

ИССЛЕДОВАНИЕ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ И СОДЕРЖАНИЕ ЦИТОКИНОВ ПРИ ЭХИНОКОККОЗЕ ПЕЧЕНИ

А.В. Зангинян, Г.С. Казарян, Л.М. Овсепян

Институт молекулярной биологии Национальной академии наук Армении, г. Ереван, Республика Армения

Резюме. Эхинококкоз — опасное паразитарное заболевание животных и человека, характеризующееся длительным хроническим течением, тяжелыми органными и системными нарушениями, обширностью поражения, приводящими к инвалидности и нередко — к гибели больного. Целью настоящего исследования явилось изучение активности процессов перекисного окисления липидов и окислительных модификаций белков, определение содержания оксида азота во взаимосвязи с содержанием цитокинов при эхинококкозе печени у людей до операции и после. Полученные нами данные позволяют заключить, что в развитии патогенеза эхинококкоза печени определенную роль играет активирование свободнорадикальных реакций, увеличение содержания оксида азота и цитокинов.

Ключевые слова: эхинококковая болезнь печени, малоновый диальдегид, оксид азота, карбоксильные производные, интерлейкины.

THE STUDY OF FREE RADICAL PROCESSES AND THE CONTENT OF CYTOKINES IN LIVER ECHINOCOCCOSIS

Zanginyan H.V., Ghazaryan G.S., Hovsepyan L.M.

Abstract. The purpose of this study is to investigate the activity of lipid peroxidation and oxidative modification of proteins, determination of nitric oxide in relation to the content of cytokines in hepatic echinococcosis in humans before and after surgical intervention. Our data suggest that in the development of the pathogenesis of echinococcosis the activation of free radical reactions as well as increase in nitric oxide and cytokines play certain role. (*Infekc. immun.*, 2012, vol. 2, N 3, p. 661–664)

Key words: echinococcosis, malonic dialdehyde, nitric oxide, carboxyl acid derivatives, interleukins.

Введение

Эхинококкоз — опасное паразитарное заболевание животных и человека, характеризующееся длительным хроническим течением, тяжелыми органными и системными нарушениями, обширностью поражения, приводящими к инвалидности и нередко — к гибели больного. С момента заражения до времени установления диагноза латентный период продолжается от 5 до 20 лет. Высокий уровень заболеваемости эхинококкозом является серьезной экологической и медико-социальной проблемой [9].

Патогенез эхинококкоза печени связан с развитием воспалительной реакции, что вызывает активацию ряда иммунопатологических защитных механизмов. В настоящее время установлено, что ткани, пораженные воспалением, образуют повышенные количества супероксидного радикала (O_2^-) и NO, приводящие к активированию свободнорадикальных реакций и рассматривающиеся как универсальный механизм повреждения клетки [2].

В клетках продукты свободнорадикального окисления участвуют в регуляции сигнальных путей и продукции цитокинов, влияют на фос-

поступила в редакцию 14.05.2012
отправлена на доработку 20.05.2012
принята к печати 25.06.2012

© Зангинян А.В.
и соавт., 2012

Адрес для переписки:

Зангинян Асмик Владимировна,
научный сотрудник лаборатории
молекулярной мембранологии Института
молекулярной биологии Национальной
академии наук Республики Армения

Республика Армения, г. Ереван, 0014,
ул. Асрацян, 7.
Тел.: +37410 24-36-09 (служебн.).
E-mail: hzang@mail.ru

форилирование, транслокацию и связывание с ДНК факторов транскрипции [11, 15].

Оксид азота, молекула со свойствами радикала, позволяет этому соединению как активировать свободнорадикальные реакции, так и ингибировать их. В литературе имеются данные о способности NO оказывать влияние на иммунную систему и воспалительный ответ [10].

Целью настоящего исследования явилось изучение активности процессов перекисного окисления липидов и окислительных модификаций белков, определение содержания оксида азота во взаимосвязи с содержанием цитокинов при эхинококкозе печени у людей до операции и после.

Материалы и методы

Исследование проводили на 12 больных эхинококкозом печени, поступивших в стационар. Всем пациентам в период предоперационного обследования с целью уточнения диагноза, размеров, локализации очаговых образований выполнялись КТ и УЗИ брюшной полости. Пробы крови брались за 1 день до операции и на 6-й день после операции. Контрольную группу составляли шесть практически здоровых людей. Содержание перекисей липидов определяли по реакции взаимодействия малонового диальдегида (МДА) с тиобарбитуровой кислотой, дающее цветное окрашивание, которое регистрировали при длине волны 535 нм [6].

Уровень окислительной модификации белков в сыворотке крови оценивали по содержанию карбонильных производных аминокислот в белках. Метод основан на том, что конечные продукты свободнорадикального окисления белков могут количественно реагировать с 2,4-динитрофенилгидразином с образованием 2,4-динитрофенилгидразонов. Карбонильные производные после растворения белкового осадка в 8 М мочевины при 37°C определяли при 363 нм, используя коэффициент молярной экстинкции $22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ см}$ [13].

