

УДК 576.8.577.616.3

## Молекулярные патомеханизмы развития эхинококкоза печени

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

*Институт молекулярной биологии НАН РА  
0014, Ереван, ул.Асратяна, 7*

*Ключевые слова:* эхинококкоз печени, фосфолипиды мембран эритроцитов, свободнорадикальное окисление липидов, окислительная модификация белков, оксид азота, иммуноглобулины, интерлейкины

Эхинококкозы – актуальная проблема медицинской паразитологии, характеризуются тяжелым длительным течением с прогрессивным ухудшением, что без надлежащего лечения приводит к гибели больного зачастую в молодом, трудоспособном возрасте. Эхинококкоз печени (ЭП) вызывает глубокие функциональные изменения в печени, приводящие к местным и общим осложнениям, связанным с недостаточностью её работы, что влечет за собой нарушения жизнедеятельности организма в целом [1,8]. Вследствие сдавливания эхинококковыми цистами ткани печени, развивается ишемия, приводящая к нарушению в ней обменных процессов. В связи с этим исследование состояния и механизмов нарушения регуляции кислородзависимых процессов представляет возможность выяснения общих закономерностей и уточнения патогенеза токсического повреждения печени.

Исходя из вышеизложенного, целью настоящей работы явилось изучение процессов свободнорадикального окисления липидов и белков, продукции оксида азота, состояния липидного спектра мембран эритроцитов, а также содержания иммуноглобулинов, цитокинов при эхинококкозе печени.

### Материал и методы

Исследование проводили на больных ЭП, 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 день до операции и на 3, 5, 10-й день после операции. Контролем служили доноры.

Забор цельной крови производили натощак из периферических вен в пробирки с ЭДТА.

Об активности перекисного окисления липидов (ПОЛ) судили по количеству образования гидроперекисей (ГП) и малонового диальдегида (МДА). ГП определяли по цветной реакции с тиоцианатом аммония при максимуме поглощения 480 нм; МДА — по реакции с тиобарбитуровой кислотой [2], количество белка — по Лоури [11].

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 [3]. 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  $22 \times 10^3$  М/1см [4,10]. Мембраны эритроцитов выделяли по методу Либермана [9].

Экстракцию липидов осуществляли по методу Фолча в модификации Карагезяна [5]. Фракционирование индивидуальных фосфолипидов проводили методом одномерной хроматографии в тонком слое силикагеля («Мерк», Германия) в системе растворителей хлороформ:метанол:аммиак в соотношении 65:35:5. Минерализацию липидного фосфора осуществляли в среде серной и азотной кислот с последующим расчетом количества неорганического фосфора.

Для определения концентрации цитокинов в периферической крови использовали коммерческий набор для ELISA (Diacclone, France).

Иммуноглобулины определяли на автоматическом биохимическом анализаторе COBAS INTEGRA 400 PLUS турбидиметрическим методом исследования.

Статистическую обработку данных проводили с использованием компьютерной программы “SigmaPlot 11.0” с использованием специальных руководств по медицинской и биологической статистике.

## Результаты и обсуждение

ПОЛ изучалось нами в ферментативной (НАДФН-зависимой) и неферментативной (аскорбатзависимой) системах окисления. Как показали результаты исследования, в крови здоровых людей обнаружен определенный стационарный уровень интенсивности свободнорадикальных реакций.

Изучение процесса ПОЛ при ЭП позволило обнаружить увеличение содержания гидроперекисей и малонового диальдегида в мембранах

эритроцитов (рис.1,2). Повышение их количества является одной из причин, приводящих к повреждению клеток гепатоцитов.



