

УДК 616.008.9:616.36:577.125:616-001.28

О. В. Носач✉, Л. М. Овсяннікова, А. А. Чумак, С. М. Альохіна, Е. О. Саркісова,
О. В. Гасанова, О. Я. Плескач, Г. А. Незговорова, А. В. Зелінська, О. М. Кадюк

Державна установа “Національний науковий центр радіаційної медицини Національної академії медичних наук України”, 53, вул. Мельникова, м. Київ, 04050, Україна

ОСОБЛИВОСТІ ПОКАЗНИКІВ ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИ- ДАНТНОЇ РІВНОВАГИ У ХВОРИХ НА НЕАЛКОГОЛЬНУ ЖИРОВУ ХВОРОБУ ПЕЧІНКИ, ЯКІ ЗАЗНАЛИ ДІЇ ІОНІЗУЮЧОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ ВНАСЛІДОК АВАРІЇ НА ЧАЕС

Мета роботи – визначити особливості змін прооксидантно-антиоксидантної рівноваги у хворих на неалкогольну жирову хворобу печінки (НАЖХП), які зазнали дії іонізуючого випромінювання внаслідок аварії на ЧАЕС.

Методи. Для діагностики окислювального стресу використовували показники, що характеризують процеси окислювальної модифікації макромолекул за вмістом у крові сполук з подвійними ізольованими зв'язками (СІПЗ), дієнових кон'югатів (ДК), оксодієнових кон'югатів (ОДК), вторинних продуктів перекисного окислення ліпідів (ПОЛ), що реагують з тіобарбітуровою кислотою, продуктів окислювальної модифікації білків (ОМБ) у сироватці крові за рівнем 2,4-динітрофенілгідразонів нейтрального та основного характеру, визначали активність супероксиддисмутази і каталази еритроцитів та вміст церулоплазмину в плазмі крові. Розраховували фактор антиоксидантного стану.

Результати. За відсутності відмінностей між показниками співвідношення між первинними та проміжними продуктами ПОЛ, виявлено підвищення відносного вмісту ДК і ОДК у хворих на неалкогольний стеатогепатит (НАСГ), які зазнали радіаційного впливу, порівняно з хворими без НАЖХП і хворих на НАСГ, які не мали в анамнезі радіаційного впливу. Це може бути проявом як незначної активації процесів ПОЛ, так і порушення перетворень продуктів ліпопероксидації на різних етапах. У опромінених хворих на стеатогепатоз (СГ) на відміну від хворих на СГ, які не зазнали радіаційного впливу, порушувалась пропорційність між вмістом продуктів ПОЛ ізопропанольної фази ліпідних екстрактів крові, а коефіцієнти кореляції Спірмена між СІПЗ і ДК, а також ДК і ОДК не перевищували меж середніх значень. В групі хворих на СГ, які зазнали радіаційного впливу, рівень СІПЗ був де-що вищим порівняно з хворими на НАСГ. Незалежно від того, чи був радіаційний вплив у анамнезі, рівень продуктів ОМБ у хворих на НАСГ був вищий порівняно з хворими на СГ, але ці відмінності сягали достовірних значень лише у підгрупі неопромінених хворих на НАСГ стосовно 2,4-динітрофенілгідразонів нейтрального характеру. Середні значення показника активності каталази у групах хворих на НАСГ також перевищували відповідні значення груп хворих СГ. Середні значення фактора антиоксидантного стану у хворих як на СГ, так і на НАСГ, які зазнали радіаційного впливу, були нижчими, ніж у відповідних підгрупах неопромінених хворих на 29 та 21 %, відповідно.

Висновок. Наявність дисметаболических порушень може сприяти розвитку ендогенної інтоксикації і поглибленню патологічних змін у печінці хворих на НАЖХП від СГ до НАСГ.

Ключові слова: неалкогольна жирова хвороба печінки, прооксидантно-антиоксидантна рівновага, наслідки аварії на ЧАЕС.

Проблеми радіаційної медицини та радіобіології. 2015. Вип. 20. С. 420–431.

✉ Носач Олена Василівна, e-mail: nosach@i.com.ua

O. V. Nosach✉, L. M. Ovsyannikova, A. A. Chumak, S. M. Alekhina, E. O. Sarkisova,
O. V. Hasanova, O. Y. Pleskach, G. A. Nezhovorova, A. V. Zelinska, O. M. Kadyuk

State Institution "National Research Center for Radiation Medicine of National Academy of Medical Sciences of Ukraine" (NRCRM), Melnikova str., 53, Kyiv, 04050, Ukraine

Peculiarity of prooxidant-antioxidant balance indicators in patients with non-alcoholic fatty liver disease who have been exposed to ionizing radiation due to the Chernobyl NPP accident

Objective. To define the features of prooxidant-antioxidant balance in patients with nonalcoholic fatty liver disease who have been exposed to radiation as a result of the Chernobyl accident.

Methods. Indicators characterizing the processes of oxidative modification of macromolecules by blood levels of compounds with isolated double bonds (CIDB), diene conjugates (DC) oxodiene conjugates (ODC), secondary products of lipid peroxidation reacting with thiobarbituric acid, products of oxidative modification of proteins (OMP) in blood serum by levels of neutral and basic 2,4-dinitrofenilhidrazones, superoxide dismutase and catalase content in erythrocytes and ceruloplasmin in plasma were determined for the diagnosis of oxidative stress. The factor of antioxidant state was calculated.

Results. In the absence of differences between the ratios between the primary and intermediate products of lipids peroxidation increasing relative content of DC and ODC in patients with nonalcoholic steatohepatitis (NASH), which suffered radiation exposure, was found compared with patients without nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and NASH patients, who had no history of radiation exposure. This may be a manifestation of insignificant activation of lipid peroxidation and disturbance of LPO products transformation at different stages. In irradiated steatohepatosis (SH) patients unlike SH patients who have not undergone radiation exposure the proportionality of lipid peroxidation products between the content of izopropanol phase lipid extracts of blood was violated, and Spearman correlation coefficients between CIDB and DC and DC and ODC did not exceed the limits average values. In the group of patients with SH who suffered from radiation exposure level CIDB was slightly higher compared with patients with NASH. Regardless of whether there was a history of radiation exposure, the level of OMP products in NASH patients was higher compared with patients with SH, but the difference reached significant values only in the subgroup of non-irradiated patients with NASH by 2.4 dinitrophenilhydrazones of neutral character. Mean values of catalase activity in patients with NASH also exceeded the corresponding values of SH patient. The average values of the factor of antioxidant status in patients with both SH and NASH subjected to radiation exposure, were lower than in the corresponding subgroups of non-irradiated patients by 29 and 21%, respectively.

