

На правах рукописи

Петина Галина Викторовна

**ВЛИЯНИЕ ТИОЛДИСУЛЬФИДНОЙ СИСТЕМЫ, ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ
МОДИФИКАЦИИ БЕЛКОВ НА ФУНКЦИИ НЕЙТРОФИЛОВ ПРИ
ОКИСЛИТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ**

14.00.16 – патологическая физиология
03.00.04 – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Томск-2009

Работа выполнена в Государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию»

Научные руководители:

доктор медицинских наук,
профессор

Степовая Елена Алексеевна

кандидат медицинских наук

Жаворонок Татьяна Васильевна

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук,
профессор

Хлусов Игорь Альбертович

доктор медицинских наук,
профессор

Поляков Лев Михайлович

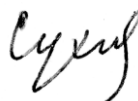
Ведущая организация: ГОУ ВПО «Кемеровская государственная медицинская академия Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию»

Защита состоится «__» _____ 2009 г. в __ часов на заседании диссертационного совета Д 208.096.01 при ГОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет Росздрава» (634050, г. Томск, ул. Московский тракт, 2)

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке ГОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет Росздрава»

Автореферат разослан «__» _____ 2009 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



Г.А. Суханова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Острое воспаление остается актуальной медицинской проблемой в силу широкой распространенности и стабильно высокой летальности заболеваний, сопровождающихся развитием воспалительного процесса [Маянский Д. Н., 1997; Логвиненко Н. И., 2003; Чучалин А. Г., 2006]. Молекулярные механизмы воспаления включают увеличение продукции нейтрофилами активных форм кислорода (АФК), которые в условиях дисбаланса системы антиоксидантной защиты обуславливают развитие окислительного стресса с проявлениями его на молекулярном, клеточном и организменном уровнях [Кулинский В. И., 1999; Дубинина Е. Е., 2006; Чеснокова Н. П., 2007; Меньщикова Е. Б. и соавт., 2008]. В частности, окислительный стресс является механизмом повреждения клеток при воспалительных заболеваниях в легких, где метаболическая активность нейтрофильных лейкоцитов не лимитируется содержанием кислорода [Wenger R. H., 2000; Peers C., Kemp P. J., 2001].

Активные формы кислорода при окислительном стрессе вызывают активацию процессов перекисного окисления липидов, повреждение нуклеиновых кислот, окислительную модификацию белков [Владимиров Ю. А., 2000; Stadtman E. R., Levine R. L., 2000; Дубинина Е. Е., 2006] не только в клетках-мишенях, но и в самих нейтрофилах. Окислительная модификация вызывает изменения структурной организации белков, их агрегацию и денатурацию, приводя к нарушению или исчезновению функциональной активности протеинов (каталитической, регуляторной, транспортной, рецепторной и др.), и может индуцировать гибель клетки [Droge W., 2002; Дубинина Е. Е., 2006; Луцак В. И., 2007].

Существенный вклад в поддержание баланса между прооксидантными эффектами и антиоксидантным потенциалом клетки вносит тиолдисульфидная система [Stadtman E. R., Levine R. L., 2000; Chapple I. L., 2002]. Восстановленный глутатион, выступая акцептором гидроксильного радикала и синглетного кислорода, существенно снижает деструктивное и цитотоксическое действие АФК [Zhu Y. et al., 2007]. Одновременно глутатион участвует в работе глутатионзависимых ферментов, которым принадлежит ведущая роль не только в обеспечении антиоксидантных процессов, но и в регуляции структуры и функций биологических мембран, в механизмах детоксикации [Шепелев А. П. и соавт., 2000; Меньщикова Е. Б. и соавт., 2006]. В последние годы многочисленные исследования связаны с выяснением роли глутатиона в экспрессии генов, внутриклеточной сигнализации, регуляции активности ферментов, апоптоза и других процессов [Cumming R. C. et al., 2004; Forman H. J., 2004; Day R. M., Suzuki Y. J., 2005; Aslan M., Canatan D., 2008; Circu C. L. et al., 2009]. Наряду с этим для поддержания окислительно-восстановительного баланса клетки большое значение имеют сопряженные эффекты тиоредоксина, функционирующего

как дисульфидредуктаза, и НАДФН-зависимой тиоредоксинредуктазы, осуществляющей его восстановление [Дас Д. К., Молик Н., 2004; Nakamura H., 2004].

Роль тиолдисульфидной системы и окислительной модификации белков в регуляции функций нейтрофилов, как в норме, так и при патологии, остается недостаточно изученной. Наиболее актуальным представляется выявление взаимосвязей между дисбалансом тиолдисульфидной системы, степенью окислительной модификации белков и функциональным состоянием нейтрофилов в условиях окислительного стресса, сопровождающего развитие воспалительного процесса.

