УДК 616.233-002:612.1

ОЦЕНКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОГО СТАТУСА КРОВИ У БОЛЬНЫХ С ХРОНИЧЕСКИМ ОБСТРУКТИВНЫМ БРОНХИТОМ РАЗЛИЧНОЙ СТЕПЕНИ ТЯЖЕСТИ

Халилов Р.А.[1], Абдурахманов А.А.[2], Джафарова А.М.[1]

[1]ФГБОУ ВО «Дагестанский государственный университет», Махачкала, e-mail: albina19764@mail.ru;
[2]ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет Минздрава России», Астрахань, e-mail: astarkhan94@mail.ru

В патогенезе хронического обструктивного бронхита (ХОБ) ключевую роль играют свободнорадикальные процессы (СРП), выраженность которых определяется степенью тяжести заболевания и состоянием антиоксидантной системы больных. Результаты проведенного исследования демонстрируют несущественные относительно контроля изменения уровня конечного продукта перекисного окисления липидов - малонового диальдегида (МДА), мочевой кислоты, сульфгидрильных и карбонильных групп белков в крови у больных ХОБ II степени, что свидетельствует о низких уровнях СРП. При этом наблюдается значительное снижение уровня ключевого антиоксиданта - глутатиона и повышение активности глутатионпероксидазы, что указывает на компенсаторную активацию антиоксидантной системы уже на начальных этапах развития ХОБ. В динамике отягощения ХОБ и перехода его в среднетяжелую и тяжелую степени происходит достоверное повышение уровней МДА, мочевой кислоты и карбонильных групп на фоне падения восстановленного глутатиона, сульфгидрильных групп белков и снижения активности глутатионпероксидазы. Таким образом, исследованные в работе маркеры прооксидантно-антиоксидантного статуса больных ХОБ зависят от степени прогрессирования заболевания и могут быть предложены, наряду со стандартными клиническими показателями, в качестве оценочных диагностикумов.

Ключевые слова: хронический обструктивный бронхит, степень тяжести, кровь, свободнорадикальные процессы, антиоксидантная система.

ESTIMATION OF INDICATORS OF PROOXIDANT-ANTIOXIDANT STATUS OF BLOOD IN PATIENTS WITH CHRONIC OBSTRUCTIVE BRONCHITIS OF VARYING SEVERITY

Khalilov R. A.[1], Abdurakhmanov A. A.[2], Dzhafarova A.M.[1]

[1]Dagestan state university, Makhachkala, e-mail: albina19764@mail.ru;
[2]Astrakhan State Medical University of the Ministry of Health of Russia, Astrakhan, e-mail: astarkhan94@mail.ru

In the pathogenesis of chronic obstructive bronchitis (COB), a key role is played by free radical processes (FRP), the severity of which is determined by the severity of the disease and the state of the antioxidant system of patients. The results of the study demonstrate insignificant changes in the levels of malonic dialdehyde (MDA), uric acid, thiols and carbonyls groups in the blood in patients with 2-degree chronic obstructive pulmonary disease, which indicates low levels of FRP. At the same time, a significant decrease in the level of key antioxidant - glutathione and increase activity glutathione peroxidase are observed, which indicates compensatory activation of the antioxidant system already at the initial stages of development of COB. In the dynamics of COB burden and its transition to moderate and severe degrees, there is a significant increase in the levels of MDA, uric acid and carbonyl groups against the background of a drop in reduced glutathione, sulfhydryl groups of proteins and a decrease in glutathione peroxidase activity. Thus, the markers of the prooxidant-antioxidant status of patients with COB studied in this paper depend on the degree of disease progression and can be proposed, along with standard clinical indicators, as evaluative diagnostic tests.

Keywords: chronic obstructive bronchitis, degree of severity, blood, free radical processes, antioxidant system.