Содержание оксида азота определяли с помощью реактива Грисса (1% сульфаниламида, 0,1% нафтилендиамина, 2,5% фосфорной кислоты), а абсорбцию раствора измеряли при длине волны 546 нм [1].

Количество белка определяли методом Лоури [13].

Определение концентраций интерлейкинов — IL-6, IL-8 — и TNF α в сыворотке крови проводили с помощью иммуноферментного анализа (ELISA) с использованием коммерческих тест-систем (Diacclone, Франция) по инструкции производителя.

Результаты обрабатывали статистически с использованием t-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Исследование содержания продуктов перекисного окисления липидов у больных эхинококкозом показало их увеличение (табл.). Существенно выше были показатели малонового диальдегида за день до операции: 10,5 нмоль/мг белка, что почти в 2,5 раза превышает их содержание в контроле. После операции наблюдался также повышенный уровень малонового диальдегида по сравнению с показателем здоровых людей (его количество составило 7,8 нмоль/мг белка), однако он был ниже, чем у больных до операции. Малоновый диальдегид является продуктом окислительного распада полиненасыщенных жирных кислот (линолевой, линоленовой, арахидоновой) — важнейшими компонентами фосфолипидов биологических мембран. При окислении ненасыщенных жирнокислотных цепей фосфолипидов в области сопряженных двойных связей образуются поры, которые нарушают целостность мембраны, следствием чего является нарушение нормального хода обменных процессов. При избыточной генерации АФК процесс принимает каскадный характер, что приводит к липидным и белковым нарушениям в структуре клеточных мембран.

Особый интерес представляет исследование окислительной модификации белка в сыворотке крови больных эхинококкозом печени. Как показали результаты исследования, у пациентов с эхинококкозом печени наблюдается тенденция к повышению интенсивности окислительной модификации белков, что было установлено при длине волны 363 нм. Если у здоровых людей содержание карбонильных продуктов составляло 4,12, то у больных эхинококкозом печени до операции оно равнялось 7,3, что отражает тенденцию к уменьшению их содержания после операции. Выявленное повышение интенсивности окислительной модификации белков сыворотки крови обследованных больных фактически демонстрирует общую направленность свободнорадикальных процессов. Учитывая большую и очень разную функциональную значимость белков в клетке их окислительная модификация играет решающую роль в работе ферментов, что отражается в нарушении функционирования ионных каналов, ведущем к повреждению гепатоцитов.

Следующим этапом нашего исследования явилось изучение содержания оксида азота в сыворотке крови больных эхинококкозом печени.

Оксид азота по своей химической природе относится к нейтральным двухатомным молекулам, вместе с тем наличие электрона с неспаренным спином придает молекуле NO высокую реакционную способность. Действительно, в силу

ТАБЛИЦА. СОДЕРЖАНИЕ МДА, КАРБОНИЛЬНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ БЕЛКОВ, ОКСИДА АЗОТА, ЦИТОКИНОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ ЭХИНОКОККОЗОМ ПЕЧЕНИ ПАЦИЕНТОВ ДО ОПЕРАЦИИ И ПОСЛЕ ОПЕРАЦИИ

Показатель	Контроль (n = 6)	Больные эхинококкозом печени	
		До операции (n = 12)	6-й день после операции (n = 12)
МДА, нмоль/мг белка	4,8±0,53	10,2±0,45**	6,7±0,42**
Окислительная модификация белков, ед. опт. пл./мл	4,12±0,46	7,3±0,33**	5,2±0,4**
NO, мкмоль/л	30,32±2,2	55,84±3,6*	40,8±0,8**
TNF α , пг/мл	10,8±2,0	44,0±3,8**	54±4,6**
IL-6, пг/мл	25,15±4,7	40,37±3,5*	137,3±11,8**
IL-8, пг/мл	11,5±2,1	54,5±4,7**	56,2±4,8

Примечание. *p < 0,05; **p < 0,001.

своих особенностей свободнорадикальная молекула NO способна угнетать ферменты цепи переноса электронов и цикла Кребса, такие как аконитаза, НАДФН-убихинон-оксидоредуктаза, сукцинат-убихинон-оксидоредуктаза, а также глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа [14]. Как показали результаты исследования, у больных эхинококкозом печени наблюдается повышенный уровень содержания оксида азота как до операции, так и на 6-й день после операции. В ряде работ показано, что в очаге воспаления способен накапливаться продукт частичного восстановления кислорода — супероксид, который инактивирует вазоактивное действие NO [14]. Быстрое взаимодействие NO и супероксидного аниона приводит к образованию пероксинитрита, повреждающего клетки [15].

Из литературных данных известно, что оксид азота, продуцируемый эндотелиальной NO-синтазой, в норме практически не обнаруживается в клетках. Однако синтез NO-синтазы индуцируется под действием провоспалительных цитокинов [7]. Активированные цитокинами и бактериальными эндотоксинами макрофаги усиливают синтез NO [16].

В этой связи нами проведено исследование по определению содержания цитокинов у пациентов с эхинококкозом печени. Образование цитокинов — это важный элемент поддержания гомеостаза организма. Однако если имеется гиперпродукция цитокинов возможно повреждение печени.

