

В.В. КИЩУК, Я.П. ГРИЦУН

ОСОБЛИВОСТІ ЗМІН ПОКАЗНИКІВ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕСУ В КРОВІ ХВОРИХ З РІЗНИМИ ФОРМАМИ СКЛЕРОМИ

Вінницький нац. мед. ун-тет ім. М.І. Пирогова

В Україні, як і в інших країнах, склерома є однією з актуальних проблем сучасної оториноларингології та системи охорони здоров'я в цілому: медико-соціальна значущість даної патології полягає у високій резистентності до терапевтичних заходів лікування, що нерідко призводить до інвалідизації та втраті працездатності хворих.

Сучасний етап досліджень характеризується не тільки інтенсифікацією пошуку етіології та розкриттю елементів патогенезу склероми, але й надзвичайною увагою до діагностики та оцінки ефективності лікування. І цей аспект проблеми містить більше запитань, ніж відповідей. Слід зазначити, що на сьогодні в літературних джерелах відсутні дані щодо ролі оксидативного стресу в перебігу хронічного специфічного запалення верхніх дихальних шляхів при склеромі. Можна припустити, що негативний вплив активних кисневих інтермедіатів на склероматозне ураження дихальних шляхів реалізується через ті ж механізми, що й при інших патологічних станах [4-6, 8, 10]. Показано, що активні форми кисню індукують перекисне окиснення ліпідів, протеїнів, ДНК, що супроводжується порушенням фосfolіпідного бішару клітинних мембран, розладами репаративного та проліферативного потенціалу клітин, активацією апоптозу. Поряд з цим відмічається дисрегуляція редокс-залежних процесів, виникає цитокіновий дисбаланс, ініціюється розвиток запальних та аутоімунних реакцій, змінюється продукція вазоактивних медіаторів [3, 6, 7, 9].

На сьогодні роль оксидативного стресу в патогенезі хронічного специфічного запалення верхніх дихальних шляхів у хво-

рих на різні форми склероми не вивчено. Тому *метою* нашого дослідження було оцінити стан про- та антиоксидантної системи, а також активність вільнорадикального окиснення ліпідів та протеїнів у пацієнтів з різними формами склероми.

Матеріали та методи дослідження

Представлений матеріал отриманий при обстеженні 92 хворих (33 чоловіка, 59 жінок) у віці від 23 до 79 років (в середньому – $53,5 \pm 14,57$ років), з яких у 31 хворого була склерома переважно інфільтративної форми, у 30 – склерома переважно атрофічної форми, у 31 – склерома переважно рубцевої форми. Групу порівняння склали 20 практично здорових осіб.

Стан прооксидантної системи вивчали за активністю в крові ксантиноксидази, а стан ферментної антиоксидантної системи – за активністю супероксиддисмутази та каталази, вмістом відновленого глутатіону, рівнем протеїнових сульфгідрильних -SH та дисульфідних -S-S- груп. Активність ксантиноксидази визначали за утворенням сечової кислоти, супероксиддисмутази – за ступенем пригнічення окиснення кверцитину, активність каталази – за швидкістю деградації гідроген пероксиду в реакції з амоній молібдатом. Концентрацію відновленого глутатіону визначали у ТХО-фільтраті крові в глутатіонтрансферазній реакції. Рівень протеїнових 8Н-груп в плазмі крові визначали за реакцією з реактивом Елмана-5,5'-дітіобіс(2-нітробензоатом), кількість дисульфідних зв'язків оцінювали за приростом 8Н-груп після інкубації крові з дитіотреїтолом.

Активність вільнорадикального окиснення ліпідів оцінювали за вмістом первинних та вторинних продуктів ліпопероксидації відповідно діє нових кон'югатів та малонного діальдегіду в крові, а активність процесів окисної модифікації протеїнів оцінювали на основі визначення вмісту карбонільних груп протеїнів в сироватці крові. Вміст діє нових кон'югатів оцінювали за світлопоглинанням ліпідного екстракту крові в ультрафіолетовій області спектра. Рівень малонного діальдегіду визначали за реакцією з тіобарбітуровою кислотою за набором ТБК-Агат (Биоконт, РФ), а карбонільних груп протеїнів – за реакцією з 2,4-динітрофенілгідразином.