Conclusion. Existing dismetabolic disorders may contribute to the development of endogenous intoxication and deepening of pathological changes in the liver of NAFLD patients from SH to NASH.

Key words: nonalcoholic fatty liver disease, prooxidant-antioxidant balance, the consequences of the Chernobyl accident.

Problems of radiation medicine and radiobiology. 2015;20:420-431.

ВСТУП

Клінічне значення порушень прооксидантно-антиоксидантної рівноваги з розвитком оксидативного стресу (ОС) при прогресуванні патологічного процесу у хворих на неалкогольну жирову хворобу печінки (НАЖХП) є одним із найбільш дискусійних питань протягом останніх 20 років [1].

Хоча основні патогенетичні ланки неалкогольного стеатогепатиту (НАСГ) за участі ОС досить ґрунтовно описані [2, 3], а також розроблені маркери для його оцінки, які широко використовуються у наукових

INTRODUCTION

The clinical significance of prooxidant-antioxidant balance violations with the development of oxidative stress (OS) for the progression of pathological process in patients with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) remains one of the most debatable topics over the last 20 years [1].

Although major pathogenetic links of nonalcoholic steatohepatitis (NASH) involving OS were quite thoroughly described [2, 3] and markers developed for its assessment, which are widely

дослідженнях, проте й дотепер їх діагностична та прогностична цінність як неінвазивних тестів залишається нез'ясованою.

Поглиблення знань щодо патофізіології НАЖХП створює підґрунтя для розробки більш специфічних біомаркерів, що можуть характеризувати окремі ланки патологічних процесів, задіяні при прогресуванні НАЖХП від стеатозу до стеатогепатиту та розвитку цирозу: апоптозу гепатоцитів, ОС, запалення та активації фіброгенезу.

МЕТА

Мета роботи – визначити особливості порушень прооксидантно-антиоксидантної рівноваги хворих на НАЖХП, які зазнали дії іонізуючого випромінювання внаслідок аварії на ЧАЕС.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Обстежено 117 осіб, розподілених на 3 групи. Групу 1, основну, склав 71 хворий на НАЖХП, який зазнав радіаційного впливу, з розподілом на підгрупи 1.1 – хворі на стеатогепатоз (СГ, 22 особи) і 1.2 – хворі на НАСГ (49 осіб). Групу порівняння 2 склали 17 хворих без НАЖХП, які зазнали радіаційного впливу. В групі нозологічного контролю 3 – обстежено 29 хворих на НАЖХП, які не зазнали радіаційного впливу, в тому числі 11 хворих на СГ (підгрупа 3.1) і 18 хворих на НАСГ (підгрупа 3.2).

Для діагностики ОС використовували показники, що характеризують процеси окислювальної модифікації макромолекул і антиоксидантний стан (АОС) [4, 5].

Стан процесів перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) оцінювали за вмістом у крові сполук з ізольованими подвійними зв'язками (СІПЗ), дієнових кон'югатів (ДК), оксодієнових кон'югатів (ОДК) шляхом спектрофотометричного вимірювання оптичної густини екстрагованих ізопропанолом ненасичених ліпідів та продуктів пероксидації ліпідів з плазми та еритроцитів периферичної крові з подальшим розрахунком за формулою умовних кількісних показників [6].

Вміст вторинних продуктів ПОЛ, що реагують з тиобарбітуровою кислотою (ТБК), визначали за утворенням хромогенного триметилового комплексу при взаємодії малонового діальдегіду з ТБК [7].

Вміст продуктів окислювальної модифікації білків у сироватці крові оцінювали за рівнем 2,4-динітрофенілгідразонів нейтрального та основного характеру, що утворюються при взаємодії окислених амінокислотних залишків білків з 2,4-динітрофенілгідразином за методом Levine et al. в модифікації О. О. Дубиніної та співавт. [8].

used in scientific research, but until now their diagnostic and prognostic value as a non-invasive tests remains unclear.

Increased knowledge about the pathophysiology of NAFLD creates the basis for developing more specific biomarkers that can characterize specific links of pathological processes involved in progression of NAFLD from steatosis to steatohepatitis and development of cirrhosis: hepatocyte apoptosis, OS, inflammation and fibrogenesis activation.

OBJECTIVE

The study objective was to define the features of prooxidant-antioxidant balance in patients with NAFLD who have been exposed to radiation as a result of the Chernobyl accident.

MATERIAL AND METHODS

There were 117 persons in study population. The group 1 (main, n=71) included cases of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) exposed to radiation. Its sub-groups 1.1 included steatohepatosis cases (SH, n=22) and 1.2 – cases of nonalcoholic steatohepatitis (NASH, n=49). Patients with no NAFLD exposed to radiation were the comparison group (#2, n=17). In the nosology control group (#3, n=29) included NAFLD patients not exposed to radiation (subgroup 3.1, SH, n=11; subgroup 3.2, NASH, n=18).

Indicators characterizing the processes of oxidative modification of macromolecules and antioxidant status (AOS) were used to diagnose the OS [4, 5].

State of lipid peroxidation (LPO) was assessed by blood levels of the compounds with isolated double bonds (CІDB), diene conjugates (DC) oxodiene conjugates (ODC) by spectrophotometric absorbance measurements of unsaturated lipids extracted by isopropanol and products lipid peroxidation of plasma and red blood cells in peripheral blood, followed by the calculation according to formula of conventional quantitative indicators [6].

Secondary products of lipid peroxidation reacting with thiobarbituric acid (TBA) were assayed by chromogenic trimethyl complex formation by the interaction of malonic dialdehyde with TBA [7].

