

Реакція системи антиоксидантного захисту стінки стравоходу за умов змодельованого шлунково-стравохідного рефлюксу

I.V. ШКВАРКОВСЬКИЙ

Буковинський державний медичний університет

REACTION OF ANTIOXIDANT DEFENCE SYSTEM IN ESOPHAGEAL WALL UNDER CONDITION OF GASTROESOPHAGEAL REFLUX SIMULATION

I.V. SHKVARKOVSKY

Bucovynian State Medical University

У результаті проведеного експериментального дослідження з вивчення динаміки показників про- та антиоксидантного стану в тканинах стравоходу було показано, що накопичення продуктів окислення білків та ліпідів під час запального процесу супроводжується значним зниженням активності антиоксидантних ферментів. Отримані дані дозволяють говорити про різне діагностичне значення рівнів дієнових кон'югатів та малонового діальдегіду. Зростання концентрації МДА та продуктів окислювальної модифікації білків основного характеру виявилось типовим біохімічним маркером кислотно-пептичної альтерації тканин стравоходу.

As a result of a conducted experimental research involving the study of dynamics of parameters of pro- and antioxidant condition in the esophageal tissues it has been demonstrated that an accumulation of the products of lipid and protein oxidation during the inflammatory process is accompanied by a considerable decrease of the activity of antioxidant enzymes. The obtained findings make it possible to talk about a different diagnostic value of the level of dien conjugates and malonic dialdehyde (MA). An elevation of the concentration of MA and the products of oxidative protein modification of alkaline nature has turned out to be a typical biochemical marker of acid-peptic alteration of the esophageal tissues.

Постановка проблеми і аналіз останніх досліджень та публікацій. Впродовж тривалого часу пошкоджувальні ефекти активних форм кисню (АФК) пов'язували з їх впливом на ліпіди, як основні компоненти клітинних мембран, однак останніми роками значна увага дослідників приділяється вивченню механізму впливу АФК на білкові молекули. Функціональна активність білків пов'язана з унікальною структурою активних центрів ферментів, до складу яких входять найбільш реакційно здатні амінокислотні залишки, які передусім, модифікуються АФК. Крім того, до складу ряду ферментів, зокрема каталази і глутатіонпероксидази, входять метали, які виступають як донорами, так і акцепторами електронів. Атака білків АФК призводить до утворення первинних амінокислотних радикалів, які вступають у вторинні взаємодії із сусідніми амінокислотними залишками, що в цілому створює складну картину пошкоджувальної дії АФК на білкові макромолекули. Модифікація амінокислотних залишків у білках призводить до агрегації та фрагментації білків,

наслідком чого є підвищення чутливості білків до протеолітичної деградації [1, 2].

Важливе місце серед процесів вільнорадикального окислення, яке активується за умов запалення, займають реакції пероксидного окислення ліпідів (ПОЛ). Це зумовлено наявністю в молекулах ліпідів значної кількості поліненасичених залишків вищих жирних кислот. Ушкодження ліпідного матриксу біомембран за рахунок утворення пероксидних молекулярних продуктів поліненасичених залишків вищих жирних кислот супроводжується окислювальною модифікацією білків (ОМБ) і порушенням біофізичних властивостей мембранних білків та змін ферментативних та іонтранспортних властивостей мембран [3, 4, 5].

Останнім часом накопичуються результати досліджень, які засвідчують про міцний зв'язок процесів окислювальної модифікації білків і перекисного окислення ліпідів. Одним із кінцевих продуктів у ПОЛ є малоновий діальдегід (МДА), який здатний до взаємодії із різними біомолекулами, включаючи білки та фосфолі-

піді, утворюючи з ними стабільні продукти. Дослідженнями доведено, що МДА міститься в біологічних матеріалах у різних ковалентно зв'язаних формах – у вигляді адуктів малонового діальдегіду з залишками лізину білків або з амінами, що складають головну частину фосфоліпідів. Слід зазначити, що у стані окисного стресу, атаці АФК піддаються передусім не ліпіди, а білки плазматичних мембран, що призводить до їх деполімеризації та лізису клітин. На сьогодні чітко визначено, що акумуляція окислених білків під час запального процесу супроводжується зниженням активності антиоксидантних ферментів. Причому рівень ОМБ порівняно з ПОЛ є найбільш інформативним маркером [6, 7].

Мета роботи: дослідження реакції системи про- та антиоксидантного захисту стінки стравоходу за умов експериментально змодельованого шлунково-стравохідного рефлюксу.

