© С.М. Чуклін, І.Ю. Бігальський, О.Б. Гранат, 2011

УДК 616.37-002-008.9-092

С.М. ЧУКЛІН, І.Ю. БІГАЛЬСЬКИЙ, О.Б. ГРАНАТ
Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, кафедра хірургії №1, Львів

КІНЦЕВІ ПРОДУКТИ ОКИСНЕННЯ БІЛКІВ ПРИ ГОСТРОМУ ПАНКРЕАТИТІ

Недостатньо вивченою ланкою гострого панкреатиту є оцінка значущості активації процесів окиснення білків і недостатності антиоксидаційної системи. Метою роботи було визначення концентрації кінцевих продуктів окиснення білків у хворих на гострий панкреатит в залежності від тяжкості і термінів захворювання. Рівень АОРР визначався в динаміці у 53 хворих на гострий панкреатит різного ступеня тяжкості. Концентрацію АОРР у плазмі крові визначали за допомогою фотометричного методу. У хворих на тяжкий гострий панкреатит підвищена концентрація АОРР в плазмі крові. Це корелює з рівнем пероксиду водню. Чутливість визначення АОРР для прогнозування деструктивного панкреатиту у першу добу склала 96,4%, специфічність – 100%. При гострому панкреатиті спостерігаються інтенсивні процеси окиснення білків, які відіграють важливу роль у патогенезі захворювання. АОРР може бути потенційним маркером тяжкості перебігу гострого панкреатиту.

Ключові слова: гострий панкреатит, оксидаційний стрес, продукти окиснення білків

Вступ. Оксидаційно/антиоксидантний дисбаланс є одним з механізмів розвитку гострого панкреатиту (ГП). Антиоксидантна терапія може стати раціональною ланкою у лікуванні хворих на ГП. Проте, глибоке розуміння взаємозв'язку між антиоксидантним статусом і окисним ушкодженням, з одного боку, і тяжкістю запалення, з іншого, повинні передувати застосуванню антиоксидантної терапії.

Показники окисного пошкодження, особливо продукти пероксидного окиснення ліпідів, широко використовуються як маркери оксидаційного стресу. У літературі накопичені численні дані, що стосуються вивчення механізмів пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) і його ролі в нормальному та патологічному функціонуванні клітин. Однак, крім головного субстрату окиснення – молекул біомембран і ядерного хроматину – активні форми кисню (АФК) викликають і окиснювальну модифікацію білків (ОМБ) (пероксидне окиснення білків). Вважають, що в стані окисного стресу атаці АФК піддаються не ліпіди, а, у першу чергу, білки плазматичних мембран. Підтвердженням цього може служити феномен, названий Бергельсон „молекулярною пам'яттю ліпідів" [цит.1]. Суть його полягає в тому, що, численні короткострокові події, що протікають у білковій молекулі клітинної мембрани, впливають на довготривалі параметри функціонування мембранного бішару. При дії відповідного агента на мембранний білок-рецептор конформація останнього змінюється й надалі індукує зміни білок-ліпідних контактів, стан ліпідів, що оточують білок. Ці зміни стану ліпідів зберігаються і після відщеплення ліганда від рецептора, тобто слугують способом закріплення рецептора в збудженій конформації. Таким чином, „пам'ять" ліпідів забезпечує посилення сигналу, що передається із зовнішнього середовища на клітинну мембрану. Підтвердженням первинності пероксидного окиснення білка є наявність виражених змін при окиснювальному стресі в області анулярних ліпідів [18], що говорить про провідну роль окисної модифікації білків у деструкції клітинної мембрани. При інкубації арахідонової кислоти з окиснювально модифікованим білком in vitro спостерігається утворення малонового діальдегіду і 4-гідроксіноненаля [9], що характеризує модифікований білок в якості потенційного стимулятора пероксидного окиснення ліпідів.

Нещодавно виявлені і інтенсивно досліджуються кінцеві продукти окиснення білків (АОРР – advanced oxidation protein products), які є стабільнішими. Окиснювальна деструкція білків є одним з ранніх індикаторів пошкодження тканини, що обґрунтовує вивчення динаміки утворення продуктів ОМБ при різних патологічних станах організму, зокрема при гострому панкреатиті.

Мета дослідження. Визначити концентрацію кінцевих продуктів окиснення білків у хворих на гострий панкреатит в залежності від тяжкості і термінів захворювання.

