

## **Окислительная модификация белков сыворотки крови у больных острым холециститом**

*Белорусский государственный медицинский университет,<sup>1</sup>  
ГУ «Республиканский научно-практический центр гигиены»<sup>2</sup>*

Установлено, что развитие острого холецистита сопровождается интенсификацией окислительной модификации белков сыворотки крови и их конформационными изменениями. Уровни битирозина и продуктов неферментативного гликозилирования белков являются прогностическими факторами выявления острого деструктивного холецистита. В результате проведенного анализа их диагностической значимости обоснована целесообразность использования битирозина в качестве раннего маркера деструктивных изменений желчного пузыря. Ключевые слова: острый холецистит, окислительная модификация белков, битирозин, гликозилированные белки.

Развитие острого холецистита (ОХ) сопровождается возникновением и прогрессированием синдрома эндогенной интоксикации (ЭИ), выраженность которого обусловлена патоморфологическими изменениями желчного пузыря, длительностью заболевания, микробиологическими характеристиками желчи и др. [1,8,20,30].

Существенным фактором, влияющим на развитие ЭИ, независимо от этиологии последней, является активация свободнорадикальных процессов, реализующаяся в виде перекисного окисления липидов, окислительной модификации белков (ОМБ), нуклеиновых кислот [9,12,14].

Усиление этих процессов приводит к нарушению существующего в физиологических условиях баланса между анти- и прооксидантными системами в сторону повышения активности последних, т.е. возникновению окислительного стресса (ОС) [25]. ОС сопровождается неконтролируемой генерацией активных форм кислорода, которые способны нарушать структуру и функцию клеточных мембран, приводить к тяжелым нарушениям клеточного метаболизма, существенным изменениям гомеостаза [4,10,15]. Поэтому необходимость диагностики и возможность коррекции ОС, как одной из причин ЭИ у больных хирургического профиля, имеют существенное значение в условиях современной клиники.

В последние годы внимание исследователей привлекает роль ОМБ в патогенезе острых воспалительных процессов. Показано, что окисление белков является надежным и ранним маркером окислительных повреждений [18,22]. Имеющиеся в литературе данные свидетельствуют, что в условиях ОС под влиянием активных форм кислорода происходят изменения в структуре белковых молекул, нарушающие ее физико-химические и биологические свойства [17]. Измененные белковые молекулы легче подвергаются протеолизу с образованием пептидов средней молекулярной массы, которые являются одним из компонентов ЭИ [12,32]. ОМБ генерирует новые антигены и провоцирует иммунный ответ [24,31]. Продукты такой модификации могут служить причиной вторичного повреждения других биомолекул [27,31]. Несмотря на наличие отдельных работ,

свидетельствующих об усилении ОМБ при острых воспалительных процессах брюшной полости [2,12,28], ее роль в патогенезе ОХ не выяснена.

Цель проведенного нами исследования – изучение интенсивности окислительной модификации белков сыворотки крови, а также анализ их структурных изменений у больных ОХ в динамике пред- и послеоперационного периода.

#### Материал и методы

Обследовано 46 пациентов, поступивших в 10 ГКБ г. Минска с диагнозом острый холецистит. Длительность заболевания составила от 6 до 48 часов. В зависимости от эффективности консервативного лечения все больные были разделены на 3 клинические группы. В 1-ю группу вошли 15 больных, консервативное лечение у которых привело к регрессу клинических симптомов; они были выписаны без операции. У пациентов 2-й группы (n=11) при морфологическом исследовании удаленного желчного пузыря не было выявлено деструктивных изменений. 3-ю группу составили 20 человек; у всех пациентов данной группы при гистологическом исследовании операционных препаратов были выявлены деструктивные изменения в желчном пузыре. Контрольную группу составили 15 практически здоровых доноров.

Исследование производили в день поступления, перед операцией, а также после операции-на 2-3-и и на 7-8-е сутки; у больных 1-й группы определения производились в день поступления, на 2-3-и и 4-5-е сутки.

Окислительную модификацию белков сыворотки крови регистрировали по накоплению битирозина, продуктов неферментативного гликозилирования белков (ПНГБ) и флуоресценции остатков триптофана.