Цель исследования: установить роль тиолдисульфидной системы и окислительной модификации белков в механизмах изменений функциональных свойств нейтрофильных лейкоцитов крови при внебольничной пневмонии и экспериментальном окислительном стрессе.

Задачи исследования:

1. Изучить особенности функционального состояния нейтрофильных лейкоцитов крови (продукция гидроксильного радикала, провоспалительных цитокинов ИЛ-8 и ФНО- α , активность миелопероксидазы) у больных внебольничной пневмонией и при экспериментальном окислительном стрессе.
2. Оценить состояние тиолдисульфидной системы в нейтрофильных лейкоцитах крови у больных внебольничной пневмонией и в условиях экспериментального окислительного стресса.
3. Определить содержание продуктов окислительной модификации белков в нейтрофильных лейкоцитах и плазме крови пациентов с внебольничной пневмонией и при экспериментальном окислительном стрессе.
4. Оценить функциональное состояние и окислительную модификацию белков в нейтрофилах крови у больных внебольничной пневмонией и при экспериментальном окислительном стрессе в условиях действия блокатора или протектора SH-групп, ингибитора каталазы или синтеза глутатиона.
5. Выявить общие закономерности и механизмы влияния тиолдисульфидной системы и окислительной модификации белков на функциональные свойства нейтрофильных лейкоцитов крови у больных внебольничной пневмонией и при экспериментальном окислительном стрессе.

Научная новизна. Впервые проведена комплексная оценка состояния тиолдисульфидной системы, окислительной модификации белков и функциональных свойств нейтрофильных лейкоцитов крови при остром воспалении на примере внебольничной пневмонии и экспериментальном окислительном стрессе, индуцированном 200 мкМ перекисью водорода. Установлено, что в нейтрофильных лейкоцитах крови больных внебольничной пневмонией и при окислительном стрессе *in vitro* дисбаланс тиолдисульфидной системы и окислительная модификация белков сопровождаются изменениями функционального состояния клеток

(возрастанием продукции гидроксильного радикала, провоспалительных цитокинов ИЛ-8 и ФНО- α и активности миелопероксидазы).

Показано, что в условиях действия протектора SH-групп 1,4-дителиозитрита в нейтрофильных лейкоцитах крови пациентов с внебольничной пневмонией и при экспериментальном окислительном стрессе происходит снижение содержания карбонильных производных белков. При культивировании нейтрофилов крови больных внебольничной пневмонией и с индуцированным окислительным стрессом с ингибитором каталазы или синтеза глутатиона выявлено, что дефицит восстановленного глутатиона в клетках приводит к активации окислительной модификации белков, снижению активности миелопероксидазы и продукции гидроксильного радикала на фоне повышенной продукции провоспалительных цитокинов ИЛ-8 и ФНО- α .

Установлено, что молекулярные механизмы изменений функциональных свойств нейтрофильных лейкоцитов крови при внебольничной пневмонии и экспериментальном окислительном стрессе, индуцированным 200 мкМ перекисью водорода, являются однотипными и сопряжены с участием восстановленного и белково-связанного глутатиона в защите внутриклеточных белков от окислительного повреждения.

Теоретическая и практическая значимость. Полученные в результате проведенного исследования новые данные фундаментального характера позволяют расширить существующие представления о механизмах регуляции функционального состояния нейтрофильных лейкоцитов крови в условиях острого воспаления в клинике внутренних болезней и окислительного стресса *in vitro*. Выявлена роль восстановленного глутатиона в регуляции процессов окислительной модификации белков и в поддержании функционального состояния нейтрофилов крови у пациентов с внебольничной пневмонией и при окислительном стрессе *in vitro*. Установленные закономерности могут быть использованы для дальнейшего изучения редокс-чувствительных механизмов нарушений функциональных свойств нейтрофилов и послужить основой для разработки молекулярных технологий регуляции функционального состояния нейтрофильных лейкоцитов крови при развитии воспалительного процесса.

Положения, выносимые на защиту:

1. Окислительный стресс при внебольничной пневмонии сопровождается дисбалансом тиолдисульфидной системы (снижение содержания восстановленного глутатиона, тиоловых групп белков, активности глутатионпероксидазы и возрастание концентрации окисленной формы глутатиона), активацией процессов окислительной модификации белков в нейтрофильных лейкоцитах крови и изменениями функциональных свойств клеток (возрастание продукции гидроксильного радикала, ИЛ-8, ФНО- α и активности миелопероксидазы).
2. Активация окислительного повреждения белков в нейтрофилах крови у больных внебольничной пневмонией и при экспериментальном

окислительном стрессе в условиях действия ингибитора синтеза глутатиона бутионин-сульфоксимины или ингибитора каталазы 3-амино-1,2,4-триазола сопряжена с дефицитом восстановленного глутатиона и нарушением образования белково-связанного глутатиона.

