

ДИНАМІКА ОКИСНОЇ МОДИФІКАЦІЇ БІЛКІВ ПЛАЗМИ КРОВІ У ХВОРИХ НА ГОСТРИЙ ЕПІДИДИМІТ ПІД ВПЛИВОМ ЛІКУВАННЯ

Є.А. Литвинець ¹, В.Р. Балабанік ²

¹ ДВНЗ «Івано-Франківський національний медичний університет»

² НВМКЦ «Головний Військовий Клінічний Госпіталь»

Вступ. Гострий епідидиміт є поширеним інфекційним захворюванням невідомої етіології у 30% випадків, а лікування надається на основі досліджень, що були опубліковані понад 15 років тому [1]. Щорічний рівень захворюваності на гострий епідидиміт становить орієнтовно 400 / 100 000 чоловіків [2]. Незважаючи на наявність відповідних рекомендацій [3, 4], до 50% пацієнтів отримують неадекватну діагностику і терапію [5, 6].

Макроструктура білків утворюється в результаті унікального для даної молекули амінокислотного складу та специфічної архітектоники поліпептидних ланцюгів. Послідовність амінокислотного складу є неповторною для кожної білкової молекули, визначає її структуру і функціональну активність. У фізіологічних умовах білкова молекула існує і виконує свою функцію лише в складному комплексі з різноманітними метаболітами. Саме макроструктурою визначається висока специфічність білкової молекули, її лабільність і неймовірна чутливість до впливу різного роду факторів.

Модифікаційні зміни білкової молекули – це зміни конформації, що відбуваються при індукованій взаємодії її функціональних груп з метаболітами, а також глибокі денатураційні зміни, що супроводжуються докорінною перебудовою архітектоники поліпептидних ланцюгів макромолекули білка у просторі [7, 8].

Клініко-експериментальні дані останніх років свідчать про те, що в патогенезі критичного стану, запального процесу будь-якої етіології та сепсису лежить механізм активації окисних процесів унаслідок інтенсифікації процесів утворення вільних радикалів та інших високоактивних окиснювачів. Посилення вільнорадикального окиснення призводить до напруження і швидкого виснаження механізмів антиоксидантного захисту. Виникає дисбаланс окиснювальних та антиокиснювальних процесів, розвивається окиснювальний стрес. Внаслідок цього відбуваються конформаційні зміни білкових

молекул, змінюються фізико-хімічні властивості біологічних мембран і активність ліпідозалежних ферментів, які забезпечують метаболічні, транспортні, регуляторні і рецепторні функції клітин. Дисфункція фосfolіпідного компонента мембран у разі ішемії і порушення процесів репарації при реоксигенації і рециркуляції відіграє важливу роль у виникненні і розвитку синдрому ендотоксемії і поліорганної недостатності [9].

Окисний стрес – процес, в основі якого лежать універсальні реакції вільнорадикального окиснення, є одним з важливих механізмів, що може ушкоджувати різні органи й системи людського організму, а в подальшому здатен викликати зміни як фактор поліморбідності [10, 11].

Найактивнішим реагентом серед активних форм кисню є супероксидний аніон (O_2^-), що завдяки ланцюгу реакцій з дисмутазою перетворюється на пероксид водню (H_2O_2). Пероксид водню вступає в окиснювальні реакції з компонентами клітин на значних відстанях від його утворення. Інша активна форма кисню – гідроксил-радикал (OH^*) – безпосередньо окиснює органічні сполуки всіх класів з незворотними модифікаціями білків, нуклеїнових кислот і ліпідів. Пероксинітрит ($OONO^-$) – попередник канцерогенних нітросполук, який самостійно пошкоджує білки та ліпіди клітинних мембран, негативно впливає на ендотелій судин, підвищує агрегаційну здатність тромбоцитів. $OONO^-$ утворюється під час взаємодії оксиду азоту NO з супероксидним аніоном O_2^- у разі патологічних змін рН. Деякі вчені вважають, що в реакціях окисного стресу в першу чергу пошкоджуються не ліпідні, а білкові компоненти клітинних мембран, деполімеризація яких призводить до лізису клітин [7].