Отримані в процесі дослідження дані аналізувались за допомогою статистичних методів з використанням пакету програм «SPSS 23». Всі отримані кількісні дані оброблені методами варіаційної статистики. Для кожного кількісного параметра були визначені: середнє значення, середнє квадратичне відхилення (σ), помилка середнього, медіана, інтерквартильний розмах (25-й та 75-й процентілі), 95% довірчий інтервал.

Для порівняння параметричних даних (після перевірки кількісних даних на нормальний розподіл за допомогою тестів Колмогорова-Смірнова та Шапіро-Вілка) застосовувався метод ANOVA (для декількох груп) і t-критерій Ст'юдента для 2 незалежних вибірок. Для порівняння непараметричних даних застосовувались методи Круаскела-Уолліса (для декількох груп) та Манна-Уїтні для 2 груп незалежних сукупностей. Статистично значущими вважались відмінності при $p < 0,05$ (95%-й рівень значущості) і при $p < 0,01$ (99%-й рівень значущості) [1, 2].

Результати дослідження та їх обговорення

Оцінка стану прооксидантної системи показала, що при всіх формах склероматозного ураження дихальних шляхів активність ксантиноксидази вірогідно зростає, хоч і в різній мірі. Так, у хворих з переважно інфільтративною формою захворювання активність ксантиноксидази (Me; CI 95%) становила 3,30 мкмоль/хв·мг протеїну (2,95; 3,58), що в 2,44 рази більше, ніж в контролі

– 1,32 (1,09; 1,57) мкмоль/хв·мг протеїну ($p < 0,05$). При переважно атрофічній та рубцевій формах склероми активність цього ферменту становила, відповідно, 2,03 (1,57; 2,49) та 2,21 (1,76; 2,78) мкмоль/хв·мг протеїну, що на 51,6 та 63,7 % більше, ніж показник в контрольній групі ($p < 0,05$). Активність ксантиноксидази при переважно інфільтративній формі вірогідно більша в порівнянні з такою при інших формах склероми (рис. 1).

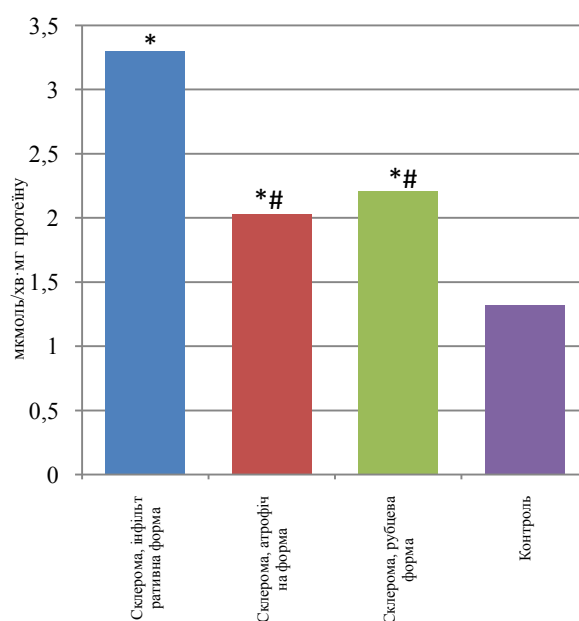


Рис. 1. Активність ксантиноксидази у сироватці крові пацієнтів контрольної групи та хворих на різні форми склероми (M±m).

Примітки: 1. * - статистично достовірна відмінність відносно показника у контрольній групі ($p < 0,05$); 2. # - статистично достовірна відмінність відносно показника у групі хворих на інфільтративну форму склероми ($p < 0,05$).