3. Механизмы изменений функциональных свойств нейтрофильных лейкоцитов крови (продукции гидроксильного радикала, ИЛ-8, ФНО- α и активности миелопероксидазы) у пациентов с внебольничной пневмонией и при экспериментальном окислительном стрессе, индуцированным 200 мкМ перекисью водорода, являются однотипными и опосредованы снижением восстановительного потенциала тиолдисульфидной системы и активацией процессов окислительной модификации белков.

Апробация работы. Результаты исследований докладывались и обсуждались на XX Съезде Физиологического общества им. И. П. Павлова (Москва, 2007), Всероссийской научно-практической конференции «Актуальные вопросы современной биохимии» (Киров, 2007), Конгрессе молодых ученых и специалистов «Науки о человеке» (Томск, 2007), III общероссийской научной конференции с международным участием «Перспективы развития вузовской науки» (Дагомыс-Сочи, 2007), 18 Конгрессе Европейского респираторного общества (Берлин, 2008).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 13 работ, из них 3 – в центральных рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 177 страницах машинописного текста и состоит из введения, 4 глав (обзор литературы, материал и методы исследования, результаты собственных исследований, обсуждение результатов исследования), выводов и списка литературы, включающего 310 источников, из них – 95 отечественных и 215 иностранных. Работа иллюстрирована 20 таблицами и 5 рисунками.

ХАРАКТЕРИСТИКА КЛИНИЧЕСКОГО И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО МАТЕРИАЛА, МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе представлены результаты обследования 48 пациентов с внебольничной пневмонией (ВП) средней степени тяжести (23 мужчины и 25 женщин в возрасте от 18 до 50 лет, средний возраст – 36 ± 4 лет). Из них 30 больных с преимущественно альвеолярным типом лёгочного инфильтрата (17 мужчин и 13 женщин) и 18 пациентов с преимущественно интерстициальным типом лёгочного инфильтрата (6 мужчин и 12 женщин).

Все пациенты поступали в стационар в порядке скорой медицинской помощи, обследование проводилось до назначения терапии. Для верификации диагноза использовались данные анамнеза, физикального, рентгенологического, бактериологического исследований. Дополнительно проводилась компьютерная томография высокого разрешения с шагом 2 мм с целью верификации типа инфильтрата легочной паренхимы при ВП.

Набор клинического материала проводился на базе и при участии сотрудников кафедры терапии и усовершенствования врачей (зав. кафедрой –

канд. мед. наук, доцент Т. С. Агеева) ФГОУ ВПО «Томский военно-медицинский институт» МО РФ (начальник – С. В. Полковов); терапевтического отделения (зав. отделением – канд. мед. наук А. В. Дубоделова) ММЛПУ «Городская больница № 1» (главный врач – С. М. Кирютенко) (г. Томск).

В исследование были включены 27 здоровых доноров в возрасте от 18 до 50 лет (10 мужчин и 17 женщин, средний возраст 33 ± 6 лет).

Критериями исключения для здоровых доноров и больных ВП являлись возраст моложе 18 и старше 50 лет; период обострения хронических инфекционных заболеваний; наличие в анамнезе аутоиммунных заболеваний, злокачественных новообразований, психических расстройств, алкогольной и наркотической зависимости, отсутствие информированного согласия.

Материалом для исследования служила венозная кровь обследованных лиц, взятая утром натощак из локтевой вены с помощью стандартных вакуумных систем "BD VACUTAINER™" («Greiner-bio-one», Австрия) с антикоагулянтом гепарином (25 Ед/мл).

На первом этапе исследования оценивали параметры, характеризующие функциональные свойства, состояние тиолдисульфидной системы (ТДС) и окислительной модификации белков (ОМБ) в нейтрофилах крови при остром воспалении в клинике внутренних болезней на примере внебольничной пневмонии. В плазме крови обследованных пациентов проводили оценку ряда параметров перекисного окисления липидов (ПОЛ), системы антиоксидантной защиты и ОМБ (клинический блок).