На думку дослідників, кисневозалежне окиснення білків є раннім індикатором пошкодження органів і тканин, а процеси окисної модифікації білків (ОМБ) при всіх патологічних станах повинні перебувати під безперервним лабораторним контролем [12].

Мета дослідження: встановити ступінь окисної модифікації білків у хворих на гострий епідидиміт та вплив на перебіг захворювання.

Матеріали і методи дослідження. Для визначення процесів окисної модифікації білків обстежено 120 хворих на гострий епідидиміт (ГЕ). Пацієнти були розподілені на 3 групи. Перша група – 40 хворих із гострим епідидимітом, яким було проведено лікування згідно із протоколом, 2-га група – 40 хворих із гострим епідидимітом, яким до комплексу лікування був включений антибіотик офлоксацин, 3-тя група – 40 хворих із гострим епідидимітом до комплексу лікування яких було включено антибіотик офлоксацин, l-аргінін та свічки, що містять стрептокіназу 15 000 МО та стрептодорназу 1250 МО. Групу контролю становили 20 практично здорових осіб.

Окисну модифікацію білків у сироватці крові хворих на ГЕ визначали за методом І.Ф. Мещишена [13, 14]. За умов окиснювального стресу домінуючими стають процеси нерегульованої модифікації молекул білків, що призводить до втрати їх біологічної активності. У свою чергу, окиснювальна модифікація білків генерує нові антигени і впливає на імунну відповідь, що є причиною вторинного пошкодження інших біомолекул. Тому важливо лабораторно контролювати процеси окиснювальної модифікації білків у хворих. Це дозволяє оцінювати глибину розладів і метаболічної інтоксикації та ефективність терапії, яку отримує пацієнт. Принцип методу ґрунтується на тому, що в процесі дослідження інтенсивності окиснювальної модифікації білків було застосовано спектрофотометричний аналіз плазми (сироватки) крові на наявність фенілгідразонів (альдегідні та кетонні групи), які утворюються під час взаємодії активних форм кисню з уривками амінокислот білкових молекул з додаванням 2,4-динітрофенілгідразину (2,4-ДНФГ), що мають характерний спектр поглинання. Альдегідо- і кетонпохідні нейтрального характеру реєстрували при 356 і 370 нм, а основного характеру – при 430 і 530 нм. Ступінь окиснювальної модифікації білків виражено в одиницях оптичної щільності, що відносяться до 1 г білка або 1 мл сироватки крові [9, 15].

Статистичну обробку результатів досліджень проводили на персональному комп'ютері, одержані результати аналізували за допомогою комп'ютерних пакетів ліцензійної програми «STATISTICA» StatSoft Inc. та Excel XP для Windows з використанням параметричних та непараметричних методів обчислення (використо-

вуючи t-критерій Стьюдента). За вірогідну вважали різницю середніх величин при $P < 0,05$.

Результати та їх обговорення. У даному дослідженні ми намагались з'ясувати загальні закономірності і молекулярні механізми розвитку критичного стану в період гострого запалення придатка яєчка. Згідно із сучасними уявленнями, більшість фізіологічних і патологічних процесів, що перебігають в організмі, пов'язані з вільнорадикальним окисненням (ВРО). Вільні радикали беруть участь у підтримці гомеостазу, акумуляції і біотрансформації енергії, забезпечують захисні функції за рахунок руйнування чужорідних сполук і мікробних тіл, впливають на структуру і функцію біологічних мембран [10, 16, 17, 18].

Швидкість, напрямок розвитку процесів ВРО і вміст вільних радикалів в організмі в нормі підтримуються на певному рівні складною багаторівневою системою регуляції. Зміни, що відбуваються в системі регуляції, є ранньою неспецифічною реакцією організму у відповідь на різного роду пошкодження. Регуляторні механізми врівноважують процеси окисного пошкодження клітин і тканин та відновлення їх структури. У разі тривалої дії пошкоджувального фактора (гіпоксія, травма, інфекція) або неспроможності антиоксидантної системи захисту спостерігаються неконтрольовані процеси руйнування білків, ліпідів, глікопротеїдів і як наслідок – клітинних мембран, складних ферментних і транспортних систем організму [8, 19, 20, 21, 22].