Матеріали і методи. Експериментальну модель шлунково-стравохідного рефлюксу, відповідно до задекларованого способу (Деклараційний патент України на корисну модель № 19579), відтворювали на 70 білих статовозрілих щурах лінії Wistar. Тварини виводились з експерименту в різні терміни післяопераційного періоду з вилученням біоптатів тканин кардіоезофагального переходу для подальшого біохімічного дослідження. Рівень МДА визначали за результатом взаємодії тіобарбітурової кислоти з ліпопероксидами, амінокислотами та вуглеводами. Вимірювали оптичну густину E_{532} в односантиметровому кюветі на "СФ-46". Методика визначення ДК полягає у їх екстрагуванні з суміші гексану та ізапропанолу із визначенням оптичної густини гексанового шару. Визначали оптичну густину верхнього гексанового шару і вимірювали E_{233} в односантиметровому кюветі на "СФ-46". Розрахунки проводили аналогічно, як і для МДА. Принцип визначення активності каталази полягає у здатності пероксиду водню утворювати із ϵ -олями молібдену стійкий забарвлений комплекс, після чого вимірюють оптичну густину розчину на спектрофотометрі. Визначення активності глутатіонпероксидази побудовано на принципі кількісного обчислення відновленого глутатіону (G-SH), який не використовується в процесі ферментативної реакції. Рівень G-SH визначали титруванням, паралельно проводили контрольну і дослідну проби. У контрольну пробу спочатку додавали 0,8 мл 10 % сульфосаліци-

лової кислоти, а потім всі ті компоненти, що і в дослідній пробі. Визначення ОМБ ґрунтується на здатності їх окислених амінокислотних залишків взаємодіяти з 2,4-динітрофенілгідразином з утворенням похідних 2,4-динітрофенілгідразину, їх оптичну густину визначали на "СФ 46".

Результати досліджень та їх обговорення. Експериментально змодельований гастроєзофагеальний рефлюкс викликає в тканинах стравоходу тварин істотні зміни в показниках прота антиоксидантної систем. Рівень первинних продуктів перекисного окислення ліпідів – ДК починає достовірно підвищуватись з 10-го дня експерименту і становить $(1,7659 \pm 0,0279)$ нмоль/мг, що перевищує контрольні значення $((1,5376 \pm 0,0748)$ нмоль/мг) на 14 %. В подальші терміни спостереження відмічено незначне зниження концентрації первинних продуктів окислення ліпідів до $(1,6754 \pm 0,0280)$ нмоль/мг, починаючи з 30-ї доби спостерігали вірогідне зростання рівня ДК впродовж всього подальшого терміну експерименту. На 80-ту добу концентрація ДК становила $(2,1142 \pm 0,0232)$ нмоль/мг, що було вищим за контрольні значення на 37,5 %. Аналізуючи динаміку коливань вмісту ДК в гомогенатах тканин стравоходу, ми дійшли висновку, що перша хвиля накопичення зазначених продуктів пероксидації зумовлена безпосередньо оперативною травмою і, як засвідчують наші дані, це зростання було короткотривалим та малозначущим. Наступне зростання рівня ДК, на нашу думку, зумовлене розвитком запального процесу в стінці стравоходу як результат триваючої кислотно-пептичної альтерації.

Що стосується МДА, як одного із кінцевих метаболітів ПОЛ, то його рівень в тканині стравоходу експериментальних тварин був достовірно підвищеним, починаючи з 10-ї доби від початку експерименту, – $(0,9128 \pm 0,00570)$ нмоль/мг і зберігався таким до 80-го дня, коли його концентрація була максимальною – $(1,3421 \pm 0,023)$ нмоль/мг, що на 62 % перевищує встановлене контрольне значення МДА $((0,8027 \pm 0,0205)$ нмоль/мг). При вивченні вмісту МДА в гомогенатах тканин нами не відмічено тенденції до його зниження. Було встановлено різне діагностичне значення зазначених показників, підвищення рівня МДА відбувається в ранні терміни після моделювання з $0,8027 \pm 0,0205$ до $1,342 \pm 0,0230$, що вказує на його більшу чутливість порівняно з ДК, рівень яких протягом перших 25 діб коли-

вався то зростаючи, то знижуючись, в межах 12-14 % перевищуючи контрольні значення. З іншого боку, встановлено чітке зростання рівня ДК в тканинах стравоходу. Так, з 30-ї доби спостереження, його рівень корелює з гістологічними ознаками тривалого запального процесу, тобто, може бути розцінений як критерій хронізації запалення.