Матеріал та методи. Обстежено 53 хворих на гострий панкреатит (ГП) при надходженні в клініку і 14 здорових осіб. Їх вікові і статеві ознаки були подібними. Усі пацієнти, які включені в це дослідження, надійшли в клініку не пізніше 48 годин від початку захворювання. Діагноз гострого панкреатиту ґрунтувався на результатах об'єктивного обстеження, біохімічних показниках (концентрація панкреатичної амілази і ліпази перевищувала нормальні показники більше, ніж у три рази), даних ультрасонографічного обстеження і комп'ютерної томографії. Згідно з критеріями Atlanta (1992) у 25 хворих діагностовано легкий перебіг ГП, у 28 – тяжкий. Контрольну групу склали 14 добровольців.

Визначення кінцевих продуктів окиснення білків проводили фотометричним методом з використанням комерційних наборів „AOOP Kit" фірми „Immunodiagnostic AG" (ФРН), пероксиду водню –

колориметричним методом наборами „OXYSTAT" фірми „Biomedica" (Австрія). Оптичну щільність вимірювали на аналізаторі COBAS EIA („Roche", Франція). Калібровочні графіки будували з допомогою комп'ютерної програми „Origin 8" (OriginLab Corporation, США).

Усі хворі отримували стандартну консервативну терапію, яка не включала специфічне антиоксидаційне лікування. Дослідження проводили через 1, 3 і 7 діб.

Протокол дослідження був схвалений університетською комісією з біоетики, відповідно до норм Гельсінської декларації; інформована згода була отримано від всіх пацієнтів до включення у дослідження.

Статистичне вичислення показників проводили з допомогою стандартних комп'ютерних програм (Statistica Version 6.1, StatSoft Inc.; SPSS Statistics 17.0) непараметричної статистики з визначенням середнього арифметичного, стандартного відхилення. Різницю між незалежними показниками обчислювали за Mann-Whitney, між залежними – за Wilcoxon і вважали істотною при $p<0,05$. Проводили також кореляційний аналіз Spearman з вичисленням R (істотність кореляції при $p<0,05$). Прогностичне значення показників оцінювали за наступними критеріями: специфічність, чутливість, коефіцієнт імовірності (KI) (likelihood ratio – LR).

Результати досліджень та їх обговорення. Відзначено, що вже при госпіталізації у хворих на ГП у плазмі крові підвищена концентрація АОРР (табл.1). У першу добу його концентрація перевищувала середні показники донорів у 2,61 рази, на 3-у – у 2,32 рази і на 7-у – у 1,6 разів. Таким чином, з першого дня надходження в клініку у хворих інтенсифікуються процеси пероксидного окиснення білків, які практично не змінюються протягом перших трьох діб, а поступово зменшуються до кінця першого тижня.

Таблиця 1

Рівень кінцевих продуктів окиснення білків (мкмоль/л) (M ± SD) у плазмі крові хворих на гострий панкреатит

Термін обстеження	Групи обстежених	
	донори (n=14)	хворі на ГП (n=53)
1-а доба	84,76 ± 21,14	221,12 ± 199,49*
3-а доба	84,76 ± 21,14	196,39 ± 180,99*
7-а доба	84,76 ± 21,14	135,47 ± 67,53*#Δ

Примітка: * – істотність різниці порівняно з донорами ($p< 0,05$)
– істотність різниці порівняно з 1-ою добою ($p< 0,05$)
Δ – істотність різниці порівняно з 3-ою добою ($p< 0,05$)

Проте, важливо визначити концентрацію АОРР у пацієнтів в залежності від тяжкості захворювання, що точніше віддзеркалює спрямованість пошкодження білків.

При даній оцінці спостерігалася чітка залежність концентрації АОРР в плазмі крові від тяжкості патологічного процесу. При некротичному панкреатиті рівень АОРР перевищували нормальні показники протягом усього першого тижня перебування в клініці, тоді як при набряковій формі вони були практично співставні з показниками донорів (табл.2). Водночас, на 7-му добу показники окиснення білків суттєво знизилися порівняно з днем надходження – у середньому в 1,9 рази, хоча і не досягли нормальних величин.