Відомо, що при гострому бактеріальному запаленні відбувається активація нейтрофільних гранулоцитів крові, а значить і надмірна продукція пероксиду водню, а отже – синглетного кисню. У свою чергу, це ініціює системну запальну відповідь та розвиток поліорганних порушень у тяжких випадках через велику кількість вивільнених «клітинних ферментів» та активних форм кисню і оксидів азоту. Найбільш характерною особливістю модифікуючої дії оксиду азоту та кисневих радикалів на молекулу білка є нітрозилування їх сульфгідрильних центрів і руйнація дисульфідних зв'язків. Модифікація амінокислотних залишків у білках призводить до глибоких змін білкової структури, що проявляється фрагментацією і агрегацією білкової молекули. Наслідком цих структурних ушкоджень є підвищена чутливість до протеолітичної деструкції, втрата функціонального навантаження на білкову молекулу, що в подальшому може призводити до змін у системі фібринолізу, порушень ферментативної активності білків, змін проникності біологічних мембран та ін.

Руйнівній силі окисного стресу протидіє багаторівнева система антиоксидантного захисту.

Показники ОМБ у сироватці крові хворих на ГЕ засвідчили достовірне підвищення як альдегідо- й каталазопохідних нейтрального, так і альдегідо- та каталазопохідних основного характеру на початку лікування (табл. 1). Групи однорідні за даними показниками.

Згідно з даними, представленими в табл. 1, у крові всіх хворих фенілгідрозонові сполуки в основному були представлені альдегідо- та кетонпохідними нейтрального характеру (356 нм,

370 нм). Рівень фенілгідрозонів основного характеру (430 нм, 530 нм) значно поступався величинам нейтральних похідних. Як видно з результатів дослідження, із покращенням стану хворого рівень продуктів окиснення білків мав схильність до зниження. Згідно з рис. 1, 2 найефективніше зниження цих показників спостерігалось у хворих 3-ї групи. Зниження має однорідний характер по всіх групах фенілгідрозонових сполук.

Таким чином, результати досліджень підтвердили нашу концепцію щодо участі про-

Таблиця 1

Рівень окисної модифікації білків у сироватці крові хворих на гострий епідидиміт на початку лікування та в динаміці – на 15-й день лікування ($M \pm m$) (ум. од. опт. щільності/мл сироватки)

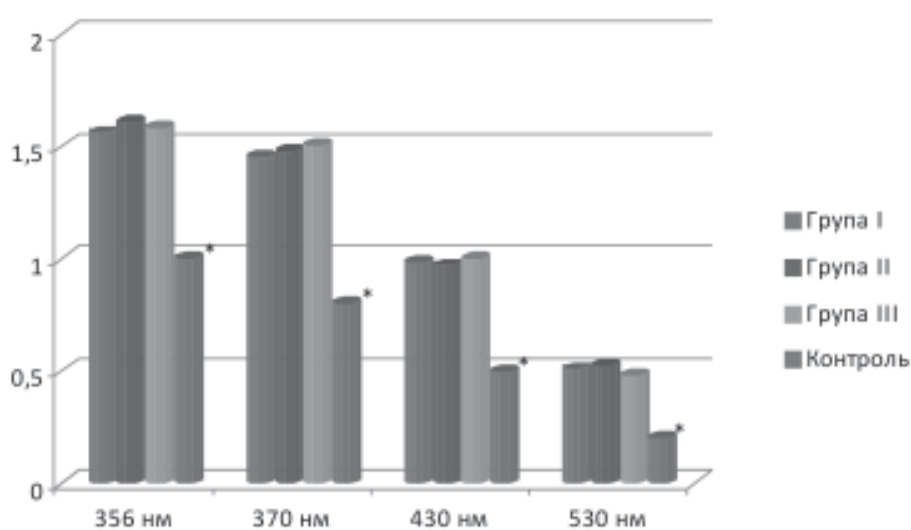
Довжина хвилі	Група контролю (n=20)	I група (n=40)		II група (n=40)		III група (n=40)	
		на початку лікування	на 15-й день лікування	на початку лікування	на 15-й день лікування	на початку лікування	на 15-й день лікування
356 нм	1±0,1 –	1,56±0,3 P<0,05	1,4±0,2 –	1,61±0,2 P<0,05	1,3±0,3 P ₁₋₂ >0,05	1,58±0,3 P<0,05	1,1±0,1 P ₁₋₃ <0,05
370 нм	0,8±0,04 –	1,45±0,2 P<0,05	1,3±0,2 –	1,48±0,2 P<0,05	1,2±0,2 P ₁₋₂ >0,05	1,5±0,2 P<0,05	0,9±0,06 P ₁₋₃ <0,05
430 нм	0,5±0,02 –	0,98±0,1 P<0,05	0,9±0,09 –	0,97±0,1 P<0,05	0,8±0,02 P ₁₋₂ >0,05	1±0,09 P<0,05	0,5±0,03 P ₁₋₃ <0,05
530 нм	0,2±0,01 –	0,51±0,06 P<0,05	0,46±0,04 –	0,52±0,04 P<0,05	0,4±0,01 P ₁₋₂ >0,05	0,48±0,02 P<0,05	0,26±0,02 P ₁₋₃ <0,05