Рис. 1. Содержание продуктов ПОЛ в мембранах эритроцитов у больных ЭП (аскорбатзависимое перекисление) (n=15), \* P<0,05

Примечание: 1 – значимость отличий по сравнению с контролем; 2 – значимость отличий по сравнению с 1; 3 – значимость отличий по сравнению с 2; 4 – значимость отличий по сравнению с 3

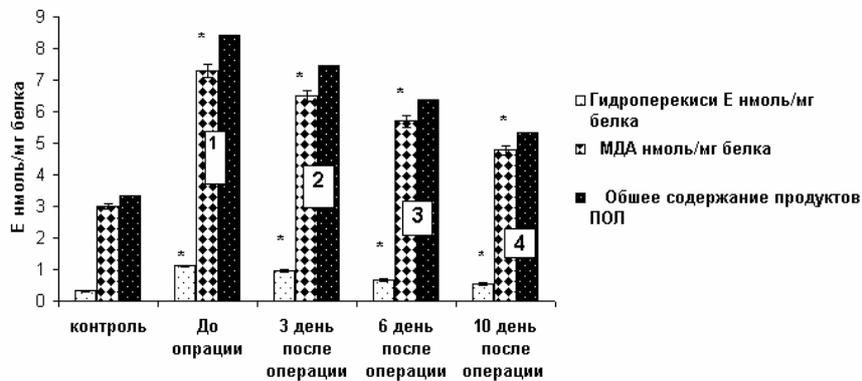


Рис. 2. Содержание продуктов ПОЛ в мембранах эритроцитов у больных ЭП (НАДФН-зависимое перекисление) (n=15), \* P < 0.01

Примечание: 1 – значимость отличий по сравнению с контролем; 2 – значимость отличий по сравнению с 1; 3 – значимость отличий по сравнению с 2; 4 – значимость отличий по сравнению с 3

Пусковым механизмом активации свободнорадикального окисления при ЭП являются свободные радикалы, которые образуются при эхинококкозе вследствие сдавливания эхинококковыми цистами ткани печени.

В отмеченном плане важную роль играют обнаруженные нами изменения окисления белков. Наиболее значимым следствием окислительной модификации белков является инактивация ферментов.

Как показали результаты исследования (рис.3), у пациентов с ЭП наблюдается тенденция к повышению интенсивности окислительной модификации белков при длине волны 270нм и 363нм, что свидетельствует о статистически значимом увеличении алифатических альдегид- и кетон-динитрофенилгидразонов.

Полученные данные свидетельствуют об увеличении интенсивности процесса окислительной деструкции белков под влиянием ЭП. Выявленное нами повышение интенсивности окислительной модификации белков плазмы крови исследуемых больных фактически отражает общую направленность свободнорадикальных процессов и, в частности, окисления белков во всем организме, в том числе и печеночной ткани.

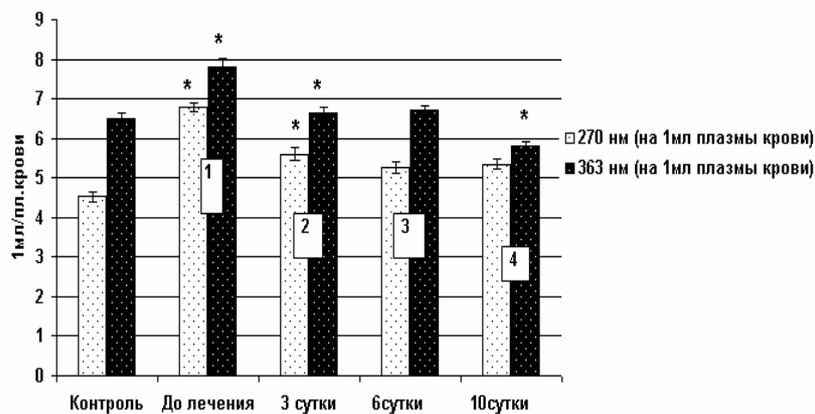


Рис. 3. Окислительная модификация белков плазмы крови у пациентов с ЭП (n=15); 270нм–алифатический альдегид-динитрофенилгидразон, 363 нм – алифатический кетон-динитрофенилгидразон, \* P < 0.01

Примечание: 1 – значимость отличий по сравнению с контролем; 2 – значимость отличий по сравнению с 1; 3 – значимость отличий по сравнению с 2; 4 – значимость отличий по сравнению с 3

Хорошо известно, что любой патологический процесс сопровождается морфологическими и функциональными изменениями в структуре клеточных мембран. Содержание и состав мембранных липидов нормальных тканей поддерживаются в пределах относительно постоянных величин и заметно нарушаются при различных внешних воздействиях. В этом аспекте заслуживает внимания изучение состава фосфолипидов (ФЛ) мембран эритроцитов при ЭП.

