

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

© Колектив авторів, 2004
УДК 616.34-008.314.4:577.1:616-018.1-092+616.155.3

**І.З. Карімов, П.С. Аршинов, Н.Г. Лось-Яценко, О.А. Одинець, А.О. Дегтярьова,
Л.Г. Кузнєцова, М.В. Берегова, А.А. Мустафаєва**

ЗМІНА ОКСИНОЇ МОДИФІКАЦІЇ БІЛКІВ СИРОВАТКИ КРОВІ ТА ДНК ЛЕЙКОЦИТІВ ПРИ ГОСТРИХ КИШКОВИХ ІНФЕКЦІЯХ

Кримський державний медичний університет ім. С.І. Георгієвського

Досліджено вміст карбонільних груп білків у сироватці крові та морфологічний стан ДНК лейкоцитів 96 хворих на гострі кишкові інфекції в динаміці захворювання. Показано підвищення рівня окисної модифікації білків крові, а також виявлена фрагментація ДНК лейкоцитів – залежно від етіології, ступеня тяжкості та періоду недуги. Виявлено прямий кореляційний зв'язок між рівнем окисної модифікації білків сироватки крові і частотою виявлення деградації ДНК лейкоцитів у гострому періоді захворювання.

В останні роки серед інфекційних хвороб, за даними ВООЗ, найбільш розповсюдженими є бактерійні та вірусні діареї. Отримані нові дані, що наближають нас до розуміння інфекційного процесу на клітинному, субклітинному та молекулярному рівнях. Значно поглиблені уявлення про патогенез дегідратаційного та інфекційно-токсичного шоку, що ускладнюють тяжкий перебіг ряду кишкових інфекцій, описані численні токсичні ефекти ендо- і екзотоксинів мікроорганізмів, продуктів вільно-радикального окислення. Разом з тим багато аспектів патогенезу цього клінічного синдрому вивчені недостатньо [1].

Відомо, що активні форми кисню (АФК) відіграють винятково важливу роль у багатьох фізіологічних реакціях, що відбуваються в клітині: від регуляції кров'яного тиску (оксид азоту) до участі в лізисі мікробів фагоцитуючою клітиною.

Описано безліч токсичних ефектів вільних радикалів (ВР): лізис клітинних мембран, інактивація протеаз, розщеплення гіалуронової кислоти, колагену та ін. Підвищена продукція ВР може призводити до незворотних ушкоджень багатьох клітинних структур, включаючи мембрану, цитоскелет і ДНК.

Пошкоджуючий ефект АФК може бути реалізований як безпосередньо ними, так і проміжними

чи кінцевими продуктами радикальних реакцій, ініційованих АФК. Різні спирти, альдегіди, гідрокARBони, будучи продуктами переокислення ліпідів (ПОЛ), можуть викликати порушення синтезу білків, зміну судинної проникності та характеру запальної реакції. Особливо небезпечні ушкодження ДНК, що виникають у ході процесів переокислення, тому що такі ушкодження нерідко викликають незворотну поломку геному. Деякі автори вважають, що в стані окисного стресу на атаку за рахунок АФК наражаються передусім не ліпіди, а білки плазматичних мембран, що призводить до їх деполімеризації та лізису клітини [2].

Вважається, що білки складають основну «робочу силу» для всіх видів біологічної роботи. Агресія ВР щодо білків змінює їх фізико-хімічні властивості, що є причиною клітинних порушень, важлива частина якого – це окислювання амінокислотних залишків та білків з утворенням карбонільних груп. Крім того, карбогідрати і ліпідні деривати можуть реагувати з білками, утворюючи аддукти. Вміст карбонільних груп білка в крові – найширше використовуваний маркер окисної модифікації білків (ОМБ) [3, 4].

Деякі автори [5] вважають, що поєднання модифікації білків і деградації хімічно змінених білків – це один з нормальних шляхів їх обміну, і називають цей процес «хімічним апоптозом», що є одним з ранніх проявів запрограмованої клітинної смерті. Передбачається, що окисне ушкодження ДНК клітин є важливою ланкою в патогенезі хронічного гепатиту С [6], неврологічних порушень і дисфункцій мозку [7].