Примітки:

P – ступінь достовірності різниць показників ОМБ відносно контролю (на початку лікування);

P₁₋₂ – ступінь достовірності різниць показників ОМБ 2-ї групи відносно 1-ї групи хворих (в динаміці);

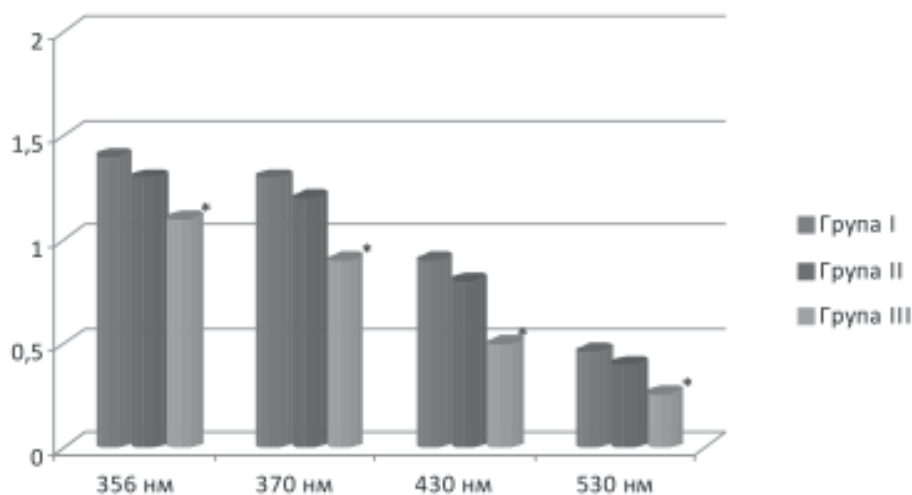
P₁₋₃ – ступінь достовірності різниць показників ОМБ 3-ї групи відносно 1-ї групи хворих (в динаміці).



Примітка:

P – ступінь достовірності різниць показників ОМБ відносно контролю (на початку лікування); * P < 0,05 у всіх групах хворих.

Рис. 1. Рівень окисної модифікації білків у сироватці крові на початку лікування (ум. од. опт. щільності/мл сироватки крові)



Примітки:

P_{1-2} — ступінь достовірності різниць показників ОМБ 2-ї групи відносно 1-ї групи хворих (в динаміці);

P_{1-3} — ступінь достовірності різниць показників ОМБ 3-ї групи відносно 1-ї групи хворих (в динаміці);

$P_{1-2} > 0,05$ по всіх величинах ОМБ.

* $P_{1-3} < 0,05$ по всіх величинах ОМБ.

Рис. 2. Рівень окисної модифікації білків у сироватці крові у динаміці — через 15 днів лікування (ум. од. опт. щільності/мл сироватки крові)

цесів окисної модифікації білків у патогенезі гострого епідидиміту, що слід враховувати під час планування комплексного обстеження та лікування таких пацієнтів.

