

*Семянив И.А., Семянив М.Н., Шепетюк И.А., Гресько А.С.*

## **ОКИСЛИТЕЛЬНАЯ МОДИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ И ОГРАНИЧЕННЫЙ ПРОТЕОЛИЗ В ГЕПАТОЦИТАХ БОЛЬНЫХ С ВПЕРВЫЕ ДИАГНОСТИРОВАННЫМ ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ**

*ВГУЗ Украины «Буковинский государственный медицинский университет»,  
кафедра фтизиатрии и пульмонологии  
г. Черновцы*

**Ключевые слова:** впервые диагностированный туберкулез, протеолиз, окислительная модификация белков.

**Резюме:** Туберкулез легких приводит к усилению процессов свободнорадикального окисления белков с характерными эффектами - рост ограниченного протеолиза и окисления аминок групп белков - в гепатоцитах печени. Интенсивность этих процессов имеет линейный характер роста от I к III зоне ацинуса. У больных резистентными формами туберкулеза средние показатели коэффициента R / B при специфической окраске на кислые и основные белки по Микель-Кальво и величины оптической плотности специфической окраски на свободные аминок группы белков по А. Yasuma и Т. Ichikava в 1,32 и 1,15 раз выше по сравнению с больными впервые диагностированным чувствительным туберкулезом, а у больных с мультирезистентными формами соответственно в 1,71 и 1,25 раз.

**Resume:** Pulmonary tuberculosis leads to a strengthening of free radical oxidation of proteins with characteristic effects - growth limited proteolysis and oxidation of amino groups of proteins - hepatocytes in the liver. The intensity of these processes has a linear increase from I to III acinus zone. In patients with resistant forms of tuberculosis average ratio R / B with a specific color in acidic and basic proteins by Michele Calvo and optical density values of a specific color to the free amino groups of proteins by A. Yasuma and T. Ichikava at 1.32 and 1.15 times higher compared with patients with sensitive tuberculosis, and in patients with multi-resistant forms respectively 1.71 and 1.25 times.

**Актуальность.** Туберкулез (ТБ) продолжает оставаться глобальной проблемой человечества [5]. В последние годы существенно возрастает распространенность коморбидной соматической патологии во фтизиатрической практике. Это создает определенные трудности при назначении лечения, требует индивидуального подхода в выборе препаратов с учетом вероятностей развития побочных эффектов и неблагоприятных взаимодействий с другими лекарственными препаратами. Анализ доступных источников литературы показал, что среди больных химиорезистентным туберкулезом в 62,5% случаев выявляется патология пищеварительной системы [3].

Важную роль в патогенезе формирования как ТБ, так и хронического гепатита, играют нарушения иммунного гомеостаза, особенно у больных с выраженными симптомами обострения заболевания и длительным рецидивирующим течением [1, 4]. В случае коморбидности ТБ наслаивается на хроническое течение панкреатита, что создает определенные трудности в назначении полноценной антимикобактериальной терапии (АМБТ) и снижает эффективность этиотропного лечения [2, 3].

**Цель:** установить влияние антимикобактериальной терапии на функциональное состояние гепатоцитов у больных с впервые диагностированным туберкулезом легких.

**Задачи:** исследовать окислительную модификацию белков и ограниченный протеолиз в гепатоцитах больных с впервые диагностированным туберкулезом.

**Материал и методы.** Проведено проспективное патоморфологическое исследования 60 случаев смерти больных, умерших по различным причинам, у которых в заключительном клиническом и патологоанатомическом диагнозах в качестве основного заболевания фигурировал туберкулез легких. В зависимости от клинических форм и вариантов туберкулеза основная группа была разделена на три подгруппы. Так, первую подгруппу основной группы составили 19 случаев, у которых клинически был установлен диагноз впервые диагностированного туберкулеза (ВДТБ), во вторую подгруппу вошел 21 случай полирезистентного туберкулеза (ПРТБ) и третью – 20 случаев мультирезистентного туберкулеза (МРТБ). Группу сравнения составили 20 трупов лиц без патологии пищеварительной системы и морфологических признаков туберкулезной инфекции. Изучалась первичная медицинская учетная документация: медицинские карты стационарного больного (ф. № 003 / у) и протоколы патологоанатомических исследований (ф. № 103 / у).