З'ясовано, що при переважно інфільтративній формі склероми активність каталази достовірно не змінюється, тоді як при атрофічній та рубцевій формах реєструється достовірно зменшення активності цього ферменту на 31,5% та 27,4%, відповідно, в порівнянні з контролем.

Зміни активності супероксиддисмутази в сироватці крові при різних формах склероми мають ті ж тенденції, що й каталази. У хворих на інфільтративну форму активність цього ферменту достовірно не відрізняється від показника контрольної

групи. При атрофічній та рубцевій формах склероми активність супреоксиддисмутази була, відповідно, на 33,2% та 28,1% меншою, ніж в контролі. Статистично достові-

рної різниці між активністю каталази та супероксиддисмутази при атрофічній та рубцевій формах склероматозного ураження дихальних шляхів не виявлено (табл. 1).

Таблиця 1

Активність антиоксидантних ферментів у сироватці крові хворих на різні форми склероми та осіб контрольної групи та ($M \pm m$)

Групи пацієнтів	n	Активність каталази, мккат/л	Активність супероксиддисмутази, ум.од./мг протеїну
Контроль	20	41,6±1,00	39,8±1,14
Склерома, інфільтративна форма	31	39,6±0,76	41,5±0,81
Склерома, атрофічна форма	30	28,5±0,75*#	26,6±0,79*#
Склерома, рубцева форма	31	30,2±0,74*#	28,6±0,77*#

Примітки:

1. * - статистично достовірна відмінність ($p < 0,05$) відносно показників у контрольній групі;
2. # - статистично достовірна відмінність ($p < 0,05$) відносно показників у групі хворих на інфільтративну форму склероми.

Далі ми оцінили запаси ендogenous глутатіону в сироватці крові. Рівень відновленого глутатіону при переважно інфільтративній формі склероми статистично вірогідно не відрізнявся від такого показника в контрольній групі. Натомість, при переважно атрофічній та рубцевій формах склероматозного ураження дихальних шляхів відзначається формування дефіциту відновленого глутатіону. Так, при атрофічній та рубцевій формах склероми реєструється зменшення вмісту відновленого глутатіону, відповідно, на 33,8 % та 26,2 %, порівняно з контролем (відповідно: медіана – 2,37 мкмоль/л, $P_{25}-P_{75}$ – 1,55-3,42 мкмоль/л та медіана – 2,82 мкмоль/л, $P_{25}-P_{75}$ – 1,99-3,72 мкмоль/л проти медіани 3,79 мкмоль/л, $P_{25}-P_{75}$ – 2,90-4,32 мкмоль/л у здорових пацієнтів). Між вмістом відновленого глутатіону в сироватці крові хворих на атрофічну та рубцеву форми склероми достовірних відмінностей не виявлено (рис. 2).

Специфічне ураження дихальних шляхів супроводжується різним ступенем наростання вмісту первинних продуктів пероксидації ліпідів, що залежить від форми

склероми. Так, найбільше зростання рівня діє нових кон'югатів (в 2,96 раз, $p < 0,05$) відзначається при інфільтративній формі склероми. Атрофічна та рубцева форми склероми викликають менш істотне збільшення рівня первинних продуктів ліпопероксидації. При атрофічній формі склероми рівень діє нових кон'югатів в 2,17 раз ($p < 0,05$) перевищує показники контролю, а при рубцевій формі склероми супроводжується збільшенням вмісту цього метаболіту в 2,3 рази порівняно з контролем ($p < 0,05$) (табл. 2).

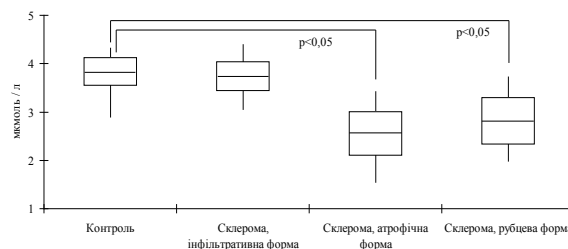


Рис. 2. Вміст відновленого глутатіону в крові пацієнтів контрольної групи та хворих на різні форми склероми ($M \pm m$). Верхня та нижня межі боксів відповідають P_{25} та P_{75} , лінії за межами боксів – P_5 та P_{95} , лінія у середині боксів – медіана.

