЛ-8, що призводить до легеневого ушкодження [8].

За даними ряду авторів [10], лікування малими дозами глюкокортикоїдів покращувало стан пацієнтів із раннім тяжким ГРДС. Доведено покращення легеневої функції, зменшення часу механічної вентиляції легень та пригнічення запального процесу. Невеликі дози ДМЗ на ранніх стадіях основного захворювання пригнічують бронхопальмональну гіперреактивність, секвестрацію нейтрофілів у легені та альвеоло-капілярну дисфункцію. Введення великих доз ДМЗ на пізніших стадіях ГЛУ не покращувало стану пацієнтів [10].

Висновки

1. Отримані результати дослідження показали, що гострий L-аргінин індукований панкреатит супроводжується інтенсивною окисною модифікацією білків, яка може потенціювати розвиток гострого ушкодження легень.

2. При гострому панкреатиті з панкреонекрозом розвивається ферментемія та загальна відповідь на запалення з утворенням великої кількості вільних радикалів, які накопичуються в легенях та можуть спричинити незворотні зміни.

3. Доведено, що при введенні дексаметазону на початкових етапах розвитку гострого панкреатиту відбувається сповільнення процесів окисної модифікації білків, тоді як відтерміноване введення препарату не супроводжується достовірним зниженням окисних процесів у крові та легеневого гомогенаті.

Перспективи подальших досліджень. Подальші дослідження можуть пролити світло на невідомі ще механізми ушкодження легень при гострому панкреатиті та можливість використання глюкокортикостероїдів як профілактики тяжких респіраторних ускладнень у клінічній практиці.

Література

1. Биркун А.А. Сурфактант легких / А.А. Биркун, Е.Н. Нестеров, Г.В. Кобозев. – К.: Здоров'я, 1981. – 160 с.
2. Благовестнов Д.А. Комплексное лечение острого панкреатита и его осложнений / Д.А. Благовестнов, В.Б. Хватов, А.В. Упырев // Хирургия. – 2004. – № 5. – С. 68-75.
3. Бродяк І.В. Вплив аміногуанідину на окисну модифікацію білків при експериментальному цукровому діабеті у шурів / І.В. Бродяк, Н.О. Сибіріна // Укр. біохім. ж. – 2006. – Т. 78, № 5. – С. 114-119.
4. Дубинина Е.Е. Роль активных форм кислорода в качестве сигнальных молекул в метаболизме тканей при состоянии окислительного стресса / Е.Е. Дубинина // Вопр. мед. химии. – 2001. – № 6. – С. 136-141.
5. Пероксидне окиснення білків печінки за умов гіпоацидного стану / О.О. Берник, О.М. Савчук, К.О. Дворченко [та ін.] // Фізика живого. – 2010. – Т. 18, № 3. – С. 89-92.
6. Чуклін С.М. Маркери окисдаційного стресу як показники тяжкості гострого панкреатиту / С.М. Чуклін, І.Ю. Бігальський, А.А. Пересяслов // Укр. ж. хірургії. – 2011. – № 6 (15). – С. 159-163.
7. Alpha glucocorticoid receptor expression in different experimental rat models of acute lung injury / G. Bertorelli, A. Pesci, S. Peveri [et al.] // Pulmonary Pharmacological Therapy. – 2008. – № 21. – P. 214-221.
8. Ascorbate attenuates pulmonary emphysema by inhibiting tobacco smoke and Rtp801-triggered lung protein modification and proteolysis / I. Gupta, S. Ganguly, C. Rozanas [et al.] // PNAS. – 2016. – № 1073. – P. 4208-4217.
9. Berlett B. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress / B. Berlett, E. Stadtman // The journal of biological chemistry. – 1997. – Vol. 272, № 33. – P. 20313-20316.
10. Huang B. Protective effects of dexamethasone on early acute lung injury induced by oleic acid in rats / B. Huang, D. Wang, W. Deng // Int journal of clinical experimental medicine. – 2014. – № 7 (12). – P. 4698-4709.
11. Johnson C.D. Persistent organ failure during the first week as a marker of fatal outcome in acute pancreatitis / C.D. Johnson, M. Abu-Hilal // Persistent organ failure during the first week as a marker of fatal outcome in acute pancreatitis // Gut. – 2004. – № 53. – P. 1340-1344.
12. Leppaniemi A. Recent advances in the surgical management of necrotizing pancreatitis / A. Leppaniemi, E. Kempainen // Current opinion in critical care. – 2005. – № 11. – P. 349-352.
13. Management of acute pancreatitis in emergency / V. Ojetti, A. Migneco, A. Manno [et al.] // European Review for Medical and Pharmacological Sciences. – 2005. – № 9. – P. 133-140.
14. Wilmer A. ICU management of severe acute pancreatitis / A. Wilmer // European Journal of Internal Medicine. – 2004. – № 15. – P. 274-280.

**РОЛЬ ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ МОДИФИКАЦИИ БЕЛКОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ
ОСТРОМ ПАНКРЕАТИТЕ И В УСЛОВИЯХ КОРРЕКЦИИ ДЕКСАМЕТАЗОНОМ***В.В. Черкасова*

Резюме. В статье представлены результаты исследования, проведенного на 82 белых крысах-самцах линии Вистар массой 180-220 г, которым был смоделирован острый панкреатит (ОП) и проведена коррекция дексаметазоном. В крови и гомогенате легких животных определяли процессы окислительной модификации белков (ОМБ) через 12, 24 и 48 часов эксперимента.

Установлено, что при экспериментальном ОП развивается ферментемия и общий воспалительный ответ с образованием большого количества свободных радикалов, которые накапливаются в легких и могут вызывать необратимые изменения.

Доказано, что при введении дексаметазона на начальных этапах развития ОП происходит замедление процессов ОМБ, тогда как отсроченное введение препарата не сопровождается достоверным снижением окислительных процессов в крови и гомогенате легких.

Ключевые слова: острый панкреатит, окислительная модификация белков, крысы.

**ROLE OF OXIDATIVE MODIFICATION OF PROTEINS IN EXPERIMENTAL
ACUTE PANCREATITIS WITH DEXAMETHASONE CORRECTION***V.V. Cherkasova*

Abstract. The study was performed on 82 white male rats of Wistar line weighing 180-220 g, with modeled acute pancreatitis (AP) and dexamethasone correction. Samples for analysis were taken: the blood serum and lung homogenate on 12, 24 and 48 hours to determine the processes of oxidative modification of proteins (OMP) for evaluation intensity of oxidative stress.

It was established, that the main pathogenetic process was related to elevated pancreatic enzymes in the blood of the animals and general inflammatory response. This corresponds to high levels of free radicals that accumulate in the lungs and can cause irreversible changes.

It is proved that the introduction of dexamethasone in the early stages of the AP is slowing OMP processes, while postponed drug introduction is not accompanied by a significant decrease of oxidative reactions in the blood and lung homogenate.

Key words: acute pancreatitis, oxidative modification of proteins, rats.

HSEI «National Medical University» (Ivano-Frankivsk)

Рецензент – проф. Ю.С. Роговий

Buk. Med. Herald. – 2017. – Vol. 21, № 2 (82), part 2. – P. 110-114

Надійшла до редакції 19.04.2017 року