Для оценки интенсивности свободнорадикальных процессов в гепатоцитах нами была использована методика, разработанная Давыденко И.С., 2003, которая сочетает давно разработанный метод окрашивания Микель-Кальво с бромфеноловым синим для визуальной оценки соотношения "кислых" (с преобладанием карбонильных групп) и "основных" (с преобладанием аминокрупп) белков и компьютерный спектральный анализ цифровой копии оптического изображения. Гистологические срезы окрашивали бромфеноловым синим по Микель-Кальво. Затем оптические изображения с помощью цифровой фотокамеры переводили в цифровые (формат цифровых данных – Target Image File Format, без алгоритма сжатия), а последние анализировали с помощью компьютерной программы GIMP (лицензия GPL, 2012, версия 2,82) путем зондовой компьютерной микроспектрометрии в системе анализа цвета "RGB" (от англ.- Red, Green, Blue). Согласно указанной системе анализа цвета оценивали интенсивность красного и синего цвета в окраске. Поскольку красный цвет при методике Микель-Кальво соответствует карбонильным группам, а синий – аминокруппам белков, то путем выявления соотношения между интенсивностью окраски обоих цветов (участки спектра) можно оценить степень ОМБ. Таким образом, о степени ОМБ в гистохимических препаратах судили по величине коэффициента R / B (красный / синий), который определяли отдельно в гепатоцитах первой, второй и третьей зон.

Для верификации и количественной оценки свободных аминокрупп белков была использована стехиометрическая нингидриново-шиффовская реакция по А. Yasuma и Т. Ichikava, которая позволяет оценить степень ограниченного протеолиза, в результате которого частично «открываются» скрытые аминокруппы белков. Количественной мерой ограниченного протеолиза служила величина оптической плотности в относительных единицах оптической плотности (от 0 – отсутствие окраски, абсолютная прозрачность, до 1 –

максимальная окраска, абсолютная непрозрачность), которую измеряли на цифровых монохромных копиях изображения путем компьютерной микроденситометрии с помощью компьютерной программы GIMP (лицензия GPL, 2012, версия 2,82). Определение оптической плотности специфической окраски на свободные аминокгруппы белков проводили отдельно в гепатоцитах первой, второй и третьей зон ацинуса.

**Результаты и их обсуждение.** Печень выполняет большинство жизненно важных метаболических функций в организме и является основным органом, который обеспечивает метаболизм (детоксикацию) экзо- и эндогенных токсинов, лекарственных средств и ксенобиотиков. Эти функции требуют интенсивного аэробного метаболизма для образования достаточного количества АТФ в митохондриях гепатоцитов. Такая метаболическая активность приводит к постоянному формированию активных форм кислорода. В дополнение нужно отметить, что метаболизм лекарственных средств и повреждение гепатоцитов с воспалением могут существенно увеличить интенсивность свободнорадикальных процессов, как в каждом отдельном гепатоците, так и в органе в целом. Указанные процессы еще более интенсифицируются в условиях гипоксии, вызванной поражением легких.

Окислительный стресс приводит к увеличению продукции активных форм кислорода и как следствие – окислительной модификации белков: их агрегации и фрагментации, что сопровождается необратимыми изменениями физико-химических и биологических свойств белковой молекулы. Из данных литературы, посвященной процессам ОМБ, известно, что белки, в которых имеет место их окислительная модификация, значительно легче поддаются протеолизу. Поэтому рост интенсивности ОМБ должен сопровождаться увеличением свободных аминокгрупп белков и, в крайнем варианте (при нарушении адекватной регенерации белков), даже снижением общего содержания белка.

Учитывая различную функциональную активность гепатоцитов различных зон ацинуса (по Rappoport) по данным литературы и результатов собственных исследований коэффициент R / B при специфической окраске на кислые и основные белки по Микель-Кальво и средние величины относительных единиц оптической плотности специфической окраски на свободные аминокгруппы белков по А. Yasuma и Т. Ichikava определяли отдельно в гепатоцитах первой, второй и третьей зон (таблица 1).

