

УДК 616-057: 616.24: 612.015

**ОЦЕНКА ВЗАИМОСВЯЗИ НЕКОТОРЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ
АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ С УРОВНЕМ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО
СТРЕССА У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНЬЮ
ЛЕГКИХ ПРОФЕССИОНАЛЬНОЙ ЭТИОЛОГИИ
В СТАБИЛЬНОЙ ФАЗЕ БОЛЕЗНИ**

**Рахманов Р.С., Страхова Л.А., Блинова Т.В., Трошин В.В., Сапожникова М.А.,
Умнягина И.А.**

*ФБУН «Нижегородский НИИ гигиены и профпатологии» Роспотребнадзора, Н. Новгород,
e-mail: recept@nniigr.ru*

Проведен анализ интегральных показателей окислительного стресса и антиоксидантной защиты (общего количества пероксидов и антиоксидантной способности сыворотки) и их отдельных компонентов (малонного диальдегида, супероксиддисмутазы, глутатионпероксидазы, каталазы и церулоплазмина) в крови больных хронической обструктивной болезнью легких профессиональной этиологии с длительным периодом заболевания в стабильной фазе болезни. Дана оценка изменений данных показателей в зависимости от степени тяжести обструктивных нарушений легочной вентиляции. Установлено, что наибольшей информативностью обладают интегральные показатели, позволяющие оценить уровни окислительного стресса и антиоксидантной защиты в зависимости от тяжести заболевания. Полученные данные могут служить основой для разработки методов индивидуального подхода к коррекции системы оксидантов-антиоксидантов при хронической обструктивной болезни легких профессиональной этиологии с учетом тяжести обструкции.

Ключевые слова: хроническая обструктивная болезнь легких, стабильная фаза, окислительный стресс, антиоксидантная способность, супероксиддисмутазы, глутатионпероксидаза, каталаза, церулоплазмин

**EVALUATION OF ASSOCIATION BETWEEN SOME ANTIOXIDANT DEFENSE
INDICES AND LEVEL OF OXIDATIVE STRESS AMONG PATIENTS WITH
OCCUPATIONAL CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE
AT A STABLE STAGE**

**Rakhmanov R.S., Strakhova L.A., Blinova T.V., Troshin V.V., Sapozhnikova M.A.,
Umnyagina I.A.**

*Nizhny Novgorod research institute for hygiene and occupational pathology, Nizhny Novgorod,
e-mail: recept@nniigr.ru*

The authors analyzed integral indices of oxidative stress and antioxidant defense (total amount of peroxides and antioxidant capability of serum) and their particular components (malon dialdehyde, superoxidesmutase, glutathioneperoxidase, catalase and ceruloplasmin) in blood of patients with prolonged occupational chronic obstructive pulmonary disease at a stable stage. Researchers evaluated the changes of above mentioned indices depending on degree of obstructive pulmonary ventilation disturbances. It was found that integral indices had the most informativity and allowed to assess levels of oxidative stress and antioxidant defense depending on severity of disease. The obtained data can serve as the basis for development of methods for individual approach to correction of oxidant-antioxidant system in patients with occupational chronic obstructive pulmonary disease taking into consideration the severity of obstruction.

Keywords: chronic obstructive pulmonary disease, stable stage, oxidative stress, antioxidant capability, superoxidesmutase, glutathioneperoxidase, catalase, ceruloplasmin

Известно, что важным патогенетическим звеном в развитии хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) являются нарушения в системе свободнорадикального окисления [5]. Легкие находятся под постоянным воздействием кислорода и его активных форм (АФК), которые в избытке обладают сильным деструктивным действием, нарушая структуру и функцию легких [6]. Эффект свободных радикалов еще более усиливается в условиях воздействия на организм работающих вредных химических и физических производственных факторов [2]. Положительный баланс в системе свободнорадикального окисления под-

держивается антиоксидантной системой и, в частности, её ферментными компонентами. Вопросам окислительного стресса (ОС) при ХОБЛ профессиональной этиологии (ПЭ), посвящены исследования многих авторов [2, 5, 6]. Однако дискуссионным остается вопрос о значимости отдельных показателей окислительного стресса и антиоксидантной защиты в оценке тяжести течения ХОБЛ ПЭ [9, 10]. Не до конца решен вопрос об информативности интегральных показателей ОС и антиоксидантной защиты организма при данном заболевании в его стабильной фазе.