The content of products of protein oxidative modification in blood serum was evaluated by levels of neutral and basic 2,4-dinitrophenylhydrazones, formed by the interaction of oxidized proteins with amino acid residues of 2,4-dinitrophenylhydrazones by Levine et al. method modified by O.O. Dubinina et al. [8].

Визначення активності супероксиддисмутази (КФ 1.15.1.1) еритроцитів проводили на підставі оцінки здатності ферменту пригнічувати реакцію аутоокислення адреналіну в адренохром за [9]. Активність каталази (КФ 1.11.1.6) еритроцитів визначали в реакції взаємодії перекису водню та молібдену за [10].

Вміст церулоплазміну (КФ 1.16.3.1) в плазмі крові визначали із застосуванням модифікованого методу Ревина, який базується на реєстрації оптичної густини продуктів, що утворюються при окисленні парафенілендіаміну за участю цього ферменту [11]. Фактор антиоксидантного стану розраховувався за [12].

Статистичну обробку результатів досліджень здійснювали за допомогою статистичного пакету SPSS (v.16.0 for Windows) та програми Statistica 6.0.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Комплексний підхід з визначенням первинних, проміжних і вторинних продуктів ліпопероксидації (табл. 1) показав, що за відсутності відмінностей між основною групою та групами порівняння за вмістом продуктів ПОЛ, в основній групі рівень СІПЗ у хворих на стеатогепатоз (СГ) був дещо вищим порівняно з хворими на НАСГ ($p < 0,05$).

Таблиця 1

Вміст продуктів перекисного окислення ліпідів у крові хворих на НАЖХП

Table 1

Content of lipid peroxidation products in the blood of patients with NAFLD

Групи обстеження# Groups of survey#	СІПЗ, од.оп.г./мл CIDB (OD units/mL)		ДК, од.оп.г./мл DC (OD units/mL)		ОДК, од.оп.г./мл ODC (OD units/mL)		ТБК-АП, нмоль/мл TBARS (nmol/L)	
	n	M ± m	n	M ± m	n	M ± m	n	M ± m
1	71	2,308 ± 0,131	50	1,295 ± 0,099	50	0,722 ± 0,062	71	4,551 ± 0,266
1.1	22	2,545 ± 0,197 $p_{1.1-1.2} = 0,048^*$	17	1,312 ± 0,137	17	0,735 ± 0,105	21	4,480 ± 0,476
1.2	49	2,186 ± 0,169	33	1,286 ± 0,134	33	0,716 ± 0,078	50	4,581 ± 0,324
2	17	2,103 ± 0,147	13	0,982 ± 0,087	13	0,569 ± 0,077	17	3,659 ± 0,436
3	29	2,044 ± 0,143	25	1,052 ± 0,103	25	0,639 ± 0,075	28	4,341 ± 0,365
3.1	11	2,164 ± 0,302	10	1,178 ± 0,151	10	0,770 ± 0,118	11	4,679 ± 0,796
3.2	18	1,963 ± 0,135	15	0,968 ± 0,138	15	0,551 ± 0,093	17	4,122 ± 0,325

Примітки. #1 – хворі на неалкогольну жирову хворобу печінки (НАЖХП), які зазнали радіаційного впливу (основна група), в тому числі:

1.1 – хворі на стеатогепатоз (СГ) і 1.2 – хворі на неалкогольний стеатогепатит (НАСГ).

2 – хворі без НАЖХП, які зазнали радіаційного впливу.

3 – хворі на НАЖХП, які не зазнали радіаційного впливу, в тому числі:

3.1 – хворі на СГ і 3.2 – хворі на НАСГ.

* – критерій Манна-Уїтні.

СІПЗ – сполуки з ізольованими подвійними зв'язками; ДК – дієнові кон'югати; ОДК – оксодієнові кон'югати; ТБК-АП – ТБК-активні продукти.

Notes. #1 – patients with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) who underwent radiation impact (main group), including:

1.1 – steatohepatitis patients (SH) and 1.2 – patients with nonalcoholic steatohepatitis (NASH).

2 – patients without NAFLD who underwent radiation impact.

3 – NAFLD patients who were not radiation exposed, including 3.1 – SH patients and 3.2 – patients with NASH.

* – Mann-Whitney test.

CIDB – compounds with isolated double bonds; DC – diene conjugates; ODC – oxodiene conjugates; TBARS – TBA-reactive substance.

Таблиця 2

Співвідношення між первинними та проміжними продуктами ПОЛ в крові хворих на НАЖХП (M ± m, ум. од.)

Table 2

Relationship between the primary and intermediate products of lipid peroxidation in the blood of patients with NAFLD (M±m, conv. U)

Групи обстеження# Groups of survey#	n	ДК / СІПЗ& DC / CIDB&	ОДК / СІПЗ ODC / CIDB	ОДК / ДК ODC / DC
1	71	0,563 ± 0,025	0,322 ± 0,022	0,572 ± 0,033
1.1	22	0,525 ± 0,041	0,314 ± 0,480	0,570 ± 0,063
1.2	49	0,583 ± 0,033 p 1.2-2 = 0,036*	0,327 ± 0,024	0,574 ± 0,040
2	17	0,473 ± 0,036	0,270 ± 0,032	0,588 ± 0,066
3	29	0,507 ± 0,036	0,318 ± 0,037	0,571 ± 0,042
3.1	11	0,555 ± 0,047	0,368 ± 0,053	0,658 ± 0,073
3.2	18	0,475 ± 0,052	0,284 ± 0,049	0,509 ± 0,045

Примітки. # – див. табл. 1.
& – див. табл. 1.
* – критерій Манна-Уїтні.
Notes. # – see Table 1.
& – see Table 1.
* – Mann-Whitney test.

За показниками співвідношення між первинними та проміжними продуктами групи в цілому не мали відмінностей (табл. 2), проте відносний вміст ДК і ОДК у хворих на НАСГ основної групи був підвищеним відносно хворих без НАЖХП (група 2) і хворих на НАСГ підгрупи 3.2. Це може бути проявом як незначної активації процесів ПОЛ, так і порушення перетворень продуктів ліпопероксидації на різних етапах.