Уявлення про запрограмовану смерть клітин, довгий час не привертаючи уваги клініцистів, сьогодні стали найпопулярнішими та інтригуючими проблемами медицини, які відіграють головну роль у долі всіх клітин живих організмів [8]. Фе-

номен апоптозу має особливе значення для клітин імунної системи, життєвий цикл яких характеризується багаторазовими процесами активації, диференціювання та проліферації. Все більш переконливими стають дані про те, що дефекти апоптозу відіграють важливу роль у патогенезі аутоімунної патології, лімфопроліферації та імунодефіцитів [9]. Апоптозний механізм імуносупресії починає активно розглядатися в патогенезі багатьох захворювань людини. Дані останніх років свідчать про якісно нову інтерпретацію тестів оцінки імунної системи, зв'язаних з визначенням стану активації імунокомпетентних клітин. Деякі дослідники вважають, що залежно від ряду зовнішніх і внутрішніх факторів процес активації імунокомпетентних клітин може мати, принаймні, два результати, які виключають один одного, і в зв'язку з цим була висунута концепція позитивних і негативних наслідків активації [10].

Зростає інтерес до проблеми апоптозу, зв'язаний також з гострою інфекційною патологією. Збудники багатьох інфекційних хвороб впливають на процес апоптозу безпосередньо й опосередковано [11]. Так, показано, що одним з можливих механізмів патогенетичної дії холерного токсину є апоптоз фагоцитів [12]. У той же час різні бактерії можуть виявляти антиапоптозну активність. Існує припущення, що при хронічних інфекціях бактерійні токсини, наприклад, *Helicobacter pylori*, пригнічуючи апоптоз, сприяють онкогенезу [13]. Роль апоптозу в імунопатогенезі гострих кишкових інфекцій (ГКІ) залишається практично недослідженою.

Отже, вивчення автореактивного чи патогенспецифічного апоптозу імунокомпетентних клітин при ГКІ може сприяти глибшому розумінню патогенезу й у перспективі – розробці нових терапевтичних підходів і реабілітаційних заходів.

Метою роботи було дослідження динаміки та взаємозв'язку ОМБ з морфологічними змінами імунокомпетентних клітин при ГКІ різної етіології та ступеня тяжкості, що допоможе глибше вникнути у внутрішньоклітинні реакції організму і, можливо, ясніше уявити характер деструктивних змін, викликаних окисним стресом, інтоксикацією внаслідок гострого інфекційного процесу.

Матеріали і методи

Під спостереженням було 96 хворих на ГКІ віком 18-55 років, що перебували на стаціонарному лікуванні в інфекційному відділенні 7-ї міської лікарні м. Сімферополя. Чоловіків було 47, жінок – 49. Досліджувані групи були розді-

лені за етіологією (сальмонельоз – 28 осіб, шигельоз – 23, ГКІ, викликані умовно-патогенними бактеріями (ГКІ-УПБ), – 20, ГКІ нез'ясованої етіології (ГКІ-НЕ) – 25) і тяжкістю захворювання. За віком, статтю та ступенем тяжкості пацієнти були розподілені рівномірно у всіх досліджуваних групах. Контролем служили практично здорові люди віком від 18 до 58 років (17 осіб). Збудника ідентифікували шляхом загальноприйнятих бактеріологічних методів. Збір крові здійснювали в гострому періоді недуги (1-ша доба перебування в стаціонарі) і в період реконвалесценції (5-7-а доба). Інтенсивність ОМБ сироватки крові визначали на підставі реакції взаємодії окислених амінокислотних залишків білків з 2,4-динітрофенілгідразином (2,4-ДНФГ) [14]. Оптичну щільність динітрофенілгідразонів реєстрували на СФ-46 при довжині хвилі 370 і 430 нм. Вміст карбонільних груп розраховували, використовуючи коефіцієнт молярної абсорбції, рівний $21\ 000\ \text{M}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$ для ДНФГ-похідних. Результати виражали в наномолях на 1 мл сироватки крові. При вимірі оптичної щільності в експериментальній пробі використовувалася контрольна проба того ж індивідуума.