В связи с вышеизложенным была проведена работа, целью которой явилась оценка

информативности интегральных показателей ОС и антиоксидантной защиты и их отдельных компонентов в крови больных ХОБЛ ПЭ, вызванной воздействием кремнеосодержащей пыли; установление связи изученных показателей с тяжестью obstructивных нарушений в легких.

Материалы и методы исследования

Объектом исследования явились больные ХОБЛ ПЭ, находившиеся на плановом лечении в стационаре ФБУН «Нижегородского НИИ гигиены и профпатологии» Роспотребнадзора (n=166). Возраст пациентов составил $60,8 \pm 6,1$ лет, длительность заболевания $15,5 \pm 5,1$ года. Все обследуемые были бывшими работниками металлургического и машиностроительного производств, имели большой стаж работы (от 15 до 40 лет), длительный контакт с кремнеземной пылью (от 7 до 15 лет). Диагноз ХОБЛ ПЭ был поставлен на основании общепринятых критериев (рекомендации GOLD, 2014) [8]. Оценка степени тяжести obstructивных нарушений лёгочной вентиляции основывалась на критериях, рекомендованных Российским респираторным обществом по использованию спирометрии [7]. Больные были разделены на три группы по степени тяжести obstructивных нарушений лёгочной вентиляции. Группу сравнения составили практически здоровые по лабораторным показателям лица в возрасте $43,8 \pm 8,5$ года, проходившие профилактические осмотры в поликлиническом отделении института (n=80). Критериями исключения из группы сравнения явились патология органов дыхания различного генеза, острые воспаления любой этиологии, а так же наличие контакта с промышленной пылью. Функция внешнего дыхания изучалась при помощи спирометра («Spirolab III S/N 3-2129»).

Оценка ОС проведена по интегральному показателю – количеству пероксидов в сыворотке крови, и малонового диальдегиду (МДА), который до сих пор широко применяется для оценки окислительного стресса [6]. Содержание МДА определяли колориметрическим методом с наборами реагентов «ТБК-АГАТ» (производство ООО «Агат-Мед», Россия) с использованием тиобарбитуровой кислоты. Для определения пероксидов были использованы наборы реагентов «PerOx (TOS/TOC) Kit» фирмы «Immundiagnostik» (Германия). Для оценки степени выраженности ОС использовались данные, ре-

комендованные производителями наборов: менее 180 мкмоль/л – низкий ОС; от 180 до 310 мкмоль/л – средний ОС; более 310 мкмоль/л – высокий ОС.

Для оценки состояния антиоксидантной системы в сыворотке крови определяли общую антиоксидантную способность сыворотки (АОС) с помощью набора реагентов «ImAnOx (TAS/TAC) Kit» фирмы «Immundiagnostik» (Германия). АОС выражалась в мкмоль разложившейся антиоксидантами перекиси на литр сыворотки и определялась по формуле с использованием стандарта. Для оценки АОС использовались данные, рекомендованные производителями наборов: менее 280 мкмоль/л – низкая АОС; от 280 до 320 мкмоль/л – средняя АОС; более 320 мкмоль/л – высокая АОС. Кроме того, была изучена активность ферментного звена антиоксидантной защиты организма: супероксиддисмутазы (СОД) эритроцитов – первой линии защиты от свободных радикалов, глутатионпероксидазы цельной крови (ГП) и каталазы сыворотки, нейтрализующих перекись водорода и липидные пероксиды. Активность СОД и ГП определяли с помощью набора реагентов «RANSOD Superoxidedismutase MANUAL RXMONZA» и «RANSEL Glutathione Peroxidase MANUAL RXMONZA» фирмы «RANDOX» (United Kingdom), активность каталазы – методом Корлюк М.А. и др. [4] в нашей модификации. Содержание в сыворотке крови церулоплазмина (ЦП), обладающего выраженной оксидантной активностью, определяли методом Ревина [1].