При пошуку критерію, який міг би характеризувати перебіг процесів ліпопероксидації, зокрема перетворення продуктів ПОЛ на проміжних етапах, було оцінено кореляційні зв'язки між рівнями вмісту СІПЗ, ДК і ОДК (табл. 3). Між зазначеними показниками встановлено позитивний кореляційний зв'язок різного ступеня у хворих як основної групи, так і груп порівняння, отже пропорційність між вмістом продуктів ПОЛ ізопропанольної фази ліпідних екстрактів крові не порушувалася.

Однак у хворих на СГ основної групи (підгрупа 1.1), на відміну від хворих на СГ підгрупи 3.1, такої пропорційності між СІПЗ і ОДК не було, а коефіцієнти кореляції Спірмена між СІПЗ і ДК, а також ДК і ОДК не перевищували меж середніх значень, на відміну від значень високого рівня у хворих на СГ в підгрупі 3.1. Також привертає увагу відсутність достовірних кореляційних зв'язків як між СІПЗ і ОДК, так і ДК та ОДК в підгрупі 3.2 хворих на НАСГ, які притаманні підгрупі 1.2 хворих основної групи.

Зважаючи на нижчий рівень кореляційних зв'язків, у хворих основної групи проведений розрахунок

In terms of the ratio between primary and intermediate products group as a whole had no differences (Table 2), but the relative content DC and ODC in patients with NASH of main group was higher than in patients without NAFLD (group 2) and patients with NASH of subgroup 3.2. This may be a manifestation of both insignificant activation of LPO and disturbance of LPO products transformation at different stages.

When searching a criterion that would characterize the progress of LPO process, including conversion of LPO products at intermediate stages correlations between levels of CIDB, DC and ODC were evaluated (Table 3). Positive correlation of varying degrees between these indicators was established in patients both the main group and the comparison groups, so the proportionality between the content of LPO products in lipid phase of isopropanol extracts of blood was not disturbed.

But in SH patients of the main group (subgroup 1.1) in contrast to subgroup 3.1, such proportionality between CIDB and ODC was absent, and correlation coefficients between CIDB and DC and DC and ODC did not exceed the limits of average values opposed to a high level of values in SH patients in the subgroup of 3.1. No significant correlation between both CIDB and ODC and ODC-DC in subgroup 3.2 of patients with NASH which was inherent in the 1.2. subgroup of patients is noteworthy.

Considering lower level of correlation in patients of main group the partial correlation coefficient (r_p)

Таблиця 3

Значення коефіцієнтів рангової кореляції Спірмена (r_s) між вмістом продуктів ПОЛ ізопропанольної фази ліпідних екстрактів крові хворих на НАЖХП

Table 3

Values of coefficients of Spearman's rank correlation (r_s) between the content of lipid peroxidation products in lipid phase of isopropanol extracts of blood of patients with NAFLD

Групи обстеження# Groups of survey#	n	СІПЗ і ДК& CIDB and DC&		СІПЗ і ОДК CIDB and ODC		ДК і ОДК DC and ODC	
		r_s	p	r_s	p	r_s	p
1	71	0,590**	0,001	0,338*	0,017	0,624**	0,001
1.1	22	0,508*	0,037	0,039	0,881	0,567*	0,018
1.2	49	0,673**	0,001	0,516**	0,002	0,639**	0,001
2	17	0,556*	0,048	0,601*	0,030	0,539*	0,050
3	29	0,748**	0,001	0,460*	0,021	0,604**	0,001
3.1	11	0,915**	0,001	0,717*	0,020	0,699*	0,024
3.2	18	0,711**	0,003	0,352	0,198	0,449	0,093

Примітки. # – див. табл. 1.

& – див. табл. 1.

*,** – двостороння кореляція достовірна на рівні 0,05 і 0,01 відповідно.

Notes. # – see Table 1.

& – see Table 1.

*,** – two-sided correlation significant at 0.05 and 0.01 respectively.

парціальних коефіцієнтів кореляції (r_p) з виключенням впливу показника СІПЗ. За цих умов у хворих на СГ основної групи рівень корекції між ДК і ОДК дещо підвищувався ($r_p = 0,750$, $p = 0,001$ порівняно $r_s = 0,567$, $p = 0,018$); і суттєво не змінювався при НАСГ ($r_p = 0,544$, $p = 0,001$ порівняно $r_s = 0,639$, $p = 0,001$). Отже, більш високий рівень СІПЗ у хворих на СГ основної групи супроводжується змінами перетворення продуктів ПОЛ на наступних етапах.

Така ситуація, коли спостерігається непропорційність змін рівнів первинних, проміжних і вторинних продуктів ПОЛ, є нерідкою в клінічній практиці. Зважаючи на це, також був проведений аналіз співвідношення між вторинними продуктами ПОЛ, зокрема ТБК-АП, та іншими показниками ліпопероксидації (табл. 4).

Найбільше підвищення відносного вмісту ТБК-АП спостерігається у хворих на НАСГ 3-ї групи, в якій відсутні достовірні кореляційні зв'язки між СІПЗ і ОДК та ДК і ОДК (табл. 3), що підкреслює важливість застосування підходів щодо індивідуальної оцінки перебігу процесів ліпопероксидації у хворих на НАЖХП.

За існуючими уявленнями, на другому етапі ОС відбувається окислювальна модифікація білків (ОМБ). В цей процес, крім активних форм кисню, залучаються інші радикальні продукти, зокрема органічні радикали ПОЛ. Внаслідок реакцій окислення білків можуть утворюватися альдегідо- та кетоні похідні нейтрального та основного характеру. Зміни

was calculated except the CIDB impact. Wherein the level of adjustment between DC and ODC a bit increased in SH patients of the main group ($r_p = 0.750$, $p = 0.001$ vs. $r_s = 0.567$, $p = 0.018$) being substantially unchanged in patients with NASH ($r_p = 0.544$, $p = 0.001$ vs. $r_s = 0.639$, $p = 0.001$). Thus, a higher level of CIDB in SH patients of the main group was accompanied by changes in conversion of lipid peroxidation products in the following stages.

Such situation when there is disproportionate changes of levels of primary, intermediate and secondary LPO products, is not infrequent in clinical practice. Therefore, the relationship between secondary products of lipid peroxidation, particularly TBA-RS and other indicators of lipid peroxidation was studied (Table 4).