Флуоресценцию битирозина в сыворотке крови измеряли при  $\lambda_{возб.} = 325$  нм и  $\lambda_{исп.} = 416$  нм [5,17]. Флуоресценцию триптофанилов белков сыворотки крови изучали при  $\lambda_{возб.} = 297$  нм и  $\lambda_{исп.} = 336$  нм [5,17]. Содержание гликозилированных белков в сыворотке крови определяли флуориметрическим методом при  $\lambda_{возб.} = 370$  нм и  $\lambda_{исп.} = 445$  нм [26].

Анализ структурных изменений белков сыворотки крови проводили с использованием белкового зонда – 1-анилино-8-нафталинсульфоната (АНС; «Fluka», Германия). АНС использовали в конечной концентрации 8 мкМ. Спектры флуоресценции АНС регистрировали при  $\lambda_{возб.} = 380$  нм и  $\lambda_{исп.} = 490$  нм [3].

Интенсивность флуоресценции выражали в условных единицах. Измерения выполнены на спектрофлуориметре СМ 2203 (ЗАО «Солар», Беларусь).

Статистическую обработку результатов проводили с применением пакета прикладных программ MS Excel и «Statistica 6.0 for Windows». Данные представлены в виде  $M \pm m$ , где  $M$  – среднее выборочное,  $m$  – ошибка среднего. Для количественных нормально распределённых признаков оценку статистической достоверности проводили при помощи критерия Стьюдента ( $t$ ). При отличном от нормального распределении признаков использовали непараметрические критерии. Различия считали достоверными при вероятности ошибки  $P < 0,05$ . Для выявления значимости предлагаемых прогностических факторов использовали однофакторный дисперсионный анализ.

#### Результаты и обсуждение

Как видно из представленных в таблице 1 данных, у больных с ОХ 1-й и 3-й групп при поступлении отмечалось повышение интенсивности ОМБ, о чем свидетельствовало достоверное увеличение содержания битирозина и продуктов

неферментативного гликозилирования белков в сыворотке крови по сравнению с контрольной группой. Наибольшее содержание продуктов ОМБ было отмечено в группе больных с острым деструктивным холециститом (ОДХ) при поступлении в стационар. Через 48-72 часа, несмотря на проводимую консервативную терапию, у этих пациентов сохранялось достоверное повышение уровня битирозина и ПНГБ относительно контрольных значений. У больных с регрессирующим течением ОХ на 5-6 сутки от момента госпитализации уровень битирозина незначительно снижался, оставаясь, тем не менее, выше контрольных значений, а содержание ПНГБ продолжало повышаться. У больных с ОДХ на 2-3 сутки послеоперационного периода уровень битирозина снижался до контрольных значений. Содержание ПНГБ в послеоперационном периоде было достоверно повышенным по сравнению с контрольными значениями.

Таблица 1

Динамика изменений интенсивности ОМБ у больных с ОХ

Сроки определения	Показатели			
	Битирозин, усл.ед.	Флуоресценция триптофанов, усл.ед.	ПНГБ, усл.ед.	Интенсивность флуоресценции АНС (I <sub>exc</sub> ), усл.ед.
Контроль	0,79 ± 0,020	12,5 ± 0,76	0,35 ± 0,057	25,5 ± 0,85
1-я группа				
При поступлении	1,09 ± 0,09*	12,18 ± 0,83	0,68 ± 0,05*	23,25 ± 0,7*
2-3 сутки	1,44 ± 0,28*	13,29 ± 0,74	0,94 ± 0,25*	
5-6 сутки	1,38 ± 0,29*	13,72 ± 1,17	1,18 ± 0,42*	
2-я группа				
При поступлении	0,78 ± 0,10	11,44 ± 1,41	0,56 ± 0,17	20,47 ± 1,15*
Перед операцией	0,97 ± 0,16	10,13 ± 3,48	0,5 ± 0,05	20,61 ± 3,68
2-3 сутки после операции	0,86 ± 0,08	13,98 ± 0,95	0,56 ± 0,06*	23,37 ± 1,05
7-8 сутки после операции	0,71 ± 0,11	14,49 ± 1,03	0,46 ± 0,09	26,62 ± 2,85
3-я группа				
При поступлении	1,92 ± 0,29*#	10,62 ± 0,79	1,97 ± 0,38*	19,34 ± 0,62*
Перед операцией	1,04 ± 0,12*	13,4 ± 0,73	0,63 ± 0,05*	23,24 ± 0,96
2-3 сутки после операции	0,85 ± 0,13	12,7 ± 0,69	0,46 ± 0,03	23,57 ± 1,15
7-8 сутки после операции	1,12 ± 0,31	13,53 ± 0,37	0,66 ± 0,14*	19,81 ± 0,65