Висновки

1. У хворих на гострий епідидиміт спостерігається активація процесів окисної модифікації білків, що підтверджується вірогідним збільшенням у сироватці крові показників альдегідо- та каталазопохідних нейтрального й основного характеру.

2. Ступінь ОМБ у хворих на ГЕ залежить від важкості перебігу захворювання. При одужанні показники ОМБ мають тенденцію до зниження, що є свідченням участі окисної модифікації білків у патогенетичних процесах розвитку та перебігу гострого епідидиміту.

3. Оцінку ступеня ОМБ слід використовувати як діагностичний алгоритм для визначення важкості перебігу гострого епідидиміту, а також як критерій ефективності лікування та прогнозу.

Список літератури

1. Pilatz A. Acute epididymitis revisited: impact of molecular diagnostics on etiology and contemporary guideline recommendations / A. Pilatz, H. Hossain, R. Kaiser, A. Mankertz, C. G. Schuttler [et al.] // *European Urology*. — 2015. — V. 68. — P. 428–35.
2. Nicholson A. Management of epididymo-orchitis in primary care: results from a large UK primary care database / A. Nicholson, G. Rait, T. Murray-Thomas, G. Hughes, C. H. Mercer, J. Cassell // *Br J Gen Pract*. — 2010. — V. 60. — P. 407–422.
3. Sexually transmitted diseases treatment guidelines. Centers for Disease Control and Prevention: [Електронний ресурс]. URL: <http://www.cdc.gov/std/treatment/2010/>.
4. European Association of Urology (EAU) guidelines. EAU: [Електронний ресурс]. URL: http://www.uroweb.org/fileadmin/EAUN/guidelines/Extended_guidelines_GL_2014_final_April.pdf. Updated 2014.
5. Garthwaite M.A. The implementation of European Association of Urology guidelines in the management of acute epididymo-orchitis. / M.A. Garthwaite, G. Johnson, S. Lloyd, I. Eardley // *Ann R Coll Surg Engl*. — 2007. — V. 89. — P. 799–803.
6. Drury N.E. Management of acute epididymitis: are European guidelines being followed? / N.E. Drury, J.P. Dyer JP, N. Breitenfeldt, A.S. Adamson, G.S. Harrison // *Eur Urol*. — 2004. — V. 46. — P. 522–525.