Статистическая обработка полученных данных проводилась с помощью пакета прикладных программ Statistica 6.0 (StatsoftInc, USA). Все численные данные представлены, как $M \pm \delta$. Достоверность различий количественных показателей между группами определялись при помощи критерия Манна-Уитни. Критический уровень значимости результатов исследования принимался при $p < 0,05$. Корреляционные отношения между признаками определялись вычислением оценок коэффициента корреляции и коэффициентов регрессии.

Результаты исследования и их обсуждение

Среди больных ХОБЛ ПЭ основную долю составляли лица с тяжелой степенью obstructивных нарушений лёгочной вентиляции, наименьшую – со среднетяжелой степенью obstructии (табл. 1).

Таблица 1

Распределение больных ХОБЛ ПЭ по степени тяжести obstructивных нарушений лёгочной вентиляции

Степень тяжести	Показатель $ОФВ_{1,}$ % _{дожн}	Частота выявления степени тяжести obstructивных нарушений, %
Легкая	> 70	31,9%
Средне тяжёлая	50 – 59	24,6%
Тяжёлая	35-49	43,5%

Примечание. $ОФВ_{1,}$ – объём форсированного выдоха за 1-ю секунду.

Выявленная нами повышенная концентрация МДА свидетельствовала об избыточном образовании продуктов перекисного окисления липидов у больных ХОБЛ ПЭ. Так, у 80,5% из них концентрация МДА в сыворотке крови превышала норму в 2-3 раза и составляла $2,96 \pm 0,85$ мкмоль/л при $1,4 \pm 0,12$ мкмоль/л у лиц группы сравнения ($p=0,000$). У 13,3% концентрация МДА достигала 4,5–6,1 мкмоль/л. Достоверной зависимости концентрации МДА от степени выраженности обструктивных нарушений не было обнаружено, т.е. данный показатель не позволял охарактеризовать уровень ОС.

Активность каталазы в среднем на 11,5%, и содержание церулоплазмينا – на 19,0% превышали уровень у лиц группы сравнения ($43,5 \pm 14,2$ против $38,5 \pm 7,8$ мкмоль/л, $p=0,031$ для каталазы и $341,0 \pm 60,2$ мг/л против $276 \pm 20,2$ мг/л, $p=0,001$ для церулоплазмينا). Вместе с тем, не было выявлено связи данных показателей с выраженностью обструктивных нарушений и МДА.

Анализ активности СОД и ГП у больных ХОБЛ ПЭ показал, что активность СОД и ГП была снижена соответственно у 40,3% и 13,2% больных. У 49% активность СОД и 90% активность ГП находилась в пределах референтных значений. У остальных активность ферментов была незначительно повышена (табл. 2).

Средние величины активности СОД у больных ХОБЛ ПЭ колебались в пределах физиологической нормы (от 164,0 до 240,0 Е/мл). При рассмотрении величин СОД при различной степени обструкции было отмечено, что в группах больных со среднетяжелой и тяжелой степенью обструкции величина активности СОД была достоверно снижена относительно ее величины в группе сравнения ($p=0,025$; $p=0,000$). Однако зависимости активности фермента от тяжести обструктивных нарушений не было обнаружено. Выявлены различия в частоте изменений активности СОД: с усилением обструктивного процесса увеличивалась частота обнаружения низкой активности фермента. Почти у половины больных со среднетяжелой и тяжелой степенью обструкции активность СОД была снижена до $110,7 \pm 11,4$ Е/мл ($p=0,000$), у 20% больных активность фермента была повышена до $292,3 \pm 15,3$ Е/мл ($p=0,000$). У остальной части (35,8% и 45,8%) активность СОД определялась в нормальных пределах.