The greatest increase in the relative content of TBARS was observed in patients with NASH of 3rd group in which no significant correlation between the ODC and CIDB and DC and ODC was found (Table 3), which underlines the importance of approaches to individual assessment of LPO processes in NAFLD patients.

According to existing notions, at the second phase of OS oxidative modification of proteins (OMP) is running. In this process, in addition to reactive oxygen radical are involved other products, including organic radicals of LPO. Due to oxidation reactions of proteins aldehyde and ketone derivatives of neutral and basic character

Таблиця 4

Співвідношення між ТБК-активними продуктами та первинними і проміжними продуктами ПОЛ в крові хворих на НАЖХП ($M \pm m$, ум. од.)

Table 4

Correlation between TBA-active products and primary and intermediate products of lipid peroxidation in the blood of patients with NAFLD ($M \pm m$, conv. U)

Групи обстеження# Groups of survey#	n	ТБК-АП / СІПЗ& TBA-AP / CIDB&	ТБК-АП / ДК TBA-AP / DC	ТБК-АП / ОДК TBA-AP / ODC
1	71	1,922 ± 0,154	3,815 ± 0,358	7,967 ± 1,037
1.1	22	1,898 ± 0,283	4,161 ± 0,766	8,911 ± 2,414
1.2	49	1,934 ± 0,186	3,648 ± 0,388	7,751 ± 1,025
2	17	1,883 ± 0,396	4,308 ± 0,945	8,609 ± 2,388
3	29	2,223 ± 0,215	5,673 ± 0,976	9,852 ± 1,595
3.1	11	2,129 ± 0,339	4,348 ± 0,999	7,360 ± 1,858
3.2	18	2,291 ± 0,288	6,620 ± 1,494 $p_{3.2-1.2} = 0,031^*$	11,632 ± 2,328 $p_{3.2-1.2} = 0,050^*$

Примітки. # – див. табл. 1.
& – див. табл. 1.
* – критерій Манна-Уїтні.
Notes. # – see Table 1.
& – see Table 1.
* – Mann-Whitney test.

функціональної активності білків при їх окислювальної деструкції можуть бути однією з ланок патологічних процесів, перебіг яких відбувається на тлі ОС.

Для оцінки стану процесів ОМБ у хворих на НАЖХП досліджено вміст у плазмі крові 2,4-динітрофенілгідрозонів нейтрального та основного характеру, а також розраховано співвідношення між ними (табл. 5).

Рівень продуктів ОМБ у хворих на НАСГ (підгрупи 1.2 і 3.2) був вищий порівняно з хворими на

can be formed. Changes in functional activity of proteins during their oxidative degradation can be parts of one of the pathological processes occurring against the backdrop of the OS.

To assess the state of OMP processes in NAFLD patients the content of 2,4-dinitrophenylhydrazones of neutral and basic nature in blood plasma was measured, and calculated the ratio between them (Table 5).

Level OMP products in patients with NASH (subgroups 1.2 and 3.2) was higher compared with

Таблиця 5

Вміст і співвідношення між 2,4-динітрофенілгідрозонами плазми крові у хворих на НАЖХП ($M \pm m$)

Table 5

Content and value between 2,4-dinitrophenylhydrazones in blood plasma of NAFLD patients ($M \pm m$)

Групи обстеження# Groups of survey#	n	ДНФГ ₃₇₀ &, од.оп.г./мл DNPH ₃₇₀ &, OD units/mL	ДНФГ ₄₃₀ , од.оп.г./мл DNPH ₄₃₀ , OD units/mL	ДНФГ ₃₇₀ / ДНФГ ₄₃₀ DNPH ₃₇₀ / DNPH ₄₃₀
1	71	3,795 ± 0,193	2,964 ± 0,162	1,351 ± 0,052
1.1	22	3,389 ± 0,235	2,545 ± 0,238	1,466 ± 0,146
1.2	49	3,960 ± 0,252	3,135 ± 0,203	1,304 ± 0,041
2	17	3,545 ± 0,359	2,893 ± 0,147	1,230 ± 0,079
3	29	3,901 ± 0,193	3,047 ± 0,216	1,315 ± 0,066
3.1	11	3,329 ± 0,496	2,816 ± 0,433	1,207 ± 0,064
3.2	18	4,238 ± 0,352 $p_{3.2-3.1} = 0,047^*$	3,182 ± 0,236	1,379 ± 0,095

Примітки. # – див. табл. 1.
& – ДНФГ₃₇₀ – 2,4-динітрофенілгідрозони нейтрального характеру; ДНФГ₄₃₀ – 2,4-динітрофенілгідрозони основного характеру.
* – критерій Манна-Уїтні.
Notes. # – see Table 1.
& – DNPH₃₇₀ – neutral 2,4-dinitrophenylhydrazones; DNPH₄₃₀ – basic 2,4-dinitrophenylhydrazones.
* – Mann-Whitney test.

Таблиця 6

Показники стану ферментної ланки АОС еритроцитів хворих на НАЖХП ($M \pm m$)

Table 6

Indicators of the state of erythrocyte enzyme level of AOS in NAFLD patients ($M \pm m$)

Групи обстеження#	n	Супероксиддисмутаза од / мг Hb Superoxide dismutase U/mg Hb	Каталаза мкмоль / хв × мг Hb Catalase mmol/min × mg Hb	Відновлений глутатіон ммоль / мл Reduced glutathione mmol/mL
1	71	3,529 ± 0,175	1630,6 ± 67,5	840,1 ± 38,9
1.1	22	3,423 ± 0,309	1503,8 ± 127,0	838,1 ± 61,8
1.2	49	3,577 ± 0,251	1687,6 ± 79,1	841,0 ± 49,2
2	17	4,231 ± 0,510	1561,9 ± 119,6	852,1 ± 79,8
3	29	3,540 ± 0,256	1720,5 ± 114,8	871,1 ± 55,3
3.1	11	3,780 ± 0,498	1481,6 ± 157,6	835,2 ± 77,3
3.2	18	3,393 ± 0,286	1866,4 ± 150,7	893,0 ± 76,8

Примітки. # – див. табл. 1.