Исследование содержания TNF α у больных показало, что его уровень в сыворотке крови увеличивается почти в 4 раза.

TNF α относится к провоспалительным цитокинам, которые секретируются клетками Купфера при гепатитах. В низких концентрациях он играет важную роль в регуляции иммунного ответа и тканевого гомеостаза, в высоких концентрациях оказывает патологическое эндокриноподобное действие, вызывая микрососудистую гиперкоагуляцию и гемодинамические

нарушения. Присоединение молекулы цитокина к специфическому рецептору (p55 и p75) запускает ряд сигнальных путей: активацию каскада протеинкиназ, активацию транскрипционного фактора NF-kB, экспрессию NO-синтазы и генерацию NO, а также активацию фосфолипаз C, A2 [5].

Исследование концентраций IL-6 и IL-8 позволило обнаружить их увеличение у пациентов при эхинококкозе печени до операции. Повышение уровня IL-6 в крови наблюдается при многих патологических состояниях: тяжелых воспалительных процессах, инфекциях, травмах, при аутоиммунных заболеваниях. Показана возможность использования IL-6 в качестве маркера при ранней оценке тяжести патологических процессов.

Интерлейкин-8 (IL-8) — также как и фактор некроза опухоли- α (TNF α), интерлейкин-6 и др. — относится к цитокинам провоспалительного каскада, среди которых он является самым ранним медиатором воспаления (хемокином). Основная роль IL-8 состоит в хемотаксическом и активирующем воздействии на нейтрофилы: в дегрануляции и стимуляции лейкоцитов, а также в усилении миграции фагоцитов в месте внедрения чужеродного микроорганизма и активации ими синтеза молекул адгезии [3].

Таким образом, полученные нами данные позволяют заключить, что в развитии патогенеза эхинококкоза печени определенную роль играет активирование свободнорадикальных реакций, увеличение содержания оксида азота и цитокинов.

Список литературы

1. Голиков П.П., Николаева Н.Ю., Марченко В.В., Матвеев С.Б., Голиков А.П., Давыдов Б.В., Лебедев В.В., Смирнов С.В., Гавриленко И.А. Оксид азота и перекисное окисление липидов как факторы эндогенной интоксикации при неотложных состояниях // Пат. физиология и эксперим. терапия. — 2000. — № 2. — С. 6–9.

2. Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньшикова Е.Б. Окислительный стресс. Биохимические и патологофизиологические аспекты // МАИК. — 2001. — С. 343
3. Иванов А.А., Гладких О.П., Кузнецова А.В., Данилова Т.И. Межклеточные и клеточно-матриксные взаимодействия в патологии // Молекулярная медицина. — 2005. — №2. — С. 16–21.
4. Малышев И.Ю., Манухин Е.Б. Стресс, адаптация и оксид азота // Биохимия. — 1998. — Т. 63. — С. 992–1006.
5. Меньшикова Е.Б., Зенков Н.К., Реутов В.П. Оксид азота и NO-синтазы в организме млекопитающих при различных функциональных состояниях // Биохимия. — 2000. — Т. 65, вып. 4. — С. 485–503.
6. Орехович В.Н. Современные методы в биохимии. — М., 1977. — 392 с.
7. Проскуряков С.Я., Скворцов В.Г., Иванников А.И., Бикетов С.И. Оксид азота в механизмах патогенеза внутриклеточных инфекций // Иммунология. — 2000. — № 4. — С. 9–20.
8. Alexander R.W. Nitric oxide and peroxynitrite // Hypertension. — 1995. — Vol. 25. — P. 155–161.
9. Brunetti E., Mark R. Cystic echinococcosis // *Medicine J.* — 2004. — Vol. 5, N 3. — P. 45–51.
10. Burgner D., Rockett K., Kwiatkowski D. Nitric oxide and infectious diseases // *Arch. Dis. Child.* — 1999. — Vol. 8, N 2. — P. 185–189.
11. Circu M.L., Aw T.Y. Reactive oxygen species, cellular redox systems and apoptosis // *Free Radic. Biol. Med.* — 2010. — Vol. 48. — P. 749–762.
12. Levine R.L., Garland D., Oliver C.N. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins // *Meth. Enzymol.* — 1990. — Vol. 186. — P. 464–478.
13. Lowry N.J., Rosenbogh A.J., Farr et al. Protein measurement with the folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* — 1951. — Vol. 153, N 1. — P. 256–275.
14. Murad F. Discovery of some of the biological effects of nitric oxide and its role in cell signaling // *J. Biosci. Rep.* — 1999. — Vol. 19, N 3. — P. 133–154.
15. Naik E., Dixit V.M. Mitochondrial reactive oxygen species drive proinflammatory cytokine production // *J. Exp. Med.* — 2011. — Vol. 208. — P. 417–420.
16. Nathan C.T., Hibbs J.B. Jr. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity // *Curr. Opin. Immunol.* — 1991. — Vol. 3. — P. 65–70.