Изменения активности ГП колебались в пределах референтных значений (от 4171 до 10880 Е/л). Во всех группах больных ГП была достоверно снижена относительно величины у лиц группы сравнения ($p=0,002$ при легкой степени обструкции; $p=0,000$ при среднетяжелой и тяжелой степени обструктивных нарушений). У отдель-

Таблица 2

Величина активности СОД и ГП и частота ее изменения у больных ХОБЛ ПЭ в стабильной фазе болезни в зависимости от степени обструктивных нарушений легочной вентиляции.

Степень тяжести обструкции	СОД				ГП			
	Величина активности, Е/мл	Частота изменения активности, %			Величина активности, Е/л	Частота изменения активности, %		
		Норма	Ниже нормы	Выше нормы		Норма	Ниже нормы	Выше нормы
Легкая (n=16)	$178,2 \pm 13,7$	66,3	25,0	8,7	$7977,0 \pm 476,2$	100	0	0
Средней степени (n=12)	$170,9 \pm 24,5$	35,8	42,8	21,4	$6552,0 \pm 478,1$	81,9	13,6	4,5
Тяжелая (n=22)	$168,6 \pm 13,4$	45,8	54,2	0	$6206,2 \pm 531,6$	87,5	12,5	0
Группа сравнения (n=25)	$191,0 \pm 24,3^*$	88,0%	12,0%	0	$9598 \pm 814^*$	96,0%		4,0%

* – Средние величины СОД и ГП, определённые в лаборатории ФБУН НИИ ГП Роспотребнадзора в крови условно здоровых лиц.

ных пациентов активность ГП снижалась до 2583,0 – 1886,0 Е/л. Выявлялась тенденция к снижению средней величины ГП с увеличением степени обструкции.

Таким образом, разнонаправленные изменения активности антиоксидантных ферментов, хотя и свидетельствовали о дисбалансе в системе антиоксидантной защиты, однако они не позволяли судить о ее уровне.

Более информативным оказалось определение интегральных показателей ОС и антиоксидантной защиты – общего количества пероксидов и общей АОС сыворотки, которые позволили провести градацию уровней ОС и АОС. Полученные результаты показали, что общее количество пероксидов в сыворотке больных ХОБЛ ПЭ составляло 650,7±369,3 мкмоль/л, что значительно превышало их содержание у лиц группы сравнения – 380,5±233,2 мкмоль/л ($p=0,000$). У 16,6% больных количество пероксидов превышало 1000,0 мкмоль/л, достигая у отдельных пациентов 1605,0 мкмоль/л. У большей части больных ХОБЛ ПЭ (69,8%) наблюдался высокий уровень ОС: величина пероксидов достигала 783,1±257,0 мкмоль/л. В группе сравнения высокий уровень ОС выявлялся у меньшего числа лиц (46,5%), а величина пероксидов было достоверно ниже – 591,7±254,2 мкмоль/л ($p=0,000$). Низкий уровень ОС у больных ХОБЛ ПЭ наблюдался у незначительного числа лиц (9,6%).

В группе сравнения он выявлялся на 15,2% чаще. Количество пероксидов в обеих группах соответствовало низкому уровню ОС и составляло 101,9±40,3 мкмоль/л у больных и 134,0±54,7 мкмоль/л в группе сравнения. Различий в частоте выявления среднего уровня ОС и величиной пероксидов в обеих группах не было выявлено.

Для больных ХОБЛ ПЭ характерным был низкий уровень АОС: у 75,7% против 35,7% в группе сравнения; а количество разложившихся пероксидов было меньшим, чем у условно здоровых лиц (206,5±31,5 против 250,5±20,5 мкмоль/л, $p=0,000$). Средний и высокий уровень АОС у больных встречался значительно реже: у 24,3% обследуемых против 64,3% в группе сравнения. Различий в количестве разложившихся пероксидов при высоком и среднем уровне АОС в обеих группах не было выявлено. Обратная коррелятивная связь была выявлена между величинами, характеризующими ОС и АОС: $r=-0,4$; $p=0,04$.