Лейкоцити виділяли відразу після забору крові [15]. Дослідження стану ДНК лейкоцитів методом гель-електрофорезу ДНК клітин [16] проводили на базі відділу молекулярної генетики НДІ ІЕМ РАМН (С-Петербург). ДНК з лізатів лейкоцитів периферичної крові екстрагували обробкою фенолом, сумішшю фенол-хлороформ. ДНК переосажували 70 % етанолом, після промивання осаду 70 % етанолом ДНК розчиняли, визначали концентрацію спектрофотометрично (1 од. при А260 становить 50 мкг ДНК у кюветі з довжиною шляху променя 1 см). 2 мкг ДНК вносили в лунку і здійснювали електрофорез у 0,7 % агаровому гелі в 10 мМ трис-боратному буфері, що містить 5 мМ ЕДТА і 1 мкг/мл бромистого етидію. Результати електрофорезу фотографували в УФ-світлі.

Для математичної обробки отриманих даних використовували методи описової статистики, Т-критерій Стьюдента для парних порівнянь і деякі методи непараметричної статистики [17].

Результати досліджень та їх обговорення

Результати досліджень показали (табл. 1), що порівняно зі здоровими людьми вміст карбонільних груп похідних амінокислот білків у сироватці крові в гострий період у хворих на ГКІ легкого ступеня зростає у всіх групах на 20-30 %, найзначніше підвищення відзначається при сальмонельозі – на 30 %. Рівень ОМБ крові у хворих на ГКІ середнього ступеня тяжкості в гострому періоді підвищується в 2 рази при сальмонельозі, у 1,8 і 1,5 разу – при шигельозі та ГКІ-УПБ, у хворих з ГКІ-НЕ – на 45 %. Примітно, що у хворих на сальмонельоз і ГКІ-НЕ середнього ступеня тяжкості в

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

Таблиця 1

Рівень ОМБ сироватки крові хворих на ГКІ (нмоль/мл)

Етіологія	Період	Ступінь тяжкості			
		легкий		середній	
		λ 370 нм	λ 430 нм	λ 370 нм	λ 430 нм
Контроль (n=17)		119,05±12,55	83,33±9,72	119,05± 12,55	83,33±9,72
Сальмонельоз (n=28)	I	168,38±18,25*	108,56±15,34*	232,78±18,35**	157,12±20,85**
	II	125,36±11,14	89,15±10,75	145,58±12,64*	97,25±15,42
Шигельоз (n=23)	I	147,26±16,88*	110,75±16,55*	218,65±20,12**	148,28±17,26**
	II	121,15±12,95	86,44±11,56	130,25±15,36	92,88±13,95
ГКІ-УПБ (n=20)	I	145,75±14,92*	98,66±12,74	185,32±13,86**	127,82±18,35*
	II	117,25±10,85	84,54±11,76	120,25±14,84	85,66±10,15
ГКІ-НЕ (n=25)	I	138,95±13,77*	94,33±10,45	173,2±19,23**	128,11±20,78*
	II	118,23±11,38	85,36±8,05	133,18±15,58	90,75±19,22

Примітки (тут і далі): I – гострий період (при госпіталізації); II – рання реконвалесценція (при виписці зі стаціонару); * – вірогідність розбіжностей між хворими і контролем на рівні P<0,05; **– P<0,001.

період реконвалесценції рівень ОМБ у крові все ж залишається підвищеним на 25 і 11 % відповідно. Найчіткіша динаміка змін ОМБ сироватки крові відзначалася при реєстрації оптичної щільності динітрофенілгідразонів при довжині хвилі 370 нм.

Отримані дані та результати раніше проведених досліджень дають підставу пропонувати визначення в клінічній практиці вмісту карбонільних груп білків у сироватці крові хворих на ГКІ, що супроводжуються інтоксикацією, для оцінки ступеня тяжкості ендотоксикозу, прогнозу захворювання та ефективності проведеної терапії.