В настоящее время различные формы патологии, связанные с обструкцией дыхательных путей, привлекают широкое внимание различных исследователей в области пульмонологии. Среди них особое место занимает хроническая обструктивная болезнь легких, значительная доля которой представлена хроническим обструктивным бронхитом

(ХОБ) [1]. ХОБ – это заболевание неаллергической природы, связанное с диффузным воспалительным поражением воздухоносных путей, которое приобретает хронический характер. Оно характеризуется бронхиальной обструкцией, что приводит к нарушению легочной вентиляции и газообмена. Клинически ХОБ проявляется кашлем, одышкой и выделением мокроты [2].

Известно, что в развитии хронической обструктивной болезни ключевую роль играют следующие факторы: высокие концентрации различных газов и пыли в воздухе, табачный дым, врожденная недостаточность фермента α_1-антитрипсина, инфекционные заболевания дыхательных путей, возрастающая аллергизация населения [2]. Было показано, что ведущую роль в патогенезе ХОБ может играть окислительный стресс, развивающийся на фоне воспалительной реакции и гипоксии. Он способствует гиперпродукции активных форм кислорода (АФК) и интенсификации свободнорадикальных процессов (СРП), в результате которых происходит повреждение молекулярных и клеточных структур [1; 3]. Нейтрализацию АФК в клетках может осуществлять антиоксидантная система (АОС), однако с возрастом активность её компонентов снижается, что, возможно, является основной причиной высокой частоты встречаемости ХОБ у пожилых людей [2].

Несмотря на большое количество имеющихся в настоящее время литературных данных об интенсивности СРП у больных с ХОБ, вопрос о том, как они зависят от степени тяжести заболевания и антиоксидантного статуса организма, остается открытым. Вместе с тем комплексное определение уровней индикаторов свободнорадикального повреждения клеточных структур и некоторых компонентов антиоксидантной системы позволило бы более детально раскрыть молекулярные механизмы деструкции дыхательных путей у больных ХОБ и их зависимость от стадии развития заболевания. Целью данной работы явилось исследование содержания некоторых маркеров СПР и активности ключевых компонентов АОС в крови больных с ХОБ различной степени тяжести.

Материалы и методы исследования

В исследование были включены больные (мужчины) с диагнозом ХОБ (II, III и IV степени тяжести) и возрастом от 50 до 80 лет. Все они находились на стационарном лечении в Республиканской клинической больнице города Махачкалы. Критерием исключения из исследования служило наличие в анамнезе больных перенесенного инфаркта миокарда и инсульта, нестабильной стенокардии, сердечной недостаточности II-IV степени, эндокринных заболеваний, заболеваний органов выделительной и пищеварительной систем. Для контроля были проведены исследования у доноров-мужчин того же возрастного диапазона без выраженных патологий со стороны различных органов и систем.

Содержание МДА в сыворотке крови определяли спектрофотометрически по его

реакции с тиобарбитуровой кислотой (ТБК). Оптическую плотность образующегося окрашенного комплекса определяли при длине волны 532 нм. Для расчёта использовали коэффициент молярной экстинкции ТБК-реагирующих продуктов, равный 1,56·105 моль$^{-1}$см$^{-1}$. *Содержание мочевой кислоты* в сыворотке крови определяли на биохимическом анализаторе Indiko (Thermal Fisher, Финляндия) энзиматическим (уриказным) методом.

Содержание карбонильных групп в белках сыворотки крови определяли спектрофотометрически по их реакции их с 2,4-динитрофенилгидразином. Оптическую плотность образующегося окрашенного комплекса определяли при длине волны 370 нм. Для расчета использовали коэффициент молярной экстинкции, равный 22000 М$^{-1}$·см$^{-1}$.

Содержание сульфгидрильных (SH) групп и глутатиона в белках сыворотки крови измеряли по содержанию продуктов их взаимодействию с 5,5'-дитио-бис 2-нитробензойной кислотой (ДТНБ) с помощью спектрофотометрического метода. Для расчета использовали коэффициент молярного поглощения, равный 13600 (М/л)$^{-1}$см$^{-1}$ [4].