Отмечалась тенденция к увеличению частоты выявления высокого уровня ОС и уменьшения выявления его среднего уровня с увеличением степени тяжести обструктивных нарушений. На этом фоне величина пероксидов в сыворотке, свидетельствующая о высоком уровне ОС, с увеличением степени обструкции увеличивалась ($p=0,001$, $p=0,000$), а при среднем и низком уровнях ОС достоверно не отличалась (табл. 3).

Таблица 3

Показатели ОС и общей АОС у больных ХОБЛ ПЭ в стабильной фазе болезни в зависимости от тяжести обструктивных нарушений легочной вентиляции

Уровень ОС	Степень тяжести обструктивных нарушений						
	Легкая		Средней тяжести		Тяжелая		
	Окислительный стресс						
	Частота выявления, %	Величина показателя, мкмоль/л	Частота выявления, %	Величина показателя, мкмоль/л	Частота выявления, %	Величина показателя, мкмоль/л	
Высокий	63,3	702,8±70,6	67,9	754,0±78,4	69,2	894,1±148,7	
Средний	30,0	232,4±15,8	26,8	256,8±10,1	23,1	227,2±25,2	
Низкий	6,7	70,5±19,7	5,3	119,5±12,2	7,7	79,5±15,2	
Уровень АОС	Антиокислительная способность						
	Частота выявления, %	Величина показателя, мкмоль/л	Частота выявления, %	Величина показателя, мкмоль/л	Частота выявления, %	Величина показателя, мкмоль/л	
	Высокая	15,8	353,9±9,4	10,7	354,5±11,6	5,5	367,2±9,68
	Средняя	10,3	310,0±4,6	12,8	308,6±6,21	20,3	307,0±3,4
Низкая	73,9	262,4±11,8	76,5	250,9±11,1	74,2	204,7±15,1	

С усилением процесса обструкции наблюдалось уменьшение доли высокой АОС (от 15,8% до 5,5%) и увеличение доли АОС средней степени (от 10,3% до 20,3%). Частота выявления низкой АОС с ухудшением патологического процесса не изменялась, однако количество разложившихся пероксидов в группе больных с низкой АОС при тяжелой форме обструкции было достоверно ниже, чем при легкой и среднетяжелой $262,4 \pm 11,8$ мкмоль/л и $250,9 \pm 11,1$ мкмоль/л против $204,7 \pm 25,1$ мкмоль/л ($p=0,000$).

Заключение

Таким образом, почти у всех больных ХОБЛ ПЭ с длительным периодом заболевания в стабильной фазе болезни установлен высокий уровень ОС, обусловленный избыточным образованием свободных радикалов и продуктов перекисного окисления липидов. Установлена зависимость количества пероксидов в сыворотке от степени обструктивных нарушений. С увеличением тяжести обструкции количество пероксидов в сыворотке увеличивалось.

Высокий ОС у больных ХОБЛ ПЭ сопровождается уменьшением общей АОС сыворотки и разнонаправленными изменениями активности антиоксидантных ферментов, выражающимися в снижении их активности, сохранении ее в нормальных пределах или незначительном повышении. Выявленные изменения СОД, ГП, каталазы и церулоплазмينا свидетельствуют об отсутствии активации ферментного звена антиоксидантной защиты в данной фазе болезни, а незначительного увеличения ее отдельных компонентов, по-видимому, недостаточно для нейтрализации избыточного количества свободных радикалов. Данный феномен был отмечен рядом авторов, которые наблюдали резкое падение активности антиоксидантных систем при выраженном окислительном стрессе у пациентов с III стадией ХОБЛ [5]. Кроме того, многочисленными исследованиями установлено, что избыток перекиси водорода является ингибирующим фактором активности таких антиоксидантных ферментов как каталаза, СОД и ГП [3]. Поскольку достоверной зависимости активности ферментов от тяжести обструкции не было выявлено, изученные нами показатели активности СОД, ГП, каталазы и церулоплазмينا не могут быть, на наш взгляд, использованы для оценки степени обструктивных нарушений. Однако эти показатели могут использоваться для характеристики состояния системы антиоксидантной защиты и разработке методов ее коррекции.