Таблиця 2

Рівень кінцевих продуктів окиснення білків (мкмоль/л) (M ± SD) у плазмі крові хворих на гострий панкреатит

Термін обстеження	Групи обстежених		
	донори (n=14)	легкий ГП (n=25)	тяжкий ГП (n=28)
1-а доба	84,76 ± 21,14	72,97± 21,19*	353,39 ± 194,37*♦
3-а доба	84,76 ± 21,14	78,30 ± 28,94	301,83 ± 194,69*#♦
7-а доба	84,76 ± 21,14	79,33 ± 23,73	185,60 ± 52,50*#Δ♦

Примітка: * – істотність різниці порівняно з донорами ($p< 0,05$)
– істотність різниці порівняно з 1-ою добою ($p< 0,05$)
Δ – істотність різниці порівняно з 3-ою добою ($p< 0,001$)
♦ – істотність різниці порівняно з легким ГП ($p< 0,001$)

Зважаючи на отримані результати, цікавим було визначити можливість використання АОРР для прогнозування перебігу гострого панкреатиту. ROC-аналіз показав, що концентрація АОРР у пла-

змі крові при надходженні хворих у клініку має хорошу точність у диференціації між легким та тяжким гострим панкреатитом і найкращий пороговий рівень в 164,80 мкмоль/л.

Після визначення факторів, за допомогою яких можна спрогнозувати розвиток тяжкого перебігу у хворих на гострий панкреатит, важливим є надати діагностичну характеристику цих параметрів за чутливістю і специфічністю показників. Для оцінки важливості тесту у прогнозуванні перебігу гострого панкреатиту введено також коефіцієнти імовірності (КІ) (likelihood ratio – LR), які визначаються

для позитивного тесту: $КІ_{поз}$= чутливість/(100-специфічність),

для від'ємного тесту: $КІ_{нег}$= (100-чутливість)/специфічність.

Для невідкладного застосування найкращими є тести, коли $КІ_{поз}$ більше від 10 чи $КІ_{нег}$ менше від 0,1.

Чутливість визначення АОРР для прогнозування деструктивного панкреатиту у першу добу склала 96,4%, а специфічність – 100%.

Вичислення показало, що для АОРР $КІ_{поз}$= > 96, а $КІ_{нег}$= 0,006.

Для формування АОРР найістотнішим є генерація супероксид аніону, який зазнає дисмутації до пероксиду водню під дією мієлопероксидази нейтрофілів, у присутності іонів галогенів (в основному Cl^-) призводить до утворення дуже реактивної форми хлорнуватистої кислоти (HClO). Хлорнуватиста кислота також реагує з пероксидом водню, перетворюючи його в синглетний кисень, і реагує з аміаком та аміногрупами білків, у результаті чого утворюється дуже реактивний хлорамін (NH_2Cl). Обидві хлорвмісні сполуки (HClO і NH_2Cl) безпосередньо беруть участь в модифікації нативної структури білків, перетворюючи їх на патологічні частинки, звані АОРР. Особливо чутливі до окиснення є залишки тирозину, які легко перетворюється в дитирозин і обумовлюють утворення поперечних зв'язків та білкових агрегатів. Найважливішим у формуванні АОРР є система МПО/H_2O_2/галоген [2, 3, 19].

Тому ми визначили залежність концентрації АОРР від концентрації пероксиду водню у плазмі крові. Кореляційний аналіз підтвердив, що існує істотна пряма кореляція між концентрацією АОРР і рівнем H_2O_2 у хворих на гострий панкреатит у всі терміни спостереження: на 1-у добу (R=0,63, p<0,05), 3-у (R=0,83, p<0,05) і сьому (R=0,85, p<0,05). Проте, ця кореляція була чітко відзначена тільки для тяжкого перебігу гострого панкреатиту – особливо на 3-у (R=0,71, p<0,05) і сьому добу (R=0,45, p<0,05), а не для легкого.

Кінцеві продукти окиснення білків – АОРР були вперше визначені та описані Witko-Sarsat та співавт. у 1996 році [3] у плазмі хворих із хронічною нирковою недостатністю. Збільшення їх концентрації було в подальшому охарактеризовано і при інших патологічних станах, зокрема, при атеросклерозі, серцево-судинних і нейродегенеративних захворюваннях, раку, запальних захворюваннях суглобів, діабеті [6, 8, 13, 14, 20]. Спочатку АОРР характеризувалися як маркери окисного стресу і тяжкості окисного пошкодження білків, пізніше – інтенсивності запального процесу [3, 4].

Точна структура АОРР ще повною мірою не зрозуміла і не описана. Відомо, що це, головним чином, похідні окиснювально зміненого альбуміну, його агрегатів і/або фрагментів, а також фібриногену та ліпопротеїдів [12, 20]. АОРР також мають деякі структурні елементи та біологічні властивості, які тотожні кінцевим продуктам глибокого глікозилювання білків – AGE (англ. advanced glycation end products). Було визначено, що АОРР розпізнаються і зв'язуються з тими самими рецепторами, що і AGE, – RAGE (англ. receptor for advanced glycation end products), викликають внутрішньоклітинні зміни і позаклітинні порушення, в основному в судинній системи, нирках і мозку, подібно до кінцевих продуктів глибокого глікірування – AGE.