Примечание: \*p<0,05 – достоверность по сравнению с контролем, # p<0,05 – достоверность по сравнению с группой 2.

Флуоресценция остатков триптофана у больных с ОХ статистически достоверно не изменялась (табл. 1).

Анализ структурных изменений белков сыворотки крови был проведен с использованием белкового флуоресцентного зонда – АНС. Полученные данные свидетельствуют о достоверном снижении интенсивности свечения зонда АНС у больных с ОХ во всех исследованных нами группах (табл.1).

Свободнорадикальное окисление белков приводит к образованию различных производных аминокислот, таких как модифицированные остатки триптофана, продукты неферментативного гликозилирования белков, битирозин, уровни содержания которых могут использоваться для оценки степени окислительной модификации белков при различных патологических состояниях [5,6,21,23]. Битирозин образуется в ходе одноэлектронного окисления тирозина, когда возникающий долгоживущий тирозил-радикал при взаимодействии с таким же радикалом формирует битирозиновые сшивки. Повышение уровня битирозина в сыворотке крови и тканях экспериментальных животных и человека принято считать наиболее надежным маркером ОМБ, отражающим, как динамику, так и интенсивность процесса. Это обусловлено тем, что битирозин не утилизируется

протеиназами, а является химически устойчивым соединением в отличие от других продуктов ОМБ [16,19,21].

Продукты неферментативного гликозилирования белков образуются в результате присоединения молекулы глюкозы к аминогруппе белка и последующих превращений образовавшегося соединения, протекающих без участия ферментов. Процессы гликозилирования белков тесно связаны со свободно-радикальными процессами; показано, что содержание ПНГБ увеличивается в условиях ОС [29]. Выявленное нами достоверное повышение содержания битирозина и ПНГБ у больных с ОДХ свидетельствует об интенсификации процессов ОМБ при наличии деструктивных форм воспаления желчного пузыря, чего не наблюдалось у пациентов с катаральным ОХ. Отмеченное достоверное повышение содержания битирозина и ПНГБ в группе пациентов с регрессирующим ОХ, на наш взгляд, может объясняться тем, что у некоторых из них при поступлении имелся острый флегмонозный холецистит, но в результате проведенного консервативного лечения наступило купирование воспалительного процесса. Последнее согласуется с высказываемым в литературе мнением о возможных вариантах течения острого флегмонозного холецистита [7].

Использование однофакторного дисперсионного анализа позволило установить, что уровни битирозина и ПНГБ являются прогностическими факторами выявления ОДХ.

Для количественной характеристики диагностической значимости этих показателей нами были использованы: диагностически значимый уровень; чувствительность и специфичность, характеризующие надежность теста; прогностическая ценность положительного и отрицательного результата, оценивающие его прогностическую значимость; точность, или диагностическая эффективность теста, которая является интегральным показателем, определяемым его чувствительностью и специфичностью [13] (табл. 2).

Таблица 2

Показатели диагностической значимости определения уровня битирозина и ПНГБ в сыворотке крови больных с ОХ

Показатель	Битирозин, усл.ед.	ПНГБ, усл.ед.
Диагностически значимый уровень	1,02	0,87
Чувствительность	76,9 %	69,2 %
Специфичность	100,0 %	80,0 %
Прогностическая ценность положительного результата	66,67 %	69,2 %
Прогностическая ценность отрицательного результата	37,5 %	50,0 %
Точность (диагностическая эффективность)	83,3 %	72,2 %

Установленная нами высокая диагностическая эффективность определения уровня битирозина в сыворотке крови больных с ОДХ при поступлении в стационар, на наш взгляд, обосновывает целесообразность использования его в качестве раннего маркера деструктивных изменений желчного пузыря.