Определение активности глутатионпероксидазы производили спектрофотометрическим методом путем регистрации убыли восстановленного глутатиона в среде инкубации, содержащей пероксид водорода [5]. Расчёты производили, используя коэффициент молярной экстинкции, равный 13600 М$^{-1}$ • см$^{-1}$.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью пакета компьютерных программ Statistica. Достоверность различий между контрольной и экспериментальными группами определяли с помощью критерия Стьюдента на уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

В развитии ХОБ различают 4 степени его тяжести. Причем последняя (IV) стадия – очень тяжелая, которая переходит в ХОБЛ, может заканчиваться необратимой обструкцией дыхательных путей и легочной эмфиземой [2]. В наше исследование были включены больные, имеющие различную степень тяжести заболевания. Из 59 пациентов - 20 (33,9%) имели II степень тяжести, 24 (40,7%) – III и 15 (25,4%) – IV степень. Больные с I степенью заболевания не были включены в исследование, так как за период проведения нашего исследования пациенты такой категории не поступили на стационарное лечение.

Ключевой клинической манифестацией ХОБ является обструкция дыхательных путей, которая снижает количество как вдыхаемого, так и выдыхаемого воздуха. Вследствие нарушения легочной вентиляции у больных может развиваться артериальная гипоксемия и гиперкапния. Это может привести к ситуации недостаточного поступления кислорода в ткани - гипоксии, результатом которой станет активация анаэробных процессов и ацидоз [6]. Гипоксия сопровождается накоплением восстановительных эквивалентов в

митохондриальных цепях переноса электронов, что приводит к гиперпродукции супероксидного радикала [7]. Поскольку мембрана митохондрий непроницаема для супероксида, там он может быстро нейтрализоваться с помощью фермента супероксиддисмутазы, превращаясь в пероксид водорода (H_2O_2). В условиях недостаточно высокой активности H_2O_2 - расщепляющих ферментов (каталазы и глутатионпероксидазы) пероксид в реакции с ионами двухвалентного металла или супероксидом может образовать более реактивный вид АФК – гидроксильный радикал [8].

Источниками АФК могут стать нейтрофилы, генерирующие супероксидный радикал в НАДФН-оксидазной реакции. Известно, что при воспалительных заболеваниях нижних дыхательных путей и легких происходит повышенная инфильтрация их нейтрофилами. Обнаружено, что у пациентов с острыми обострениями хронического бронхита потребление кислорода и продуцирование АФК нейтрофилами периферической крови и мокроты увеличивается [1].

АФК могут стимулировать перекисное окисление липидов (ПОЛ) и способствовать окислительной модификации как растворимых, так и мембранносвязанных белков (ОМБ), что приводит к потере их функциональной активности. Среди липидов преимущественному окислению подвергаются полиненасыщенные жирные кислоты мембран митохондрий, что может привести к нарушению их проницаемости и развитию каскада патобиохимических процессов на уровне клеток и тканей.

Об интенсивности ПОЛ можно судить по содержанию его конечных продуктов, в частности малонового диальдегида (МДА). Результаты проведенного нами исследования свидетельствуют о низком уровне МДА в крови больных ХОБ с II степенью (табл.). При этом у больных с III степенью ХОБ содержание МДА в крови увеличивается на 64,17% относительно контроля, а у больных с IV степенью оно достигает значений, превышающих уровень нормальных значений в 2,5 раза.

Содержание маркеров СРП в сыворотке крови больных с ХОБ различной степени тяжести

Исследованные группы	МДА (мкМ/л)	Мочевая кислота (мкМ/л)
Контроль (n=15)	12,56±1,07	262,3±13,2
II степень ХОБ (n=20)	14,04±2,04	253,2±21,9
III степень ХОБ (n=24)	20,62±1,64*	362,7±20,6*
IV степень ХОБ (n=15)	32,0±0,54*	405,8±31,4*

Примечание: * - $P<0,05$ относительно контроля.