У формування АОРР провідну роль відіграє оксидаційний стрес, обумовлений, головним чином, надмірним формуванням активних форм кисню – АФК (активні форми кисню, англ. reactive oxygen species), особливо гідроксильних радикалів і пероксиду водню, і підвищення активності і вивільнення ферментів фагоцитуючими клітинами, особливо нейтрофільної мієлопероксидази (МПО). При гострому панкреатиті зниження потужності антиоксидантної системи посилює існуючі проблеми в цих пацієнтів.

Збільшення процесів глікозилювання і оксидації тісно пов'язано між собою і спільно вони називаються процесами глікооксидації [2, 7]. Недавні дослідження показали прямий зв'язок між оксидаційним стресом і рівнем глюкози в крові [10], Зв'язок із запаленням підтверджується кореляцією з неоптерином, СРБ та ШОЕ [15]. Гіперглікемія, яка часто спостерігається при некротичному панкреатиті, є також потужним стимулом фагоцитів, активація яких призводить до вивільнення значної кількості АФК і прозапальних цитокінів.

Взаємодія АОРР-RAGE в макрофагах призводить до їх активації і вивільнення прозапальних цитокінів (ІЛ-1, ІЛ-6, ФНП-α), які діють через конкретні розчинні рецептори у крові, викликаючи загострення запалення, яке, з одного боку, ушкоджує тканини, з іншого – активує нейтрофіли, які вивільнюють НАДФН-оксидазу і МПО, що викликає повторне утворення АОРР. Інтенсивність реакції, яка викликається зв'язуванням ліганда з рецептором, і ступінь тяжкості запального процесу є більш вираженим у випадку взаємодії АОРР-RAGE, ніж AGE-RAGE [2, 4, 4, 11].

Окиснені білки служать субстратом для протеолітичних ферментів, що й обумовлює зниження концентрації загального білка. Пул пошкоджених

білків активує протеоліз, що сприяє подальшому посиленню деструктивних процесів у вогнищі запалення. Окиснені білки здатні виступати в якості джерела вільних радикалів, виснажувати запаси клітинних антиоксидантів, таких як аскорбінова кислота і глютатіон [16]. In vitro показано, що продукти вільнорадикального окиснення білків опосередковують окисні пошкодження ДНК. Пероксидне окиснення білків також призводить до зниження функції білків в ланцюзі переносників електронів, активності АТФ-ази, вибірковості дії транспортних пор. Зміна Red/Ox-потенціалу мітохондріальної мембрани може викликати дисфункцію каскаду дихального ланцюга [17]. Отже, окиснені протеїни є не тільки „свідками", а й активними учасниками вільнорадикального ушкодження клітини.

Таким чином, окиснювальна модифікація білків відіграє ключову роль у молекулярних механізмах оксидаційного стресу і є пусковим механізмом до окисної деструкції інших молекул (ліпіди, ДНК) клітини при гострому панкреатиті.

Крім того, окиснювальна модифікація молекул білків має пряме відношення до механізмів токсичної загибелі клітини, зокрема ацинарних, оскільки самі продукти цієї окисної модифікації білків, так само як і продукти ПОЛ, мають цитотоксичну дію.