Основная цель изучения флуоресценции зонда АНС – получение информации об изменении конформации белков, и, соответственно, их функциональной активности, поскольку последняя неразрывно связана со структурой белковой молекулы. Как известно, интенсивность свечения зонда АНС определяется количеством и локализацией центров связывания зонда в белковой макромолекуле. По мнению [3], снижение интенсивности свечения зонда АНС

может быть обусловлено как возникновением на поверхности окисленного белка отрицательно заряженных карбоксильных и карбонильных групп, появление которых снижает степень связывания зонда с белком, так и «тушением» его флуоресценции продуктами перекисного окисления. Таким образом, изменение интенсивности свечения зонда говорит об изменениях структуры белков сыворотки крови, обусловленных активацией свободно-радикальных процессов [3].

В результате проведенных нами исследований выявлено достоверное изменение интенсивности свечения зонда АНС у больных с ОХ во всех исследованных группах (табл. 1), что указывает на наличие конформационных изменений белков сыворотки крови при остром воспалении желчного пузыря.

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют, что развитие острого холецистита сопровождается интенсификацией окислительной модификации белков сыворотки крови и их конформационными изменениями.

#### Выводы

1. У больных с острым холециститом отмечено нарастание интенсивности окислительной модификации белков сыворотки крови, в наибольшей степени выраженное при деструктивных изменениях желчного пузыря.
2. Битирозин и продукты неферментативного гликозилирования белков сыворотки крови являются прогностическими факторами выявления острого деструктивного холецистита. Уровень битирозина в сыворотке крови больных с острым деструктивным холециститом при их поступлении в стационар может быть использован в качестве раннего маркера деструктивных изменений желчного пузыря.
3. У больных с острым холециститом выявлены изменения структуры белков сыворотки крови.

#### Литература

1. Аль-Аудат Незар Ахмед. Синдром эндогенной интоксикации при остром холецистите (клиника, диагностика, лечение).-Автореф. дисс. канд. мед. наук. Волгоград, 1999. 22 с.
2. Богдан, В. Г., Гаин, Ю. М., Алексеев, С. А. Маркеры системной воспалительной реакции в диагностике абдоминального сепсиса // Материалы XIII съезда хирургов Республики Беларусь «Проблемы хирургии в современных условиях». Гомель. 2006. Т. 1. С. 53-54.
3. Владимиров, Ю. А., Добрецов, Г. Е. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. М: Наука, 1980. 320 с.
4. Дубинина, Е. Е. Роль активных форм кислорода в качестве сигнальных молекул в метаболизме тканей при состоянии окислительного стресса / Вопр. мед. химии. 2001. Т.47. № 6. С. 561-581.
5. Дубинина, Е. Е., Гавровская, С. В., Кузьмич, Е. В. и др. Окислительная модификация белков: окисление триптофана и образование в очищенных белках с использованием системы Фентона // Биохимия. 2002. Т. 67. С. 413-421.
6. Дубинина, Е. Е., Шугалей, И. В. Окислительная модификация белков. Успехи современной биологии. 1993. Т. 113. № 1. С. 71-79.
7. Желчная гипертензия и острый холецистит / Бебуришвили А. Г. // «50 лекций по хирургии» М: «Медиа Медика», 2003. С. 204-215.