Свободные радикалы кислорода и продукты ПОЛ могут способствовать окислительным повреждениям белков. Результатом окислительных деструкций белков

является денатурация или конформационные переходы, которые существенно изменяют их функциональные характеристики. Главной мишенью активных форм кислорода и азота являются тиоловые группы белков, принадлежащие остаткам аминокислоты цистеина. В условиях окислительного стресса SH-группы белков депротонируются с образованием дисульфидов [9]. Исследование динамики изменений содержания сульфгидрильных групп в белках сыворотки крови у больных с ХОБ показало, что состояние тиолдисульфидной антиоксидантной системы определяется степенью тяжести заболевания (рис. 1). Уже на начальных стадиях заболевания (II степень) концентрация SH-групп у больных ХОБ незначительно снижается. Переход заболевания в III степень сопровождается статистически значимым падением уровня тиоловых групп (на 24,4% относительно контроля). При этом содержание сульфгидрильных групп у больных с IV степенью ХОБ достигает минимального уровня, составляющем 61,0% от уровня контроля.

В белках содержатся аминокислотные остатки лизина, аргинина и гистидина, способные подвергаться окислительной модификации с образованием карбонильных групп [9]. У пациентов со II степенью ХОБ нами была обнаружена тенденция к повышению уровня карбонилов в белках сыворотки крови (на 14,1%) (рис. 1). Переход болезни в среднетяжелую (III) степень значительно увеличивает содержание карбонильных групп (на 48,8% относительно контроля). Максимальные уровни карбонилирования аминокислот в белках крови обнаружены у больных с IV степенью ХОБ - они примерно в 2 раза превышают таковые показатели у относительно здоровых доноров той же возрастной категории.

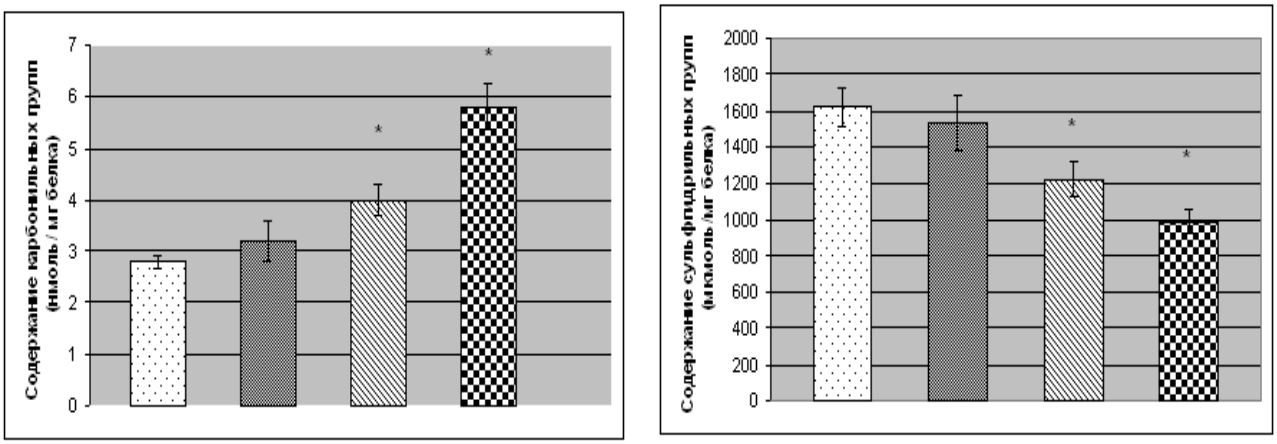

*Рис. 1. Содержание карбонильных и сульфгидрильных групп в белках сыворотки крови больных с ХОБ различной степени тяжести: ⬚ - контроль, ▒ - II степень, ▨ - III степень, ▩ - IV степень. Примечание: * - P<0,05 относительно контроля*