Результаты исследований показали уменьшение содержания фосфатидилхолинов (ФХ) при параллельном увеличении количества лизо-

фосфатидилхолинов (ЛФХ) до операции. Исследование ФС и ФЭ также обнаружило уменьшение их содержания в эритроцитарной мембране. Заслуживает внимания увеличение содержания ФИ, которые являются предшественниками вторичных мессенджеров, таких как инозиттрифосфат 1,4,5 и диглицерид в процессах трансдукции сигнала. Большую роль в индукции апоптоза в митохондриях играют КЛ, содержание которых заметно уменьшается в мембранах эритроцитов при эхинококкозе, что связано с окислительной модификацией этих липидов. Исследование СФМ позволило обнаружить увеличение их содержания. Результаты исследования выявили, что отмеченные изменения в содержании ФЛ пациентов с ЭП имеют место до операции и на 3-5-й день после операции.

К 10-му дню обнаруживалась тенденция к нормализации показателей содержания ФЛ, которые, однако, не достигали величины показателей наблюдаемых доноров (табл.1).

Таблица 1

Содержание ФЛ (% от общего количества ФЛ) в мембранах эритроцитов больных ЭП (n=15)

Фракции фосфолипидов	Контроль (доноры)	Больные эхинококкозом			
		до операции – 1	3-й день после операции – 2	6-й день после операции – 3	10-й день после операции – 4
ЛФХ	10,0±0,5	16,7±0,8*	15,3±1,0**	13,3±1,1**	12,2±0,4
СФМ	18,8±1,5	25,8±1,8**	24,1±1,7***	24,3±1,1***	22,5±2,1
ФИ	8,6±1,2	16,6±1,5*	15,8±1,8**	14,7±1,3**	10,8±0,7
ФХ	28,3±1,8	18,8±1,6***	20,1±1,7***	20,3±1,8***	22,7±2,0
ФС	14,3±1,4	9,6±1,1**	10,8±1,2	12,2±1,1	13,5±1,3
ФЭ	8,5±0,7	6,0±0,8**	7,7±0,6	7,8±0,8	8,4±0,7
КП	11,5±0,5	7,1±0,6*	7,3±0,7*	7,4±0,8*	9,3±0,8

\*P < 0,001; \*\*P < 0,01; \*\*\*P < 0,05

*Примечание:* 1 – значимость отличий по сравнению с контролем; 2 – значимость отличий по сравнению с 1; 3 – значимость отличий по сравнению с 2; 4 – значимость отличий по сравнению с 3

Патогенез ЭП связан с развитием воспалительной реакции, что вызывает активацию ряда иммунопатологических защитных, а также гуморальных и клеточных механизмов.

С этих позиций изучение роли медиаторов иммунного воспаления у больных с эхинококкозом печени представляет несомненный теоретический интерес.

кий и практический интерес. С одной стороны, эти исследования позволяют уточнить механизмы иммунных нарушений при эхинококкозе печени, а с другой – могут оказаться полезными при разработке на их основе дополнительных диагностических и прогностических критериев.

В связи с этим особый интерес представляют наши исследования, касающиеся определения содержания цитокинов в крови у пациентов с ЭП. Согласно полученным результатам, при ЭП в сыворотке крови уровень ИЛ-6 и ИЛ-8 превышает норму в несколько раз (табл.2).

Значительный интерес вызывают исследования связи провоспалительных цитокинов с оксидом азота.

Как показали результаты исследований, у больных ЭП наблюдается повышенный уровень содержания оксида азота в сыворотке крови как до операции, так и на 6-й день после операции по сравнению с показателями сыворотки крови доноров (рис.4).

Из литературных данных известно, что оксид азота продуцируется эндотелиальной NO-синтазой, в норме практически не обнаруживаемой в клетках. Однако синтез NO-синтазы индуцируется под действием провоспалительных цитокинов [7]. Активированные цитокинами и бактериальными эндотоксинами макрофаги усиливают синтез NO [12].