**Таблица 1.** Коэффициент R/B при специфической окраске на кислые та основные белки по Микель-Кальво в гепатоцитах больных туберкулезом легких и в группе сравнения ( $X \pm Sx$ ). Компьютерная микроспектрометрия

Зоны ацинуса (по Rappoport)	Группы исследования			
	Группа сравнения (n=20)	Основна група		
		Подгруппа I (n=19)	Подгруппа II (n=21)	Подгруппа III (n=20)
I зона	1,09±0,008	1,27±0,014*	1,73±0,041**	2,05±0,072#

II зона	1,11±0,004	1,39±0,009*	1,81±0,032**	2,34±0,094#
III зона	1,13±0,012	1,48±0,041*	1,95±0,063**	2,68±0,108#

Примечание: \* Достоверно по сравнению с группой сравнения  $p < 0,01$ ;

\*\* Достоверно по сравнению с подгруппой I при  $p < 0,01$ ;

# Достоверно по сравнению с подгруппой II при  $p < 0,01$ .

При сравнении цифровых данных в гепатоцитах различных зон группы сравнения изменения свойств белков в средних тенденциях протекают практически одинаково. Так, при сравнении коэффициента R / B (специфической окраски на кислые и основные белки по Микель-Кальво) в гепатоцитах I, II и III зон группы сравнения разница недостоверна ( $p > 0,05$ ). Аналогичная тенденция прослеживается при анализе средних величин оптической плотности специфической окраски на свободные аминокгруппы белков по A. Yasuma и T. Ichikava.

В первой подгруппе основной группы исследования показатели коэффициента R / B и средних величин оптической плотности специфической окраски на свободные аминокгруппы белков по A. Yasuma и T. Ichikava достоверно отличаются от группы сравнения ( $p < 0,01$ ). В гепатоцитах II подгруппы основной группы средние показатели коэффициента R / B и величины оптической плотности специфической окраски на свободные аминокгруппы белков в 1,32 и 1,15 раз выше по сравнению с подгруппой I, а в подгруппе III превышают показатели подгруппы II в 1,71 и 1,25 раз соответственно. Такая тенденция указывает на усиление процессов свободнорадикального окисления белков с характерными эффектами – рост ограниченного протеолиза и окисления аминокгрупп белков – в гепатоцитах больных ПРТБ и МРТБ.

Анализ показателей соответственно зоне ацинуса (по Rappoport) выявил линейный характер роста интенсивности ОМБ и ограниченного протеолиза от I к III зоне (от перипортальных к центрлобулярным отделаам ацинуса) во всех подгруппах основной группы.

**Выводы:** Туберкулез легких приводит к усилению процессов свободно-радикального окисления белков с характерными эффектами – рост ограниченного протеолиза и окисления аминокгрупп белков – в гепатоцитах печени. Интенсивность этих процессов имеет линейный характер роста от I к III зоне ацинуса. У больных ПРТБ средние показатели коэффициента R / B при специфической окраске на кислые и основные белки по Микель-Кальво и величины оптической плотности специфической окраски на свободные аминокгруппы белков по A. Yasuma и T. Ichikava в 1,32 и 1,15 раз выше по сравнению ВДТБ, а у больных МРТБ соответственно в 1,71 и 1,25 раз.

#### Литература

1. Губергриц Н.Б. Лекарственный гепатит: патогенез, классификация, диагностика, лечение / Н.Б. Губергриц, Г.М. Лукашевич, А.Е. Клочков // Вестник Клуба панкреатологов. – 2011. – №3. – С.16-20.

2. Зозуляк В.И. Своевременное выявление признаков печеночной дисфункции у больных деструктивным туберкулезом / В.И. Зозуляк, А.О. Клименко, И.И. Пилипенко // Материалы XV Конгресса Всемирной федерации украинских врачебных обществ. - Киев - Черновцы, 2014. – С.54.
3. Kaplowitz N. Drug-induced liver disease / N. Kaplowitz, L.D. DeLeve. – New York: Informa Healthcare, 2007. – 812p.
4. Suriawinata A.A. Liver pathology. An Atlas and Concise Guide / A.A. Suriawinata, S.N. Thung. – New York: Demosmedical, 2011. – P. 101-104.
5. Todoriko, L. Analysis of the GSTM1 gene polymorphism in patients with tuberculosis with regard to the version of MBT resistance / L. Todoriko, I. Semianiv// Science and Education a New Dimension. Natural and Technical Sciences. – 2016. – Issue: 83, № IV (9). – P. 61-63.

Репозиторий БГМУ