Notes. # – see Table 1.

СГ(підгрупи 1.1 і 3.1 відповідно), але ці відмінності сягали достовірних значень лише у підгрупі 3.2 стосовно 2,4-динітрофенілгідразонів нейтрального характеру.

За тривалої активації вільнорадикальних процесів високу діагностичну цінність має оцінка ферментної ланки антиоксидантної системи (АОС), ефективність якої має вирішальне значення в підтриманні прооксидантно-антиоксидантного балансу за цих умов.

Для характеристики ферментної ланки АОС обстежених осіб досліджено активність основних антиоксидантних ферментів еритроцитів (супероксиддисмутази та каталази) і вміст відновленого глутатіону (табл. 6).

Групи не мали достовірних відмінностей за активністю супероксиддисмутази та каталази еритроцитів, а також рівнем відновленого глутатіону, хоча в першій, основній групі та в 3-й групі порівняння середні значення показника активності каталази у групах хворих на НАСГ перевищували відповідні значення груп хворих СГ на 11 і 20 %, відповідно.

Для оцінки антиоксидантних властивостей плазми крові визначали рівень церулоплазміну – основного антиоксиданту сироватки крові, який є багатфункціональним мідьвмісним білком. Поряд з транспортуванням міді та окисленням двовалентного заліза у тривалентне, цей глікопротеїн є полісубстратною оксидазою біогенних амінів в крові та тканинах, а також інгібітором зовнішньоклітинної мієлопероксидази [13]. Також визначався рівень вмісту сульфгідрильних груп у плазмі крові (табл. 7).

Не встановлено достовірних відмінностей між групами за рівнем вмісту у плазмі крові церулоплазміну та сульфгідрильних груп. Але аналіз кореляційних

patients with SH (subgroups 1.1 and 3.1 respectively), but these differences reached significant values only in respect to neutral 2,4-dinitrophenylhydrazones in subgroup 3.2.

For prolonged activation of free radical processes assessment level of antioxidant enzyme system (AOS) has high diagnostic value, whose effectiveness is crucial in maintaining prooxidant-antioxidant balance in these conditions.

To characterize the enzyme level of AOS the activity of the main antioxidant enzymes of erythrocytes (superoxide dismutase and catalase) and the content of reduced glutathione were investigated (Table 6).

The groups had no significant differences in activity of superoxide dismutase and catalase in erythrocytes and level of reduced glutathione, although in the first, the main group and 3rd comparison group the average values of catalase activity in patients with NASH exceed corresponding values of groups of SH patients by 11 and 20%, respectively.

To evaluate the antioxidant properties of plasma ceruloplasmin level was determined – the main antioxidant of blood, which is a multifunction copper-containing protein. Along with the transportation of copper oxidation of ferrous iron to trivalent, this glycoprotein is a multisubstrate oxidase of biogenic amines in blood and tissues and inhibitor of extracellular myeloperoxidase [13]. The level of sulfhydryl groups in blood plasma was also determined (Table 7).

No significant differences between groups in terms of the plasma ceruloplasmin and sulfhydryl groups content was found. But the analysis of cor-

Таблиця 7

Показники вмісту церулоплазміну та сульфгідрильних груп у плазмі крові хворих на НАЖХП (M ± m)

Table 7

Ceruloplasmin and sulfhydic groups content in blood plasma of patients with NAFLD (M ± m)

Групи обстеження# Groups of survey#	n	Церулоплазмін, мг/л Ceruloplasmin, mg /L	Сульфгідрильні групи, мкмоль/л Sulfhydic groups, μmol/L
1	71	326,9 ± 12,4	433,5 ± 18,9
1.1	21	333,1 ± 24,5	417,1 ± 31,4
1.2	50	324,3 ± 14,4	440,5 ± 23,5
2	17	283,9 ± 18,8	460,0 ± 37,8
3	28	314,6 ± 20,9	420,1 ± 21,4
3.1	11	351,2 ± 46,3	369,2 ± 38,1
3.2	17	290,9 ± 16,0	453,0 ± 22,6

Примітки. # – див. табл. 1.
Notes. # – see Table 1.

зв'язків між цими показниками свідчить, що групи хворих на СГ і НАСГ все ж мають певні особливості. Так, наявність зворотного кореляційного зв'язку середнього рівня між вмістом церулоплазміну та сульфгідрильних груп встановлена лише у хворих на СГ: $r_s = -0,498$, $p = 0,021$, та $r_s = -0,655$, $p = 0,029$, відповідно в підгрупах 1.1 та 3.1. Тоді як у хворих на НАСГ такий зв'язок був відсутній: $r_s = 0,090$, $p = 0,538$, та $r_s = -0,093$, $p = 0,720$, відповідно в підгрупах 1.2 і 3.2.

Привертає увагу також те, що цей результат кореляційного аналізу був аналогічним при порівнянні показників усіх хворих на СГ (1.1 і 3.1 підгруп) та всіх хворих на НАСГ (1.2 і 3.2 підгруп): у хворих на СГ – $r_s = -0,537$, $p = 0,002$; у хворих на НАСГ – $r_s = 0,045$, $p = 0,718$.

Таким чином, для груп хворих на СГ, на відміну від хворих на НАСГ, характерний взаємозв'язок між вмістом церулоплазміну та сульфгідрильних груп, що може бути використано для подальшої розробки комплексу маркерів для диференціальної діагностики зазначених патологічних станів.

Як відомо, в умовах нормального обміну речовин існують певні співвідношення активності окремих ферментів АОС, що забезпечує необхідну стаціонарну концентрацію низькомолекулярних метаболітів, в тому числі радикалів кисню, і захист мембран та інших структур клітини від пошкоджуючої дії активних форм кисню.

Супероксиддисмутаза і каталаза діють у парі за антиоксидантним механізмом. Оцінка співвідношень між активністю цих спряжених ферментів є ще одним з підходів до визначення дисфункції компонентів ферментної АОС, а вивчення кореляційних зв'язків між ними може бути корисним у з'ясуванні

relations between these indicators shows that the group of patients with SH and NASH nevertheless have certain features. Namely presence of inverse correlation between the average level of ceruloplasmin and sulfhydic groups was established only in patients with SH: $r_s = -0.498$, $p = 0.021$ and $r_s = -0.655$, $p = 0.029$, respectively, in subgroups 1.1 and 3.1. While in patients with NASH such a link was missing: $r_s = 0,090$, $p = 0.538$ and $r_s = -0.093$, $p = 0.720$, respectively, in subgroups 1.2 and 3.2.