Показники ОМБ нейтрального характеру, які визначалися при 370 нм, були достовірно підвищеними, починаючи з 10-ї доби від початку експерименту – $(0,1503 \pm 0,0024) E_{370}$ /грам/год. Протягом наступних 40 діб їх концентрація коливалась в межах 5 %, що перевищує контрольні значення на 10 %. З 50 до 80-го дня від початку експерименту відмічено зниження цих показників, і по завершенні дослідження вони практично не відрізнялися від контрольних – $(1,4287 \pm 0,0028) E_{370}$ /грам/год. Рівень альдегідів і кетонпохідних основного характеру, які визначалися при 430 нм, характеризується підвищенням вже з 10-ї доби – $(0,0688 \pm 0,0005) E_{430}$ /грам/год. Максимального значення він набув на 80-ту добу від початку експерименту, коли його концентрація становила $(0,0926 \pm 0,0030) E_{430}$ /грам/год, що вище за контрольні значення $(0,6781 \pm 0,0032) E_{430}$ /грам/год на 13,6 %. Впродовж другої половини дослідження рівень ОМБ основного характеру не мав тенденції до зниження і залишився вищим за контрольні значення. Тобто, цей показник є більш чутливим до ГЕРХ, оскільки характеризує хронічний перебіг запального процесу в тканинах стравоходу, яка має місце за умови тривалого рефлюксу кислотно-пептичного шлункового вмісту.

Головними антиоксидантними ферментами клітин є каталаза та глутатіонпероксидаза.

Активність вивчених ферментів за вищезазначених умов експериментальної рефлюксної хвороби мала одну спрямованість змін – у тканинах стравоходу поступово наростала у міру віддалення від початку хірургічного втручання. Це особливо прослідковується на активності каталази. Концентрація даного ферменту антиоксидантного захисту впродовж перших 15 діб після моделювання характеризувалась незначним зниженням до $(3,8592 \pm 0,0864)$ мкмоль/мг порівняно з контрольними значеннями – $(4,5261 \pm 0,121)$ мкмоль/мг. Однак, починаючи з 25-ї доби встановлено стрімке зростання концентрації каталази в гомогенатах тканин, і на 80-ту добу її рівень становив $(12,6113 \pm 0,180)$ мкмоль/мг, що перевищує контрольні значення на 178 %. Зміни рівня глутатіонпероксидази мали споріднений з каталазою характер, попри це були менш виразними. Так, на 10-ту добу після моделювання рівень зазначеного ферменту становив $(0,4813 \pm 0,0099)$ мкмоль/мг при контрольних показниках $(0,5393 \pm 0,018)$ мкмоль/мг. Впродовж всього терміну експерименту рівень глутатіонпероксидази поступово наростав і на 80-ту добу становив $(0,9390 \pm 0,0127)$ мкмоль/мг, що перевищує контрольні показники на 74,1 %.

Висновок. Розвиток експериментально змодельованого рефлюкс-езофагіту характеризується дисбалансом системи про- та антиоксидантного захисту. В результаті тривалого впливу кислотно-пептичного рефлюксату спостерігається більш раннє зростання концентрації дієвих кон'югатів та малонового діальдегіду на фоні сповільненої реакції ферментів антиоксидантного захисту, що розцінено нами як оксидативний стрес.

ЛІТЕРАТУРА

1. Мешишен І.Ф. Глутатіонова система організму за умов норми та патології. – Чернівці: Мед академія, 1999. – 26с.
2. Мешишен І.Ф., Пішак В.П. Основи обміну речовин та енергії. – Чернівці: БДМУ, 2005. – 192 с.
3. Erbil Y., Turkoglu U., Barbaros U., Balik E. Oxidative damage in an experimentally induced gastric and gastroduodenal reflux model // Surg. Innov. – 2005. – Vol 3, № 12. – P. 219-225.
4. Isomoto H., Nishi Y., Wang A., Takeshima F. Mucosal concentrations of proinflammatory cytokines and chemokines at gastric cardia: implication of Helicobacter pylori infection and gastroesophageal reflux // Am. J. Gastroenterol. – 2004. – Vol. 6, № 99. – P. 1063-1068.
5. Modzelewski B. Antioxidative barrier activity assessment in gastro-esophageal reflux disease // Wiad Lek. – 2004. – Vol. 11, № 57. – P. 603-606.
6. Modzelewski B. Effect of arachidonic acid peroxidation products on the development of gastroesophageal reflux disease // Pol. Merkur. Lekarski. – 2004. – Vol. 96, № 16. – P. 532-535.
7. Roh J.L., Yoon Y.H. Effect of acid and pepsin on glottic wound healing: a simulated reflux model // Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg. – 2006. – Vol. 132, № 9. – P. 995-1000.