Висновок. При гострому панкреатиті спостерігаються інтенсивні процеси окиснення білків, які грають важливу роль у патогенезі захворювання. Показники АОРР можуть використовуватися для прогнозування перебігу гострого панкреатиту.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Болдырев А.А. Введение в биохимию мембран / А.А. Болдырев. — М.: Высшая школа, 1986. — С.77—78.
2. Advanced glycoxidation end products in chronic diseases —clinical chemistry and genetic background / M.Kalousova, T.Zima, V.Tesar [et al.] // Mutat. Res. — 2005. — Vol. 579. — P.37—46.
3. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia / V. Witko —Sarsat, M. Friedlander, C. Capeillere —Blandin [et al.] // Kidney Int. — 1996. — Vol. 49. — P.1304 —1313.
4. Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure / V. Witko —Sarsat, M. Friedlander, T. Nguyen —Khoa [et al.] // J. Immunol. — 1998. — Vol. 161. — P.2524 —2532.
5. Advanced oxidation protein products as a novel molecular basis of oxidative stress in uremia / V. Witko — Sarsat, T. Nguyen —Khoa, P. Jungers [et al.] // Nephrol. Dial. Transplant. — 1999. — Vol. 14, Suppl.1. — P.76—78.
6. Advanced oxidation protein products in aged with dementia / M.E. Demirbilek, N. Kilic, H.F. Komurcu [et al.] // Am. J. Immunol. — 2007. — Vol. 3. — P.52—55.
7. Aronson D. Hyperglycemia and the pathobiology of diabetic complications / D.Aronson // Adv. Cardiol. — 2008. — Vol. 45. — P.1—16.
8. Comparative assessment of urinary oxidative indices in breast and colorectal cancer patients / S. Chandramathi, K. Suresh, Z.B. Anita [et al.] // J. Cancer Res. Clin. Oncol. — 2009. — Vol. 135. —P.319—323.
9. Generation of protein carbonyls by glycoxidation and lipoxidation reactions with autoxidation products of ascorbic acid and polyunsaturated fatty acids / T. Miyata, R. Inagi, K. Asahi [et al.] // FEBS Lett. — 1998. — Vol. 437. — P.24—28.
10. Glycaemic status in relation to oxidative stress and inflammation in well —controlled type 2 diabetes subjects / E. Rytter, B. Vessby, R. Asgard [et al.] // Br. J. Nutr. — 2009. — Vol. 101. — P.1423—1426.
11. Glycoxidation and inflammation in chronic haemodialysis patients / M. Kalousova, S. Sulkova, L. Fialova [et al.] // Nephrol. Dial. Transplant. — 2003. — Vol. 18. — P.2577—2581.
12. Human blood plasma advanced oxidation protein products (AOPP) correlates with fibrinogen levels / L. Selmeci, M. Szekely, P. Soos [et al.] // Free Rad. Res. — 2006. — Vol. 40. — P.952—958.
13. Investigation of protein oxidation and lipid peroxidation in patients with rheumatoid arthritis / G. Baskol, H. Demir, M. Baskol [et al.] // Cell Biochem. Funct. — 2006. — Vol. 24. — P.307—311.
14. Kalousova M. Advanced glycation end —products and advanced oxidation protein products in patients with diabetes mellitus / M. Kalousova, J. Skrha, T. Zima // Physiol. Res. — 2002. — Vol. 51. — P.597—604.
15. Lenzen S. Oxidative stress: the vulnerable beta —cell / Lenzen S. // Biochem. Soc. Trans. — 2008. — Vol. 36. — P.343—347.
16. Long —lived reactive species on free —radical —damaged proteins / J.A. Simpson, S. Narita, S. Gieseg [et al.] // Biochem. J. — 1992. — Vol. 282. — P.621—624.
17. Morin B. The protein oxidation product 3,4 —dihydroxyphenylalanine (DOPA) mediates oxidative DNA damage / B. Morin, M.J. Davies, R.T. Dean // Biochem. J. — 1998. — Vol. 330. — P.1059—1067.
18. Protein —bound acrolein: potential markers for oxidative stress / K. Uchida, M. Kanematsu, K. Sakai [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sc.i U S A. — 1998. — Vol. 95. — P.4882—4887.
19. The structure and function of oxidized albumin in hemadialysis patients: Its role in elevated oxidative stress via neutrophil burst / K. Mera, M. Anraku, K. Kitamura [et al.] // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 2005. — Vol. 334. — P.1322—1328.
20. Woods A.A. Detection of HClO —mediated protein oxidation products in the extracellular matrix of human atherosclerotic plaques / A.A. Woods, S.M. Linton, M.J. Davies // Biochem. J. — 2003. — Vol. 370. — P.729—735.

CHOOKLIN S., BIHALSKYY I., HRANAT O.

Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Lviv

ADVANCED OXIDATION PROTEIN PRODUCTS IN ACUTE PANCREATITIS

Understudied part of acute pancreatitis is evaluating the significance of activation of lipid and protein deficiency and inadequate antioxidant system. The focus was on determining the concentration of advanced oxidation protein products in patients with acute pancreatitis, depending on the severity and duration of disease. Level of AOPP determined in dynamics in 53 patients with acute pancreatitis of different severity. AOPP concentration in plasma was determined by photometric assay. In severe acute pancreatitis patients concentration of AOPP increased in plasma. This correlates with the level of hydrogen peroxide. Sensitivity determination of AOPP to predict severe acute pancreatitis was 96,4%, specificity – 100%. In acute pancreatitis observed intensive oxidation proteins processes that play an important role in the pathogenesis of the disease. AOPP can be a potential marker of the severity of acute pancreatitis.

Key words: acute pancreatitis, oxidative stress, oxidation protein products

Стаття надійшла до редакції: 6.06.2011 р.