Враховуючи те, що окисний стрес викликає безліч внутрішньоклітинних змін, включаючи апоптоз, вважали за доцільне дослідити в зазначених груп хворих стан ДНК лейкоцитів.

Відомо, що деградація ДНК є термінальною фазою апоптозу. Спочатку відбувається утворення великих фрагментів, що містять приблизно 300 тис. пар основ (тис. п.о.), трохи пізніше –

дрібніших, що складаються з 30-50 тис. п.о. Потім настає завершальний етап фрагментації ДНК – міжнуклеосомна деградація з формуванням фрагментів, які містять 180 п.о. (довжину нитки ДНК у нуклеосомі) чи кратних їм по величині. Ці фрагменти виявляються у вигляді «драбинки» при електрофорезі ДНК, що широко використовується для ідентифікації апоптозу. Саме на виявленні фрагментації ДНК засновані морфологічні тести на апоптоз [18].

Дослідження показали, що при госпіталізації у лейкоцитах хворих на ГКІ відзначається фрагментація ДНК у вигляді «драбинки» в усіх групах, але частота виявлення даної морфологічної зміни варіює залежно від ступеня тяжкості та етіології діареї (табл. 2). Так, при легкому ступені в усіх групах частота виявлення фрагментації ДНК лейкоцитів не перевищувала 10-11 %, крім хворих на сальмонельоз, де частка морфологічних змін ДНК лейкоцитів у гострому періоді була трохи вища (16 %).

Таблиця 2

Відсоток хворих на ГКІ з фрагментацією ДНК лейкоцитів (%)

Ступінь тяжкості	Період	Сальмонельоз (n=28)	Шигельоз (n=23)	ГКІ-УПБ (n=20)	ГКІ-НЕ (n=25)
Легкий	n	12	10	9	12
	I	16,0	10,0	11,0	8,3
	II	8,3	0	0	0
Середній	n	16	13	11	13
	I	31,0	15,4	9,0	15,4
	II	12,5	7,7	0	7,7

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

При середньому ступені тяжкості ГКІ порівняно з попередніми групами частота виявлення фрагментації ДНК лейкоцитів у гострому періоді зростала майже у всіх групах, крім діарей, викликаних УПБ. Так, при госпіталізації у хворих на сальмонельоз фрагментація ДНК лейкоцитів відзначалася в 31,0 % випадків, при шигельозі – в 15,4 %, при ГКІ-НЕ – у 15,4 % відповідно. У період реконвалесценції, коли наставало клінічне видужання хворих, число випадків, де відзначалася фрагментація ДНК лейкоцитів, знижувалося удвічі в усіх групах, але було вище в 2 рази порівняно з групами хворих на ГКІ легкого ступеня. Так, у період реконвалесценції питома вага хворих із фрагментацією ДНК лейкоцитів у групі хворих на сальмонельоз складала 12,5 %, на шигельоз, ГКІ-НЕ – близько 7 %.

У зв'язку з тим, що досі немає вичерпної інформації про механізми впливу широкого спектру факторів на апоптоз лейкоцитів, вважали виправданим провести рівневу кореляцію між величиною вмісту карбонільних груп і відсотком хворих, у яких відзначалася деградація ДНК лейкоцитів, тобто між різношкальними величинами. Коефіцієнт кореляції F_i в інтерпретації Кертена між рівнем ОМБ і відсотком хворих з деградацією ДНК лейкоцитів показав, що в 40 % хворих на ГКІ середнього ступеня тяжкості зі значенням ОМБ сироватки крові, яке дорівнювало чи перевищувало граничну величину (200 нмоль/мл), буде відзначатися деградація ДНК лейкоцитів.