Склероматозне ураження дихальних шляхів викликає зміни рівня малонового діальдегіду, які аналогічні до таких для дієнових кон'югатів. Найбільш суттєве зростання вмісту малонового діальдегіду (в 3,1

рази, $p < 0,05$) відмічається при інфільтративній формі склероми, при атрофічній та рубцевій формах склероми їх рівень перевищує показники контролю в 2,36 та 2,43 рази, відповідно ($p < 0,05$) (табл. 2).

Таблиця 2

Вміст первинних та вторинних продуктів ліпопероксидації у сироватці крові хворих на різні форми склероми та осіб контрольної групи та ($M \pm m$)

Групи пацієнтів	n	Дієно вікон'югати, од.опт.щ./мл	Малоновий діальдегід, мкмоль/л
Контроль	20	1,74±0,06	3,45±0,10
Склерома, інфільтративна форма	31	5,15±0,06*	10,6±0,12*
Склерома, атрофічна форма	30	3,78±0,12*#	8,13±0,11*#
Склерома, рубцева форма	31	4,01±0,08*#	8,40±0,14*#

Примітки:

1. * - статистично достовірна відмінність ($p < 0,05$) відносно показників у контрольній групі;
2. # - статистично достовірна відмінність ($p < 0,05$) відносно показників у групі хворих на інфільтративну форму склероми.

З'ясувалось, що при склероматозному ураженні дихальних шляхів реєструється зростання активності окисної модифікації протеїнів, найбільш виражене при інфільтративній формі та менш істотне – при атрофічній та рубцевій формах. Так, при інфільтративній формі склероми вміст карбонільних груп протеїнів перевищує контрольний показник на 92,3 % (медіана вмісту становить 109 од.опт.щ./мг протеїну, а $P_{25}-P_{75}$ – 23,2-35,4 од.опт.щ./мг протеїну проти медіани – 56,2 од.опт.щ./мг протеїну, $P_{25}-P_{75}$ – 47,8-63,4 од.опт.щ./мг протеїну у здорових осіб). У хворих на атрофічну та рубцеву форми склероми вміст цього метаболіту перевищував контрольні показники на 32,5-38,3 % (медіана вмісту становить, відповідно, 76,8 та 77,7 од.опт.щ./мг протеїну, а $P_{25}-P_{75}$ – 65,1-83,5 та 67,8-87,9 од.опт.щ./мг протеїну, відповідно) (рис. 3).

Також ми оцінили редокс-статус протеїнів на основі визначення вмісту SH- та -S-S- груп в сироватці крові (табл. 3).

Як свідчать дані, представлені в табл. 3, при всіх формах склероматозного ураження дихальних шляхів виникає дефіцит SH- груп, але вираженість останнього зале-

жить від форми захворювання. У хворих з переважно інфільтративною формою склероми вміст сульфгідрильних груп був на 59% менше, ніж в контролі ($p < 0,05$).

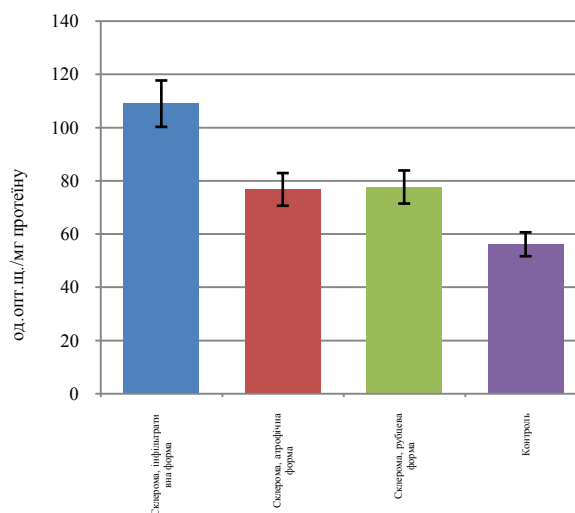


Рис. 3. Вміст карбонільних груп протеїнів у сироватці крові пацієнтів контрольної групи та хворих на різні форми склероми ($M \pm m$).