Известно, что при гипоксических состояниях АТФ подвергается деградации до аденина и ксантина. Ксантин в дальнейшем метаболизируется с образованием мочевой кислоты – конечного продукта обмена пуриновых нуклеотидов. Данная реакция может

катализироваться двумя формами ксантиноксидоредуктаз - ксантиндегидрогеназой и ксантиноксидазой, которые способны конвертироваться друг в друга. При этом в результате ксантиноксидазной реакции образуется супероксидный анион, который может образовать другие АФК. Было показано, что гипоксия может способствовать конвертации фермента ксантиндегидрогеназы в ксантиноксидазу [10]. Таким образом, высокие уровни мочевой кислоты в крови могут опосредованно указывать на интенсивность генерации АФК в ксантиноксидазной реакции. Результаты исследования, представленные в таблице, демонстрируют, что у больных со II степенью ХОБ содержание мочевой кислоты не претерпевает существенных изменений. Однако в динамике прогрессирования заболевания происходит существенное повышение содержания мочевой кислоты, составляющее относительно контроля у пациентов с III степенью - 38,7%, а у пациентов с IV степенью - 54,8%.

Интенсивность СРП зависит от содержания и активности различных неферментативных и ферментативных звеньев антиоксидантной системы. Ключевую роль в защите клеток от АФК играет низкомолекулярная тиолдисульфидная система на основе восстановленного глутатиона. Восстановленный глутатион – это трипептид, содержащий свободную тиольную группу [11]. Он может проявлять свою антиоксидантную активность как самостоятельно, так и в сочетании с реакцией, катализируемой глутатионпероксидазой. Восстановление окисленного глутатиона осуществляется глутатионредуктазой, которая в качестве донора восстановленных эквивалентов использует НАДФН, образующийся в пентозофосфатном пути окисления углеводов [12]. Исследование содержания глутатиона в сыворотке крови больных с ХОБ показало, что снижение его содержания в крови у больных с ХОБ, составляющее 24,5%, происходит даже у больных со средней (II) степенью тяжести ХОБ (рис. 2). Переход болезни в среднетяжелую степень способствует еще более выраженному снижению уровня восстановленного глутатиона (на 33,5%). При тяжелой форме ХОБ это снижение становится драматическим, составляя 43,1% относительно такового здоровых людей.

Одним из наиболее эффективных ферментативных антиоксидантов крови является глутатионпероксидаза. Она обеспечивает нейтрализацию и деградацию органических перекисей и перекиси водорода, используя в качестве субстрата восстановленный глутатион. Результаты нашего исследования показали, что на начальных этапах развития ХОБ (II степень) происходит достоверное повышение глутатионпероксидазной активности, составляющее 18,5% от уровня контроля (рис. 2). Переход заболевания в III степень приводит к незначительному снижению активности фермента. Однако по мере дальнейшего прогрессирования ХОБ снижение активности

глутатионпероксидазы становится выраженным и составляет относительно контроля 31,5%.

Таким образом, активность глутатионпероксидазы на начальных этапах развития ХОБ, когда в крови уже появляются первые интермедиаты ПОЛ, увеличивается. Это позволяет снизить количество неорганических и органических пероксидов, которые способны осуществлять окислительную модификацию белков и нарушать барьерные функции биологических мембран. В этом отношении повышение каталитической эффективности глутатионпероксидазы у больных с ХОБ II степени носит компенсаторно-приспособительный характер. И оно отрицательно коррелирует с уменьшением уровня восстановленного глутатиона.