Образование цитокинов – важный элемент поддержания гомеостаза организма. Однако, если имеется гиперпродукция цитокинов, возможно повреждение печени. У больных с ЭП по сравнению с лицами контрольной группы наблюдается изменение уровней TNF- $\alpha$  в сыворотке крови: достоверное повышение до хирургического лечения и увеличение на 6-й день после операции. Исследование концентраций ИЛ-6 и ИЛ-8 позволило обнаружить их увеличение у пациентов при ЭП до операции (табл. 2)

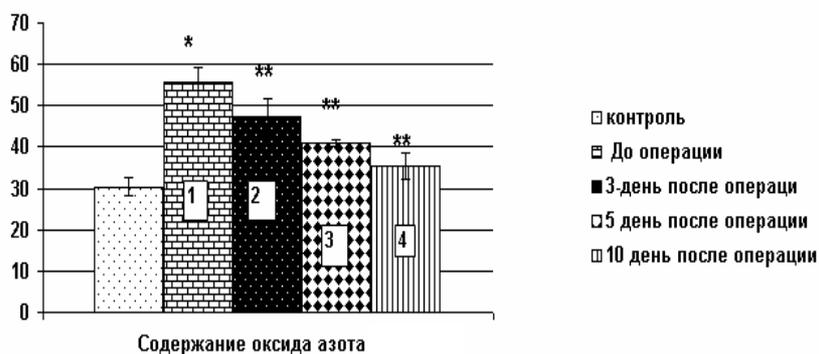


Рис. 4. Содержание оксида азота в сыворотке крови больных эхинококкозом (в мкмоль/л), (n=12), \* P<0,05, \*\*P>0,05

Примечание: 1 – значимость отличий по сравнению с контролем; 2 – значимость отличий по сравнению с 1; 3 – значимость отличий по сравнению с 2; 4 – значимость отличий по сравнению с 3

Таблица 2

Содержание оксида азота и цитокинов в сыворотке крови больных ЭП до и после операции

Показатели	Контроль	До операции – 1	3-й день после операции – 2	6-й день после операции – 3	10-й день после операции – 4
TNF- $\alpha$	10,8 $\pm$ 2	44 $\pm$ 3,8*	48 $\pm$ 4,1**	54 $\pm$ 4,6**	49 $\pm$ 4,2**
ИЛ-8	11,5 $\pm$ 2,1	54,5 $\pm$ 4,7**	62,1 $\pm$ 5,3**	56,2 $\pm$ 4,8	55,7 $\pm$ 4,8
ИЛ-6	25,15 $\pm$ 4,7	40,37 $\pm$ 3,5*	177,9 $\pm$ 15,3**	137,3 $\pm$ 11,8**	56,74 $\pm$ 4,9**
NO, мкмоль/л	30,32 $\pm$ 2,2	55,84 $\pm$ 3,6*	47,3 $\pm$ 4,3**	40,8 $\pm$ 0,8**	35,4 $\pm$ 3,1**

\* P<0,05, \*\* P<0,001

Примечание: 1 – значимость отличий по сравнению с контролем; 2 – значимость отличий по сравнению с 1; 3 – значимость отличий по сравнению с 2; 4 – значимость отличий по сравнению с 3

Таким образом, полученные нами данные позволили установить, что эхинококкоз печени сопровождается активированием свободнорадикальных реакций, приводящим к нарушению обмена белков и липидов в структуре клеточных мембран, продукции цитокинов, нарушением метаболизма, иммунного ответа, что указывает на важную роль окислительных процессов в патогенезе эхинококкоза.

Поступила 08.11.13

## Լյարդի էխինոկոկոզի զարգացման մոլեկուլային պարամետրերի փոփոխումները

Հ.Վ. Զանգինյան, Գ.Ս. Ղազարյան, Լ.Մ. Հովսեփյան

Էխինոկոկոզը բժշկական մակարոնուցիդոզի արդիական խնդիրներից մեկն է: Լյարդի էխինոկոկոզը (ԼԷ) առաջացնում է խոր ֆունկցիոնալ փոփոխություններ լյարդում՝ հարուցելով վերջինիս աշխատանքի անբավարարության հետ կապված ինչպես տեղային, այնպես էլ օրգանիզմի ընդհանուր կենսունակության խանգարումներ:

Էխինոկոկի բուշտերի կողմից լյարդի հյուսվածքի ճնշման հետևանքով հյուսվածքում առաջանում է իշեմիկ պրոցես, բերելով նրանում տարատեսակ նյութափոխանակային գործընթացների խաթարմանը: Այդ իսկ պատճառով, մեր աշխատանքը նպատակաուղղված է ուսումնասիրել թթվածին-կախյալ պրոցեսների մեխանիզմներում խաթարումների պարզաբանմանը և կարգավորմանը: Ուսումնասիրու-

թյունները հնարավորություն են տալիս ընդհանուր առմամբ բացատրելու և ճշտելու լյարդի տոքսիկ խաթարման առաջացման և ախտածնության առանձնահատկությունները: Այդ հարցերի լուծումը սերտորեն կապված է հիմնարար կենսաբանության այնպիսի խնդիրների հետ, ինչպիսիք են թթվածնի և ազոտի ազատ ռադիկալային ձևերի, սպիտակուցների և ճարպերի գերօքսիդային մոդիֆիկացումների, կենսաթաղանթների գործունեության և այլ գործընթացների ուսումնասիրության հետ:

### **Molecular pathomechanisms of the development of liver echinococcosis**

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

Echinococcosis is an actual problem of medical parasitology. Hydatid disease of the liver causes profound functional changes in the liver, leading to local and general complications associated with the failure of its action which entails violation of life of the organism as a whole . In result of squeezing by hydatid cysts of the liver tissue, liver tissue ischemia occurs, leading to disruption of metabolic processes in it. In this regard, the study of the state and mechanisms of dysregulation of oxidative processes provide an opportunity to clarify the general laws and the pathogenesis of toxic liver damage.

Addressing these issues is closely related to the fundamental general biological problems, such as study of free radical oxygen and nitrogen species, peroxidative modifications of lipids and proteins, function of biological membranes, compartmentalization of biochemical reactions.

Parasitic infestations cause an activation of a number of immune defense mechanisms, both humoral and cellular. The nature of the immune response induced by the presence of hydatid cysts in the liver is largely determined by their morphological and biological characteristics, based on the interaction of many types of immune cells.

### **Литература**

1. *Акбаев М. Ш. и др.* Паразитология и инвазионные болезни животных. 2-е изд., испр., М., 2002.
2. *Владимиров Ю.А., Арчаков А.И.* Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М., 1972.
3. *Голиков П.П., Николаева Н.Ю., Гавриленко И.А. и др.* Оксид азота и перекисное окисление липидов как факторы эндогенной интоксикации при неотложных состояниях. Бюл. exper. биол. мед., 2000, 7, с. 6 - 9.
4. *Дубинина Е.Е., Бурмистров С.О., Ходов Д.А., Поротов И.Г.* Окислительная модификация белка сыворотки крови человека , метод ее определения. Вопр. мед. химии, 1995, т.41, 1, с. 24-26.

5. *Карагезян К.Г.* Методика качественного и количественного определения фосфолипидов цельной крови, плазмы, сыворотки и цереброспинальной жидкости у собак. Лаб. дело, 1969, 1, с.23-26.
6. *Лакин Г.Ф.* Биометрия. Учеб. пособие для биол. спец. вузов. 4-е изд., перераб. и доп., М., 1990.
7. *Проскураков С.Я., Бикетов С.И., Иванников А.И., Скворцов В.Г.* Оксид азота в механизмах патогенеза внутриклеточных инфекций. Иммунология, 2000, 4, с. 9-20.
8. *Brunetti E.* for the EchinoNet Group. Preliminary results of a survey on knowledge, attitudes and practices regarding clinical management of cystic echinococcosis in European, North African and Middle Eastern countries. Am. J. Trop. Med. Hyg., 2007;77:22.
9. *Dodge J.T., Mitchell C., Hanahan. D.J.* The Preparation and Chemical Characteristics of Hemoglobin-Free Ghosts of Human Erythrocytes. Arch. Biochem. Biophys., 1962, vol.201, p.119-130.
10. *Levine R.L., Garland D., Oliver C.N.* Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. Meth. Enzymol., 1990, vol. 186, p. 464- 478.
11. *Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.* Protein measurement with folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 1951, vol. 193, 1. p. 265-275.
12. *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.