Примітки: 1. * - статистично достовірна відмінність ($p < 0,05$) відносно показника в контрольній групі; 2. # - статистично достовірна відмінність ($p < 0,05$) відносно показника в групі хворих на інфільтративну форму склероми

При переважно атрофічній та рубцевій формах склероми вміст цих груп був, відповідно, на 28,9% та 30,3% менше, порівняно з показником в контрольній групі ($p < 0,05$). Рівень SH-груп при переважно інфільтративній формі вірогідно менший в порівнянні з таким при інших формах склероми.

Специфічне ураження дихальних шляхів під впливом склероми супроводжується збільшенням рівня дисульфідних груп, причому найбільш вираженим воно є при інфільтративній формі та менш істотним – при інших формах захворювання. У

хворих з переважно інфільтративною формою склероми вміст дисульфідних груп був на 68,4% менше ($p < 0,05$), ніж в контролі. При переважно атрофічній та рубцевій формах склероми вміст -S-S- груп протеїнів перевищував на 28,2 % та на 32,2 %, відповідно, аналогічний показник здорових осіб. Вміст дисульфідних груп при переважно інфільтративній формі є статистично достовірно більшим у порівнянні з таким при інших формах склероми. При атрофічній та рубцевій формах склероми статистично достовірних відмінностей рівня цього метаболіту не зареєстровано.

Таблиця 3

Вміст сульфгідрильних та дисульфідних груп протеїнів у сироватці крові хворих на різні форми склероми та осіб контрольної групи та ($M \pm m$)

Групи пацієнтів	n	SH-групи протеїнів, мкмоль / л	-S-S- групи протеїнів, мкмоль / л
Контроль	20	769±5,39	174±3,21
Склерома, інфільтративна форма	31	315±4,06*	293±2,90*
Склерома, атрофічна форма	30	547±3,99*#	223±3,77*#
Склерома, рубцева форма	31	536±4,71*#	230±3,41*#

Примітки:

1. * - статистично достовірна відмінність ($p < 0,05$) відносно показників у контрольній групі;
2. # - статистично достовірна відмінність ($p < 0,05$) відносно показників у групі хворих на інфільтративну форму склероми.

Висновки

1. Склероматозне ураження верхніх дихальних шляхів супроводжується дисбалансом в системі про- та антиоксидантів, що супроводжується активацією процесів вільнорадикального окиснення ліпідів та протеїнів, і викликає порушення редокс-статусу протеїнів.

2. При різних формах склероми відмічаються деякі специфічні особливості змін в про- та антиоксидантному гомеостазі. Так, переважно інфільтративна форма склероми супроводжується найбільш вираженою активацією прооксидантної системи (ксантиноксидаза), що супроводжується більш істотним зростанням інтенсивності вільнора-

дикальних реакцій окиснення ліпідів та протеїнів та більш масштабними змінами редокс-статусу протеїнів, що, ймовірно, асоціюється з вираженою активністю запального процесу та цитокиновим дисбалансом в порівнянні з іншими формами склероми. Натомість, при атрофічній та рубцевій формах виникає більш істотне зменшення активності антиоксидантної ланки (каталаза, супероксиддисмутази та відновлений глутатіону) та менш виражені зміни прооксидантної системи, активності пероксидації ліпідів і протеїнів та редокс-статусу протеїнів, що асоціюється з ослабленням запальної реакції та змінами проліферативного потенціалу клітин в порівнянні з інфільтративною формою склероми.