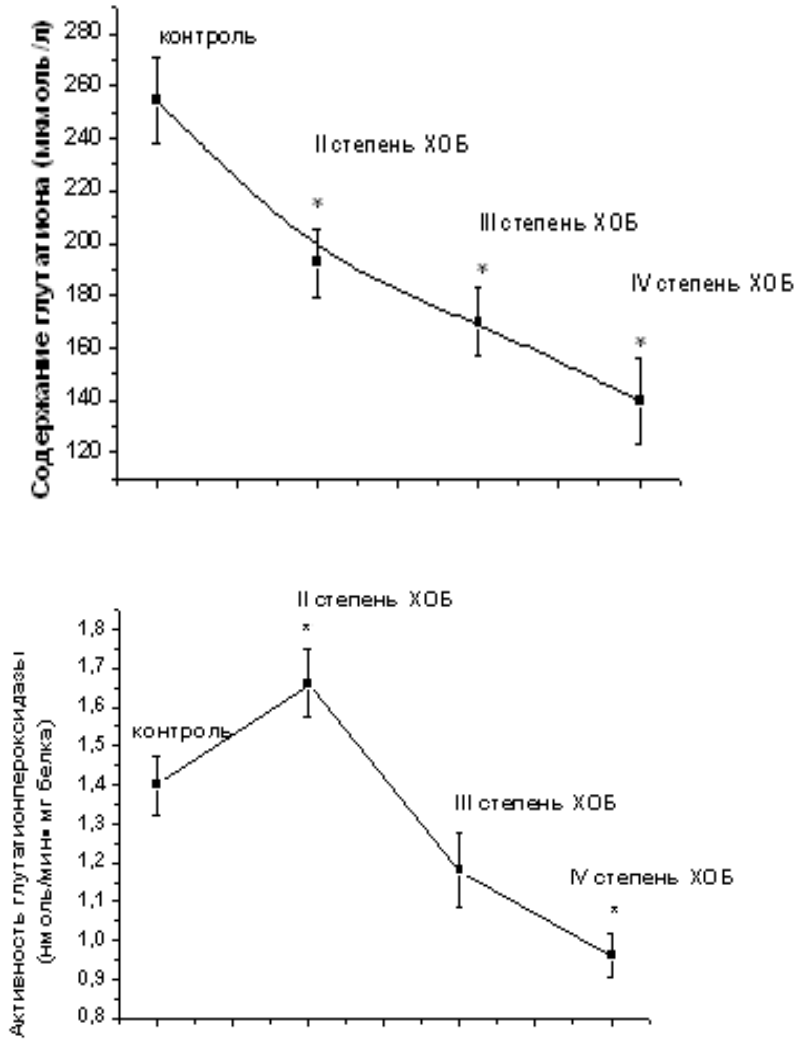

Рис. 2. Динамика изменения содержания глутатиона и активности глутатионпероксидазы в сыворотке крови больных ХОБ различной степени тяжести.
*Примечание: * - P<0,05 относительно контроля*

Результаты проведенного исследования позволяют предположить, что по мере

прогрессирования степени бронхиальной обструкции у больных ХОБ происходит истощение низкомолекулярных компонентов антиоксидантной системы организма, что на фоне нарастающей генерации АФК приводит к нарушению баланса прооксиданты/антиоксиданты. При этом образующиеся в избытке свободные радикалы кислорода могут способствовать окислению глутатионпероксидазы и снижению её активности. В совокупности это способствует повышению концентрации гидроперекисей липидов и продуктов их метаболизации, в частности МДА.

Заключение

Результаты проведенного исследования указывают на прогрессирующую в динамике отягощения степени обструкции бронхов активацию СРП у больных с ХОБ. Это выражается в увеличении уровня МДА, карбонильных групп в белках сыворотки крови и снижении сульфгидрильных групп. Высокие уровни мочевой кислоты, обнаруженные у больных со среднетяжелой и тяжелой степенью ХОБ, указывают на весомый вклад ксантиноксидазной реакции в генерацию АФК. По мере прогрессирования ХОБ происходит снижение активности глутатионпероксидазы и концентрации глутатиона. Это свидетельствует об истощении ключевых компонентов тиолдисульфидной антиоксидантной системы, играющей важную роль в детоксикации АФК. Обнаруженная нами зависимость различных маркеров СРП и компонентов антиоксидантной системы от степени бронхиальной обструкции позволяет рекомендовать их в качестве диагностикумов для количественной оценки тяжести ХОБ, наряду со стандартными клиническими показателями.