Noteworthy the result of this correlation analysis was similar when comparing the performance of all SH patients (1.1 and 3.1 subgroups) and all patients with NASH (1.2 and 3.2 subgroups): in patients with SH – $r_s = -0.537$, $p = 0.002$; in patients with NASH – $r_s = 0.045$, $p = 0.718$.

Thus, groups of SH patients, unlike patients with NASH, were characterized by the relationship between the content of ceruloplasmin and sulfhydic groups, which can be used to further development a set of markers for the differential diagnosis of these pathological conditions.

As far as is known there are certain specific AOC enzyme activity ratio in a normal metabolism, which provides the required stable concentration of small-molecule metabolites, including oxygen resi, and the protection of membranes and other cell structures from the damaging effect of reactive oxygen species.

In a normal metabolism superoxide dismutase and catalase are paired on antioxidant mechanism. Evaluation of correlations between activity of these conjugated enzymes is another approach to determining components of enzyme AOS dysfunction, and the study of correlations between them

Таблиця 8

Розрахункові показники, що характеризують стан антиоксидантного захисту, у хворих на НАЖХП ($M \pm m$)

Table 8

Estimated parameters characterizing antioxidant status in patients with NAFLD ($M \pm m$)

Групи обстеження# Groups of survey#	n	Фактор антиоксидантного стану, ум. од. Factor of antioxidant status, conv. U	Активність каталази / супероксиддисмутази Catalase / superoxide dismutase
1	71	1544,1 ± 138,2	569,6 ± 46,5
1.1	22	1433,4 ± 187,6	507,0 ± 57,8
1.2	49	1591,5 ± 181,1	597,8 ± 62,1
2	17	2021,9 ± 295,8	504,7 ± 102,5
3	29	1661,4 ± 194,6	557,9 ± 52,2
3.1	11	1501,4 ± 309,0	467,3 ± 70,6
3.2	18	1764,9 ± 254,9	613,2 ± 70,4

Примітки. # – див. табл. 1.
Notes. # – see Table 1.

функціональних можливостей регуляції цих ферментів.

Аналіз відносних показників, що характеризують співвідношення між супероксиддисмутазою та каталазою з розрахунком інтегрального показника – фактора антиоксидантного стану (табл. 8) не виявив достовірних відмінностей між обстежуваними групами хворих. Проте середні значення фактора антиоксидантного стану як у хворих на СГ, так і на НАСГ першої, основної групи, були нижчими, ніж в підгрупах 3.1 і 3.2 на 29 та 21 %, відповідно.

ВИСНОВКИ

1. За відсутності відмінностей між показниками співвідношення між первинними та проміжними продуктами перекисного окислення ліпідів, виявлено підвищення відносного вмісту ДК і ОДК у хворих на НАСГ, які зазнали радіаційного впливу, порівняно з хворими без НАЖХП і хворих на НАСГ, які не мали в анамнезі радіаційного впливу. Це може бути проявом як незначної активації процесів ПОЛ, так і порушення перетворень продуктів ліпопероксидації на різних етапах.
2. У опромінених хворих на СГ на відміну від хворих на СГ, які не зазнали радіаційного впливу, порушувалась пропорційність між вмістом продуктів ПОЛ ізопропанольної фази ліпідних екстрактів крові, а коефіцієнти кореляції Спірмена між СІПЗ і ДК, а також ДК і ОДК не перевищували меж середніх значень. В групі хворих на СГ, які зазнали радіаційного впливу, рівень СІПЗ був дещо вищим порівняно з хворими на НАСГ.
3. Незалежно від того, чи був радіаційний вплив у анамнезі, рівень продуктів ОМБ у хворих на НАСГ був вищий порівняно з хворими на СГ, але ці

can be useful in clarifying the functionality of regulation of these enzymes.

Analysis of relative indicators of the ratio between superoxide dismutase and catalase and calculation of integral index – factor of antioxidant status (Table 8) found no significant differences between the examined groups of patients. However, average values of FAS in patients with SH and NASH in the first, the basic group, were lower than in subgroups 3.1 and 3.2 at 29% and 21%, respectively.

CONCLUSIONS

1. In the absence of differences of ratios between the primary and intermediate products of LPO increasing relative content of DC and ODC in patients with NASH, which suffered radiation exposure, was found compared with patients without NAFLD and NASH patients, who had no history of radiation exposure. This may be a manifestation of insignificant activation of lipid peroxidation and disturbance of LPO products transformation at different stages.
2. In irradiated SH patients, unlike SH patients with no radiation exposure, the proportionality of LPO products between the content of isopropanol phase lipid extracts of blood was violated, and Spearman correlation coefficients between CIDB and DC and DC and ODC did not exceed the limits average values. In the group of patients with SH who suffered from radiation exposure level CIDB was slightly higher compared with patients with NASH.
3. Regardless of whether there was a history of radiation exposure, the level of OMB products in NASH patients was higher compared with patients

відмінності сягали достовірних значень лише у підгрупі неопромінених хворих на НАСГ стосовно 2,4-динітрофенілгідразонів нейтрального характеру. Середні значення показника активності каталази у групах хворих на НАСГ також перевищували відповідні значення груп хворих СГ.

4. Середні значення фактора антиоксидантного стану у хворих як на СГ, так і на НАСГ, які зазнали радіаційного впливу, були нижчими, ніж у відповідних підгрупах неопромінених хворих на 29 та 21 %, відповідно.