8. Жидовинов, А. А., Зурнаджянц, В. А., Жидовинов, Г. И. Значение лабораторных маркеров эндотоксикоза и цитокинового профиля в диагностике и эффективности лечения осложненных форм острого холецистита.-Цитокины и воспаление. 2006. Т. 5. № 3. С. 27-33.
9. Новочадов, В. В., Писарев, В. Б. Эндотоксикоз: моделирование и органопатология. Волгоград: изд-во ВолГМУ. 2004. 240 с.
10. Пасечник, И. Н. Механизмы повреждающего действия активированных форм кислорода на биологические структуры у больных в критических состояниях / Вестн. интенсивной терапии. 2001. № 4. С. 3-9.
11. Пасечник, И., Н. Окислительный стресс и критические состояния у хирургических больных. Вестник интенсивной терапии. 2004. № 3. С. 27-31.
12. Пасечник, И. Н. Окислительный стресс как компонент формирования критических состояний у хирургических больных. Автореф. дисс. докт. мед.наук. М. 2004. 46 с.
13. Флетчер, Р., Флетчер, С., Вагнер, Э. Клиническая эпидемиология. Основы доказательной медицины. М.: Медиа Сфера, 1998. 352 с.
14. Alam, K, Moinuddin, Jabeen, S. Immunogenicity of mitochondrial DNA modified by hydroxyl radical. Cell Immunol. 2007 May;247(1):12-7.
15. Betteridge, D.J. What is oxidative stress? // Metabolism. 2000 Feb; 49 (2 Suppl 1): 3-8.
16. Bhattacharjee, S., Pennathur, S., Byun, J. et al. NADPH oxidase of neutrophils elevates o, o'-dityrosine cross-links in proteins and urine during inflammation. Arch Biochem Biophys. 2001 Nov 1;395(1):69-77.
17. Davies, K.J. Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. General aspects // J. Biol. Chem. 1987. Vol. 262, № 20. P. 9895 – 9901.
18. Dean, R.T., Fu, S., Stocker, R. et al. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. // Biochem. J. 1997. Vol. 324. P. 1-18.
19. DiMarco, T., Giulivi, C. Current analytical methods for the detection of dityrosine, a biomarker of oxidative stress, in biological samples. Mass Spectrom Rev. 2007 Jan-Feb;26(1):108-20.
20. Girgin, S., Gedik, E., Tacyildiz, I.H. et al. Factors affecting morbidity and mortality in gangrenous cholecystitis. Acta Chir Belg. 2006 Sep-Oct;106(5):545-9.
21. Huggins, T.G., Wells-Knecht, M.C., Detorie, N.A. et al. Formation of o-tyrosine and dityrosine in proteins during radiolytic and metal-catalyzed oxidation. J Biol Chem. 1993 Jun 15;268(17):12341-7.
22. Jackson, M.J. An overview of methods for assessment of free radical activity in biology. // Proc. Nutr. Soc. 1999. Vol. 58. P. 1001-1006.
23. Jennings, P.E. Vascular benefits of gliclazide beyond glycemic control. Metabolism. 2000 Oct;49(10 Suppl 2):17-20.
24. Lambeth, J.D. Nox enzymes, ROS, and chronic disease: an example of antagonistic pleiotropy. Free Radic Biol Med. 2007 Aug 1;43(3):332-47.
25. McCord, J.M. The evolution of free radicals and oxidative stress.// Am J Med. 2000 Jun 1;108 (8):652-9.
26. Munch, G., Keis, R., Wessels, A. et al. Determination of advanced glycation end products in serum fluorescence spectroscopy and competitive ELISA. Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 1997; 35: 669-677.

27. Piroddi, M., Depunzio, I., Calabrese, V. et al. Oxidatively-modified and glycated proteins as candidate pro-inflammatory toxins in uremia and dialysis patients. *Amino Acids*. 2007;32(4):573-92.
28. Reinheckel, T., Nedelev, B., Prause, J. et al. Occurrence of oxidatively modified proteins: an early event in experimental acute pancreatitis. *Free Radic Biol Med*. 1998 Feb;24(3):393-400.
29. Sathiyapriya, V., Selvaraj, N., Nandeesha, H. et al. Enhanced glycation of hemoglobin and plasma proteins is associated with increased lipid peroxide levels in non-diabetic hypertensive subjects. *Arch Med Res*. 2007 Nov;38(8):822-6.
30. Shih, S.C., Chu, C.S., Jeng, K.S. et al. Correlation of toxic signs, ultrasonographic findings and pathological changes in cholecystitis. // *Zhonghua Yi Xue Za Zhi (Taipei)*. 1996 Oct;58(4):259-63.
31. Squier, T.C. Oxidative stress and protein aggregation during biological aging. *Exp Gerontol*. 2001 Sep;36(9):1539-50.
32. Wolff, S.P., Dean, R.T. Fragmentation of proteins by free radicals and its effect on their susceptibility to enzymic hydrolysis. *Biochem J*. 1986 Mar 1;234(2):399-403.