Список литературы

1. Vaitkus M., Lavinskiene S., Barkauskiene D., Bieksiene K., Jeroch J., Sakalauskas R. Reactive Oxygen Species in Peripheral Blood and Sputum Neutrophils During Bacterial and Nonbacterial Acute Exacerbation of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Inflammation. 2013. vol. 36. no. 6. P. 1485–1493. DOI: 10.1007/s10753-013-9690-3.
2. Чучалин А.Г. Респираторная медицина: руководство: в 3 т. 2-е изд. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2017. 464 с.
3. Footitt J., Mallia P., Durham A.L., Ho W., Trujillo-Torralbo M.B. Telcian A.G., Del Rosario A., Chang C., Peh H.Y., Kebadze T., Aniscenko J., Stanciu L., Essilfie-Quaye S., Ito K., Barnes P.J., Elkin S.L., Kon O.M., Wong W.S., Adcock I.M., Johnston S.L. Oxidative and nitrosative stress and histone deacetylase-2 activity in exacerbations of COPD. Chest. 2016. vol. 149. no. 1. P.62–73. DOI: 10.1378/chest.14-2637.
4. Арутюнян А. В., Дубинина Е. Е., Зыбина Н. Н. Методы оценки свободнорадикального

окисления и антиоксидантной системы организма: методические рекомендации. СПб.: ИКФ «Фолиант», 2000. 104 с.

5. Разыграев А.В. Метод определения глутатионпероксидазной активности с использованием пероксида водорода и 5, 5'-дитиобис (2-нитробензойной кислоты) // Клинико-лабораторный консилиум. 2004. № 4. С. 19.

6. Gungor S., Kargin F., Irmak I., Ciyiltepe F., Tunçay E. A., Guney P.A., Aksoy E., Ocakli B., Adiguzel N., Karakurt Z. Severity of acidosis affects long-term survival in COPD patients with hypoxemia after intensive care unit discharge. Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis. 2018. vol.13. P.1495–1506.

7. Скулачев В.П., Богачев А.В., Каспаринский Ф.О. Мембранная биоэнергетика. М.: МГУ, 2012. 368 с.

8. Wong H.S., Dighe P.A., Mezera V., Monternier P.A., Brand M.D. Production of superoxide and hydrogen peroxide from specific mitochondrial sites under different bioenergetic conditions. J. Biol. Chem. 2015. vol. 292. P.6804–16809. DOI: 10.1074/jbc.R117.789271.

9. Cai Z., Yan L.J. Protein Oxidative Modifications: Beneficial Roles in Disease and Health. J. Biochem. Pharmacol. Res. 2013. vol.1. no 1. P.15–26.

10. Harrison R. Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? Free Radic. Biol. Med. 2002. vol. 33. P. 774-797. DOI:10.1016/s0891-5849(02)00956-5.

11. Zitka O., Skalickova S., Gumulec J., Masarik M., Adam V., Hubalek J., Trnkova L., Kruseova J., Eckschlager T., Kizek R. Redox status expressed as GSH: GSSG ratio as a marker for oxidative stress in paediatric tumour patients. Oncology Letters. 2012. vol. 4. no. 6. P. 1247-1253. DOI: 10.3892/ol.2012.931.

12. Калинина Е.В., Чернов Н.Н., Новичков М.Д. Роль глутатиона, глутатионтрансферазы и глутаредоксина в регуляции редокс-зависимых процессов // Успехи биологической химии. 2014. Т.54. P. 299–348.