7. Дубинина Е.Е. Окислительная модификация протеинов, ее роль при патологических состояниях / Е.Е. Дубинина, А.В. Пустыгина // *Український біохімічний журнал*. – 2008. – Т. 80(6). – С. 5–18.
8. Коржов В.И. Белки теплового шока / В.И. Коржов, М.В. Коржов // *Журнал АМН Украины*. – 2008. – Т. 14(1). – С. 26–42.
9. Каримов И.З. Окислительная модификация белков и перекисное окисление липидов в развитии метаболической интоксикации при патологии // *Лабораторная диагностика*. – 2006. – № 1(31). – С. 6–13.
10. Буряк О.Г. Чинники активації вільнорадикального окислення білків у новонароджених з тяжкою дихальною недостатністю / О.Г. Буряк, Ю.Б. Яценко, Д.Ю. Нечитайло // *Клінічна та експериментальна патологія*. – 2010. – Т. X, № 3(33). – С. 45–50.
11. Betteridge D.J. What is oxidative stress? // *Metabolism*. – 2000. – V. 49(2). – P. 3–8.
12. Рябов Г.Я. Окислительная модификация белков плазмы крови у больных в критических состояниях / Г.Я. Рябов, Ю.М. Азизов, С.И. Дорохов и др. // *Анестезиол. и реаниматол.* – 2000. – № 2. – С. 72–75.
13. Мецишен І.Ф. Метод визначення окиснювальної модифікації білків плазми (сироватки) крові // *Бук. мед. вісник*. – 1998. – Т. 2, № 1. – С. 156–158.
14. Мецишен І.Ф., Польовий В.П. Механізм окиснювальної модифікації білків / І.Ф. Мецишен, В.П. Польовий // *Бук. мед. вісник*. – 1999. – Т. 3, № 1. – С. 196–205.
15. Леньга В.Р. Окислювальна модифікація білків крові у дітей з вторинним ацетонемічним синдромом на фоні гострої кишкової інфекції / В.Р. Леньга, Л.В. Пупа // *Лабораторна діагностика*. – 2006. – № 4(38). – С. 14–17.
16. Гаврилюк Н.С. Состояние окислительного гомеостаза при хронических эрозивных состояниях желудка с обоснованием патогенетической терапии // *Український терапевтичний журнал*. – 2008. – № 4. – С. 80–84.
17. Котлукова Н.П. Роль окислительного стресса и антиоксидантной системы в патогенезе врожденных пороков сердца / Н.П. Котлукова, О.И. Артеменко и др. // *Педиатрия*. – 2009. – Т. 87, № 1. – С. 24–28.
18. Buonocore G. Biomarkers of oxidative stress in the fetus and newborn / G. Buonocore, S. Perrone // *Haematologica reports*. – 2006. – V. 2(10). – P. 103–107.
19. Остапченко Д.А. Транспорт и потребление кислорода в критических состояниях / Д.А. Остапченко, Е.В. Шишкина, В.В. Мороз // *Анестезиология и реаниматология*. – 2000. – № 2. – С. 68–70.
20. Hany Aly. The Known and the Unknown about Oxygen Use // *Journal of Perinatology*. – 2004. – V. 24. – P. 335–336.
21. Shadid M. The effect of antioxidative combination therapy on post hypoxic ischemic perfusion / M. Shadid, R. Moison, P. Steendijk // *Metabolism and Research*. – 2008. – V. 44, N 9. – P. 119–124.
22. Suzuki Y.J. Oxidants as stimulators of signal transduction / Y.J. Suzuki, H.J. Forman, A. Sevanian // *Free Rad. Biol. Med.* – 2007. – V. 22. – P. 269–285.

Реферат

ДИНАМИКА ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ МОДИФИКАЦИИ БЕЛКОВ ПЛАЗМЫ КРОВИ У БОЛЬНЫХ ОСТРЫМ ЭПИДИДИМИТОМ ПОД ВЛИЯНИЕМ ЛЕЧЕНИЯ

Е. А. Литвинец, В.Р. Балабаник

В нашем исследовании была выполнена попытка выяснения диагностической и прогностической значимости уровня окислительной модификации белков в плазме крови больных острым эпидидимитом в течение лечения. Во всех обследованных пациентов до лечения обнаружили

Summary

DYNAMICS OF OXIDATIVE MODIFICATION OF BLOOD PLASMA PROTEINS IN PATIENTS WITH ACUTE EPIDIDYMITIS UNDER THE INFLUENCE OF TREATMENT

Ye. A. Litvinets, V.R. Balabanyk

In our study, an attempt was made to elucidate the diagnostic and prognostic significance of the level of oxidative modification of proteins in the blood plasma of patients with acute epididymitis during treatment. In all examined patients before

повышение уровня продуктов окислительной модификации белков. В период поступления в стационар у всех больных с острым эпидидимитом уровни продуктов окислительной модификации белков оказались высокими, что свидетельствует о высоком оксидативном стрессе при данном заболевании. Во время лечения эти показатели постепенно снижались до нормы. Полученные данные могут быть использованы как для мониторинга лечения, так и выздоровления больных.

Ключевые слова: острый эпидидимит, активированные формы кислорода, оксидативный стресс, уровни окислительной модификации белков плазмы крови.

Адреса для листування

В.Р. Балабаник

E-mail: basil_bvr@i.ua

<https://orcid.org/0000-0001-6524-0425>

treatment, an increase in the level of products of oxidative modification of proteins was detected. During the period of admission to hospital all levels of products of oxidative modification of proteins were high in all patients with acute epididymitis, which indicates a high oxidative stress in this disease. During treatment, these rates gradually decreased to normal. The obtained data can be used both for monitoring of treatment and for recovery of patients.

Key words: acute epididymitis, activated oxygen forms, oxidative stress, levels of oxidative modification of plasma proteins.