Література

1. Гланц С.А. Медико-биологическая статистика. – М.: Практика, 1998. – 459 с.
2. Лапач С.Н., Губенко А.В., Бабич П.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. – К.: МОРИОН, 2001. – 408 с.
3. Dizdaroglu M. Oxidatively induced DNA damage: mechanisms, repair and disease // *Cancer Lett.* – 2012. – Vol. 327, № 1-2. – P. 26-47.
4. Fessel J.P., West J.D. Redox biology in pulmonary arterial hypertension // *Pulm. Circ.* – 2015. – Vol. 5, № 4. – P. 599-609.
5. Jesenak M., Zelieskova M., Babusikova E. Oxidative Stress and Bronchial Asthma in Children-Causes or Consequences? // *Front Pediatr.* – 2015. – Vol. 5. – P. 162.
6. Jiang L., Diaz P.T., Best T.M., Stimpfl J.N., He F., Zuo L. Molecular characterization of redox mechanisms in allergic asthma // *Ann. Allergy Asthma Immunol.* – 2014. – Vol. 113, № 2. – P. 137-142.
7. Sena L.A., Chandel N.S. Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species // *Mol. Cell.* – 2012. – Vol. 48, № 2. – P. 158-167.
8. Valavanidis A., Vlachogianni T., Fiotakis K., Loridas S. Pulmonary Oxidative Stress, Inflammation and Cancer: Respirable Particulate Matter, Fibrous Dusts and Ozone as Major Causes of Lung Carcinogenesis through Reactive Oxygen Species Mechanisms // *Int. J. Environ. Res. Public Health.* – 2013. – Vol. 10, № 9. – P. 3886-3907.
9. Ziech D., Franco R., Pappa A., Panayiotidis M. Reactive oxygen species (ROS) – induced genetic and epigenetic alterations in human carcinogenesis // *Mutat. Res.* – 2011. – Vol. 711, № 1-2. – P. 167-173.
10. Zinellu E., Zinellu A., Fois A.G., Carru C., Pirina P. Circulating biomarkers of oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease: a systematic review // *Respir. Res.* – 2016. – Vol. 17, № 1. – P. 150.

References

1. Glanz SA. Medical and Biological Statistics. M.: Praktyka. 1998: 459 s. Russian.
2. Lapach SN, Hubenko AV, Babych PN. Statistical methods in biomedical research using Excel. K.: MORYON. 2001: 408 s. Russian.
3. Dizdaroglu M Oxidatively induced DNA damage: mechanisms, repair and disease. *Cancer Lett.* 2012; 327(1-2):26-47.
4. Fessel JP, West JD Redox biology in pulmonary arterial hypertension. *PulmCirc.* 2015;5(4):599-609.
5. Jesenak M, Zelieskova M, Babusikova E Oxidative Stress and Bronchial Asthma in Children-Causes or Consequences? *Front Pediatr.* 2017;5:162.
6. Jiang L, Diaz PT, Best TM, Stimpfl JN, He F, Zuo L. Molecular characterization of redox mechanisms in allergic asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2014;113(2):137-42.
7. Sena LA, Chandel NS Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *MolCell.* 2012;48(2):158-67.
8. Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis K, Loridas S. Pulmonary Oxidative Stress, Inflammation and Cancer: Respirable Particulate Matter, Fibrous Dusts and Ozone as Major Causes of Lung Carcinogenesis through Reactive Oxygen Species Mechanisms. *Int J Environ Res Public Health.* 2013;10(9):3886-907.
9. Ziech D, Franco R, Pappa A, Panayiotidis M Reactive oxygen species (ROS)--induced genetic and epigenetic alterations in human carcinogenesis. *Mutat Res.* 2011;711(1-2):167-73.
10. Zinellu E, Zinellu A, Fois AG, Carru C, Pirina P Circulating biomarkers of oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease: a systematic review. *Respir Res.* 2016;17(1):150.