Проведенные нами исследования показали значимость интегральных показателей ОС и антиоксидантной защиты. Между ин-

тегральными показателями ОС и АОС сыворотки выявлена обратная коррелятивная зависимость и наблюдается связь их изменений со степенью выраженности обструктивных нарушений. Представляется важным не только констатировать наличие окислительного стресса и антиоксидантной защиты, но и определить уровень этих нарушений. Используемая нами оценка окислительного стресса и АОС по соответствующим уровням (высокого, среднего и низкого) вполне адекватно отражает состояние данных систем у лиц при ХОБЛ ПЭ. Тем самым определение уровней интегральных показателей ОС и антиоксидантной защиты помогает дать возможность клиницистам более детально оценить риск ухудшения состояния больных ХОБЛ ПЭ, тяжесть течения данного заболевания, его прогноз и эффективность лечения.

Данные показатели могут служить основой для разработки препаратов, направленных на снижение уровня окислительного стресса и повышение антиоксидантной защиты при профессиональной бронхо-легочной патологии.

Список литературы

1. Асатнани В.С. Новые методы биохимической фотометрии. М.: Наука, 1965 г.
2. Бадамшина Г.Г., Тимашева Г.В., Гимранова Г.Г., Каримова Л.К. Состояние системы «Перикисное окисление липидов – антиоксидантная защита» у работающих в условиях химического комплекса // Гигиена труда – 2015. – № 1. – С.24 – 25.
3. Казимирко В.К., Мальцев В.И., Бутылин В.Ю., Горобец Н.И. Свободнорадикальное окисление и антиоксидантная терапия. К.: Морион, 2004. 6– 160 с.
4. Королук М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г. Метод определения активности каталазы / М.А. Королук, Л.И. Иванова, И.Г. Майорова // Лабораторное дело. – 1988. – № 1 – С.16-19.
5. Мишина Н.А., Давыдкин И.Л., Купаев В.И. Оксидантно-антиоксидантный статус эритроцитов при хронической обструктивной болезни лёгких / Н.А. Мишина, И.Л. Давыдкин, В.И. Купаев // Вестник РУДН, серия Медицина. – 2010. – № 4354 – С.355.
6. Соодаева С.К. Оксидантные и антиоксидантные системы легких при хронических обструктивных заболеваниях. Хронические обструктивные болезни легких. / Под редакцией А.Г. Чучалина // М.: ЗАО «Издательство БИНОМ». – 2000. – С 92-111.
7. Чучалин А.Г., Авдеев С.Н., Айсанов З.Р. и др. Российское респираторное общество. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению хронической обструктивной болезни легких // Пульмонология. – 2014. – №3 – С. 15-36.
8. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD). Global Strategy for Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease (Updated 2014). Available at: http://www.goldcopd.org/uploads/users/files/GOLD_Report_2014_Jun_11.pdf. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease, Inc; 2014. (дата обращения 15.06.2015).
9. Cherubini, Antonio; Ruggiero, Carmelinda; Polidori, M. Cristina; Mecocci, Patrizia. Potential markers of oxidative stress in stroke. // Free Radical Biology and Medicine – vol. 39 issue 7 October 1, 2005. – p. 841-852.
10. Houben, Joyce M.J.; Moonen, Harald J.J.; van Schooten, Frederik J.; Hageman, Geja J. Telomere length assessment: Biomarker of chronic oxidativestress? // Free Radical Biology and Medicine – vol. 44 issue 3 February 1, 2008. – p. 235-246.