Таким чином, підтверджується припущення про кореляційний зв'язок між рівнем ОМБ у сироватці крові і деградацією ДНК лейкоцитів у гострому періоді ГКІ. За рівнем цього метаболіту в сироватці крові хворих на ГКІ в перші дні захворювання можна в 30-40 % випадків прогнозувати ймовірність імунологічних розладів. На наш погляд, рівень ОМБ крові може служити орієнтовним критерієм у комплексі лабораторних показників при оцінці тяжкості та перебігу недуги. Можна вважати, що при розвитку морфологічних змін у лейкоцитах при ГКІ відіграють важливу роль різні фактори, що викликають інтоксикацію, у тому числі й білкові аддукти, а також процеси, що регулюють імунологічні реакції організму.

Висновки

1. У хворих на ГКІ, залежно від тяжкості недуги, підвищується рівень ОМБ сироватки крові.
2. При сальмонельозі та шигельозі збільшення рівня ОМБ сироватки крові значніше, ніж у хворих на ГКІ іншої етіології.

3. У хворих в гострий період ГКІ виявлена фрагментація ДНК лейкоцитів, що залежить від етіології, періоду та ступеня тяжкості захворювання.

4. Найвищий відсоток деградації ДНК лейкоцитів відзначається в гострому періоді серед хворих на сальмонельоз і шигельоз.

5. У період реконвалесценції відсоток хворих із фрагментацією ДНК лейкоцитів у всіх групах хворих на ГКІ знижується, але залишається незначно вищим серед хворих на сальмонельоз.

6. Виявлений позитивний кореляційний зв'язок між рівнем ОМБ сироватки крові і частотою деградації ДНК лейкоцитів у гострому періоді ГКІ.

Література

1. Андрейчин М.А., Ивахив О.Л. Бактериальные диареи. – К.: Здоров'я, 1998. – 412 с.
2. Бурмистров С.О., Дубинина Е.Е., Арутюнян А.В. Перекисное окисление липидов, белков и активность антиоксидантной системы сыворотки крови новорожденных и взрослых // Акушерство и гинекология. – 1997. – № 6. – С. 36-40.
3. Chevon M., Berenshtein E., Stadtman E.R. Human studies related to protein oxidation: protein carbonyl content as a marker of damage // Free Radic. Res. – 2000. – V. 33. – P. 99-108.
4. Stadtman E.R., Levine R.L. Protein oxidation // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 2000. – V. 899. – P. 191-208.
5. Chang T.C., Chou W.Y., Chang G.G. Protein oxidation and turnover // J. Biomed. Sci. – 2000. – V. 7, N 5. – P. 357-363.
6. Farinati F., Cardin R., Degan P. et al. Oxidative DNA damage in circulating leukocytes occurs as an early event in chronic HCV infection // Free Radic. Biol. – 1999. – V. 27, N 11-12. – P. 1284-1291.
7. Annunziato L., Amoroso S., Pannaccione A. et al. Apoptosis induced in neuronal cells by oxidative stress: role played by caspases and intracellular calcium ions // Toxicol. Lett. – 2003. – V. 139, N 2-3. – P. 125-133.
8. Швемберггер И.Н., Гинкул Л.Б. Апоптоз: роль в нормальном онтогенезе и патологии // Вопросы онкологии. – 2002. – Т. 48, № 2. – С. 153-158.
9. Потапнев М.П. Апоптоз иммунной системы и его регуляция цитокинами // Иммунология. – 2002. – № 4. – С. 237-243.
10. Череев А.Н., Ковальчук Л.В. Анализ иммунной системы с учетом апоптотической активации клеток // Клини. лаб. диагностика. – 1997. – № 5. – С. 23-24.
11. Dockrell D.H. Apoptotic cell death in the pathogenesis of infectious diseases // J. Infect. – 2001. – V. 42, N 4. – P. 227-234.
12. Васильева Г.И., Киселева А.К., Мишанькин М.Б. и др. Апоптоз фагоцитов как один из возможных механизмов патогенетического действия холерного токсина // Инфекционная иммунология. – 2002. – Т. 4, № 2. – С. 231-232.

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

13. Lax A.J., Thomas W. Now bacteria could cause cancer: one step at a time // Trends Microbiol. – 2002. – V. 10, N 6. – P. 293-299.