Надійшла до редакції 28.02.18

© В.В. Кішук, Я.П. Грицун, 2018

ОСОБЕННОСТИ ИЗМЕНЕНИЙ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА В КРОВИ БОЛЬНЫХ С РАЗЛИЧНЫМИ ФОРМАМИ СКЛЕРОМЫ

Кищук В.В., Грицун Я.П. (Винница)

А н о т а ц і я

Обследовано 92 больных (33 мужчины, 59 женщин) в возрасте от 23 до 79 лет (средний возраст – $53,5 \pm 14,57$ лет), из которых у 31 больного была склерома с преимущественно инфильтративной формой, у 30 – склерома с преимущественно атрофической формой, у 31 – склерома с преимущественно рубцовой формой. Группу сравнения составили 20 практически здоровых лиц. Состояние про- и антиоксидантной системы у больных с различными формами склеромы изучалось по активности в крови ксантиноксидазы, супероксиддисмутазы и каталазы, содержанию восстановленного глутатиона, уровня протеиновых сульфгидрильных -SH и дисульфидных -S-S-групп. Активность свободнорадикального окисления липидов и протеинов оценивалась по содержанию в крови диеновых конъюгатов, малонового диальдегида и карбонильных групп белков.

Проведенные исследования показателей оксидативного стресса в крови больных с различными формами склеромы свидетельствуют о том, что склероматозное поражение верхних дыхательных путей сопровождается дисбалансом в системе про- и антиоксидантов, сопровождается активацией процессов свободнорадикального окисления липидов и протеинов и вызывает нарушение редокс-статуса протеинов.

Ключевые слова: склерома, прооксидантная система, антиоксидантная система, свободнорадикальное окисление липидов, свободнорадикальное окисление белков.

PECULIARITIES OF CHANGES IN INDICES OF OXIDATIVE STRESS IN BLOOD OF PATIENTS WITH DIFFERENT FORMS OF SCLEROMA

Kishchuk VV, Grytsun YP

Vinnitsya National Pirogov Memorial Medical University; e-mail: kvv4488@ukr.net

Abstract

Introduction: Until now there are no data in the literature concerning the role of oxidative stress in the course of chronic specific inflammation of upper airways in the presence of scleroma.

Materials and methods: 92 patients (33 males, 59 females) at the age from 23 to 79 (at an average – $53,5 \pm 14,57$ years) have been examined, 31 patients having scleroma with predominantly infiltrative form, 30 – scleroma with predominantly atrophic form, 31 – scleroma with predominantly scarred form. The comparison group included 20 virtually healthy patients. The condition of pro- and antioxidative system in patients with different forms of scleroma has been studied through the activity in blood of xanthinoxidase, superoxiddismutase and catalase, the contents of restored glutathione, the level of protein sulfhydryl -SH and disulphide -S-S- groups. The activity of free-radical oxidation of lipids and proteins has been evaluated through the contents in blood of diethenoid conjugates, malondialdehyde and carbonyl groups of proteins.

Results: Predominantly infiltrative form of scleroma is accompanied by the most expressed activation of prooxidative system (xanthinoxidase) that exceeds in 2,44 times the index of healthy persons ($p < 0,05$). It is accompanied by more essential increase of intensity of free-radical reactions of oxidation of lipids in 3,1 times and proteins up to 92,3% in comparison with controls, as well as by more expressed changes of redox-status of proteins that is possibly associated with expressed activity of inflammatory process and cytokine disbalance compared with other forms of scleroma.

However, in the presence of predominantly atrophic and scarred forms of scleroma there appears more essential decrease of activity of antioxidant chain (catalase, superoxide dismutase and restored glutathione) and less expressed changes of prooxidative system, activity of peroxidation of lipids and proteins and redox-status of proteins that is associated with reduction of inflammatory reaction and changes of proliferative potential of cells compared with infiltrative form.

Conclusions: Scleromatous injury of upper airways is accompanied by disbalance in the system of pro- and antioxidants that is accompanied by activation of processes of free-radical oxidation of lipids and proteins and causes impairment of redox-status of proteins.

Key words: scleroma, prooxidative system, antioxidative system, free-radical oxidation of lipids, free-radical oxidation of proteins.