5. Наявність дисметаболических порушень може сприяти розвитку ендогенної інтоксикації і поглибленню патологічних змін у печінці хворих на НАЖХП від СГ до НАСГ.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Tariq Z. Are oxidative stress mechanisms the common denominator in the progression from hepatic steatosis towards non-alcoholic steatohepatitis (NASH)? [Electronic resource] / Z. Tariq, C. J. Green, L. Hodson // *Liver Int.* – 2014. – Vol. 34, no. 7. – P. 180-190. – Available from : <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/liv.12523/full>. – Title from the screen.
2. Rolo A. P. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis / A. P. Rolo, J. S. Teodoro, C. M. Palmeira // *Free Radic. Biol. Med.* – 2012. – Vol. 52, no. 1. – P. 59–69.
3. Koek G. H. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis / G. H. Koek, P. R. Liedorp, A. Bast // *Clin. Chim. Acta.* – 2011. – Vol. 412, no. 15-16. – P. 1297–1305.
4. Григорьева И. Н. Перекисное окисление липидов у больных острым и хроническим панкреатитом / И. Н. Григорьева, Т. И Романова, Ю. И. Рагино // *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология.* – 2011. – № 7. – С. 24–27.
5. Методы оценки состояния оксидантной и антиоксидантной систем биологических объектов : методические указания / С. С. Чернадчук, Н. Л. Федорко, З. Е. Захариева [и др.]. – Одесса : [б. и.], 2011. – 52 с.
6. Методы изучения стрессовых и адаптационных реакций организма по показателям системы крови [Электронное методическое пособие] / А. В. Дерюгина, А. С. Корягин, С. В. Копылова, М. Н. Таламанова. – Нижний Новгород, 2010. – 25 с. – Режим доступа: <http://www.unn.ru/pages/e-library/methodmaterial/2010/84.pdf>
7. Андреева Л. И. Модификация метода определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой / Л. И. Андреева, Л. А. Кожемякин, А. А. Кишкун // *Лаб. Дело.* – 1988. – № 11. – С. 41–43.
8. Окислительная модификация белков плазмы крови больных психическими расстройствами (депрессия, деперсонализация) / Е. Е. Дубинина, С. В. Ковругина, М. Г. Морозова [и др.] // *Вопр. мед. химии.* – 2000. – Т. 46, № 4. – С. 398–409.
9. Misra H. P. The generation of superoxide radical during the autoxidation of hemoglobin / H. P. Misra, I. Fridovich // *J. Biol. Chem.* – 1972. – Vol. 247, no. 21. – P. 6960–6962.

with SH, but the difference reached significant values only in the subgroup of non-irradiated patients with NASH by 2,4-dinitrophenylhydrazones of neutral character. Mean values of catalase activity in patients with NASH also exceeded the corresponding values of SH patient.

4. The average values of the factor of antioxidant status in patients with both SH and NASH subjected to radiation exposure, were lower than in the corresponding subgroups of non-irradiated patients by 29 and 21%, respectively.

5. Existing dismetabolic disorders may contribute to the development of endogenous intoxication and deepening of pathological changes in the liver of NAFLD patients from SH to NASH.

REFERENCES

1. Tariq Z, Green CJ, Hodson L. Are oxidative stress mechanisms the common denominator in the progression from hepatic steatosis towards non-alcoholic steatohepatitis (NASH)? [Internet]. *Liver Int.* 2014;34(7):180-90. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/liv.12523/full>. - Title from the screen.
2. Rolo AP, Teodoro JS, Palmeira CM. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Free Radic Biol Med.* 2012;52(1):59-69.
3. Koek GH, Liedorp PR, Bast A. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Clin Chim Acta.* 2011;412(15-16):1297-1305.
4. Grigorieva IN, Romanova TI, Ragino Yul. [Lipid peroxidation in patients with acute and chronic pancreatitis]. *Experimental and Clinical Gastroenterology.* 2011;(7):24-7. Russian.
5. Chernadchuk SS, Fedorko NL, Zakhariyeva ZYe, Budniak AK, Petrov SA, Zaporozhchenko AV. [Methods for assessing the state of oxidant and antioxidant systems of biological objects. Guidelines]. Odessa; 2011. 52 p. Russian.
6. Deryugina AV, Koryagin AS, Kopylova SV, Talamanova MN. [Methods for studying of stress and adaptive reactions in terms of the blood system (electronic textbook)]. Nizhniy Novgorod; 2010. 25 p. Available from: <http://www.unn.ru/pages/e-library/method-material/2010/84.pdf>. Russian.
7. Andreyeva LI, Kozhemyakin LA, Klshkun AA. [Modification of the lipid peroxides assay method in the thiobarbituric acid test]. *Laboratornoye delo.* 1988;11:41-43. Russian.
8. Dubinina YeYe, Kovrugina SV, Morozova MG, Nuller YuL, Leonova NV, Gamper NL, et al. [Oxidative modification of plasma proteins of patients with mental disorders (depression, depersonalization)]. *Voprosy meditsinskoj khimiyi.* 2000;46(4):398-409. Russian.
9. Misra HP, Fridovich I. The generation of superoxide radical during the autoxidation of hemoglobin. *J Biol Chem.* 1972;247(21):6960-2.

10. Метод определения активности каталазы / М. А. Королюк, Л. И. Иванова, И. Г. Майорова, В. Е. Токарев // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16–19.
11. Бестужева С. В. Определение активности церулоплазмينا в сыворотке крови модифицированным методом Ревина / С. В. Бестужева, В. Г. Колб // Справочник по клинической химии. – Минск : Беларусь, 1982. – С. 290–292.
12. Чевари С. Определение антиоксидантных параметров крови и их диагностическое значение в пожилом возрасте / С. Чевари, Т. Андял, Я. Штрэнгер // Лаб. Дело. – 1991. – № 1. – С. 9-13.
10. Koroliuk MA, Ivanova LI, Maiorova IG, Tokatev Ye. [The method for determining the activity of catalase]. Laboratornoye delo. 1988;(1):16-9. Russian.
11. Bestuzheva SV, Kolb VG. [Determination of ceruloplasmin activity in the serum by a modified Revin]. In: [Handbook for Clinical Chemistry]. Minsk: Belarus; 1982. p. 290-2. Russian.
12. Chevary S. [Determination of antioxidant parameters of blood and its diagnostic value in elderly]. Laboratornoye delo. 1991;1:9-13. Russian.

Стаття надійшла до редакції 30.09.2015

Received: 30.09.2015