14. Oliver C.N., Starke-Reed P.E., Stadtman E.R. et al. Oxidative damage to brain proteins, loss of glutamine synthetase activity, and production of free radicals during ischemia/reperfusion-induced injury to gerbil brain // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1990. – V. 87. – P. 5144-5147.

15. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., Истамов Х.И. Экологическая иммунология. – М.: Изд-во ВНИРО, 1995. – 219 с.

16. Weinert T. DNA damage checkpoint update: getting molecular // Current opinion in genetics and development. – 1998. – V. 8. – P. 185-193.

17. Иванов Ю.И., Погорелюк О.Н. Статистическая обработка результатов медико-биологических исследований на микрокалькуляторах по программам. – М.: Медицина. – 1990. – 224 с.

18. Фильченков А.А., Стойка Р.С. Апоптоз и рак. – К.: Морион, 1999. – 184 с.

THE CHANGE OF OXIDATIVE MODIFICATION OF BLOOD SERUM PROTEINS AND DNA OF LEUCOCYTES AT ACUTE INTESTINAL INFECTIONS

I.Z. Karimov, P.S. Arshynov, N.H. Los-Yatsetko, O.A. Ody-nets, A.O. Dehtyaryova, L.H. Kuznyetsova, M.V. Bere-hova, A.A. Mustafayeva

SUMMARY. The content of carbonyl groups in blood serum and morphological condition DNA of leucocytes in 96 patients with acute intestinal infections in dynamics of disease was investigated. The rising of level of oxidative modification of blood proteins is shown, and also the fragmentation of leucocyte DNA is found out depending on aetiology, degree of severity and period of disease. The direct correlation interrelation between a level of oxidative modification of blood serum proteins and frequency of detection of leucocyte DNA fragmentation in the acute period of disease is revealed.

© Тарасюк О.О., Горбань Є.М., Борис В.М., Мажак К.Д., 2004
УДК 616-002.5-053.6-036.1-07-08

О.О. Тарасюк, Є.М. Горбань*, В.М. Борис, К.Д. Мажак **ПЕРСПЕКТИВИ ЗАСТОСУВАННЯ СПІРУЛІНИ ПРИ** **ТУБЕРКУЛЬОЗІ ЛЕГЕНЬ ДІТЕЙ ПІДЛІТКІВ**

Львівський НДІ епідеміології і гігієни МОЗ України, *Інститут геронтології АМН України, м. Київ

Проведені дослідження і клінічні спостереження свідчать про багатоплановий позитивний вплив спіруліни на організм дітей і підлітків, хворих на туберкульоз легень, які перебувають на реабілітаційному етапі лікування в санаторії. Це проявляється в більш повній і швидкій нормалізації обмінних процесів, підвищенні реактивності організму, ліквідації інтоксикаційних проявів і покращенні загального стану організму.

В останнє десятиліття в усіх країнах світу спостерігається зростання захворюваності на туберкульоз органів дихання, близько 20-25 % хворих впродовж року не виліковуються і поповнюють контингент з хронічними формами туберкульозу легень. Насторожує той факт, що захворюваність дітей в Україні на туберкульоз з 1990 р. зростає з 4,6 до 9,1 на 100 тис. дитячого населення, або в 1,98 рази. За

результатами трендового аналізу, протягом останнього десятиріччя приріст показника захворюваності на всі форми туберкульозу дітей був в 1,3 рази інтенсивнішим, ніж у дорослих. Пріоритетним напрямком захисту дітей від ускладнених і розповсюджених форм туберкульозу є раннє виявлення захворювання і проведення адекватної терапії. Проте повного розсмоктування туберкульозних змін в легеневій тканині у результаті ефективної хіміотерапії вдається досягти не завжди; в легенях більшості осіб протягом тривалого часу виявляються залишкові зміни, активність яких визначити доволі складно. В останні роки поряд з клінічними критеріями виліковування туберкульозу легень: знебациленам, наявністю відповідних рентгенологічних критеріїв, даними туберкулінових проб – велика роль у визначенні стану клінічного одужання відводиться біохімічним та імунологічним тестам.