На следующем этапе работы проводили исследования *in vitro* на нейтрофильных лейкоцитах крови здоровых доноров и пациентов с ВП (экспериментальный блок). Для определения роли глутатиона в защите внутриклеточных белков от окислительного повреждения и участия компонентов тиолдисульфидной системы и окислительной модификации белков в поддержании функционального состояния нейтрофильных лейкоцитов при окислительном стрессе (ОС) были использованы блокатор SH-групп N-этилmaleимид, ингибитор синтеза глутатиона бутионин-сульфоксимин, протектор SH-групп 1,4-дитиоэритритол и ингибитор каталазы 3-амино-1,2,4-триазол (NEM, BSO, DTE и AT («Sigma», США), соответственно) (табл. 1). Выделенные из венозной крови нейтрофилы здоровых доноров культивировали с NEM или DTE, а также BSO или AT в полной питательной среде в присутствии 200 мкМ H_2O_2 в течение 18 ч при температуре 37°С и 5 % CO_2 . Клетки, полученные у пациентов с ВП, культивировали в аналогичных условиях, но без добавления H_2O_2 .

Содержание интерлейкина-8 (ИЛ-8) и фактора некроза опухоли альфа (ФНО- α) в супернатантах культур нейтрофильных лейкоцитов определяли с использованием твердофазного иммуноферментного анализа в соответствии с инструкцией к набору («Вектор-Бест», Россия). Активность миелопероксидазы (МПО) в нейтрофилах оценивали по способности фермента катализировать окисление ортофенилендиамина перекисью водорода [Арутюнян А. В. и соавт., 2000], уровень продукции

гидроксильного радикала – методом, основанным на разрушении модельного субстрата 2-дезоксид-рибозы гидроксильным радикалом, образуемым опсонизированными нейтрофилами [Thom S.R., Elbaken M.E., 1991].

Содержание восстановленного (GSH) и окисленного глутатиона (GSSG) определяли кинетическим методом, предложенным М. Е. Anderson, (1985) в модификации S. Kojima et al. (2004), в основе которого лежит взаимодействие GSH с 5,5'-дитио-бис(2-нитробензойной) кислотой. Концентрацию SH-групп белков (белок-SH) в нейтрофилах определяли спектрофотометрически по способности тиоловых соединений при взаимодействии с 5,5'-дитио-бис(2-нитробензойной) кислотой образовывать окрашенное соединение [Burchill B. R. et al., 1978]. Определение содержания белково-связанного глутатиона (белок-SSG) в нейтрофилах проводили методом, основанным на способности боргидрата высвобождать из связи с белками глутатион, содержание которого затем измеряли спектрофотометрически [Burchill B. R. et al., 1978]. Активность глутатионпероксидазы определяли методом, основанным на реакции взаимодействия глутатиона с гидроперекисью трет-бутила [Карпищенко А. И., 1999], активность тиоредоксинредуктазы – методом, основанным на НАДФН-зависимом восстановлении 5,5'-дитио-бис(2-нитробензойной) кислоты с образованием окрашенного соединения [Tamura T., Stadtman E. R., 1996].

Определение содержания карбонильных производных белков (КПБ) в нейтрофилах проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием набора для определения окислительной модификации белков «Protein Carbonyl ELISA Kit» («Alexis Corporation», Швейцария). Содержание общего белка в нейтрофилах определяли методом, основанным на взаимодействии красителя Кумасси голубого G-250 с остатками аргинина и лизина белковых молекул [Бредфорд М. М., 1976].

Оценку содержания КПБ в плазме крови проводили спектрофотометрическим методом, основанным на реакции взаимодействия окисленных аминокислотных остатков с 2,4-динитрофенилгидразином [Арутюнян А. В. и соавт., 2000]. Содержание битирозина и окисленного триптофана в плазме крови оценивали флуориметрически методом, описанным К. J. Davies (1987) в модификации Э. М. Бекмана и соавт. (2006). В плазме крови определяли содержание ТБК-активных продуктов (ТБК-АП), образующих с тиобарбитуровой кислотой окрашенный триметиновый комплекс [Владимиров Ю. А., Арчаков А. И., 1972], церулоплазмина – методом, основанным на окислении им диаминов с последующей реакцией с парафенилендиамином [Камышников В.С., 2000], активность каталазы с помощью метода, основанного на способности перекиси водорода к образованию окрашенного комплекса с солями молибдата аммония [Королюк М. А и соавт., 1988]. Концентрацию общего белка в плазме крови определяли биуретовым методом [Камышников В. С., 2000].

Таблица 1

Распределение обследованных лиц (пациентов с внебольничной пневмонией и здоровых доноров) в соответствии с использованными методами исследования

Методы исследования	Группы обследованных										
	Пациенты с внебольничной пневмонией					Здоровые доноры					
	Интактные нейтрофилы/плазма крови	Нейтрофилы, инкубированные с NEM	Нейтрофилы, инкубированные с DTE	Нейтрофилы, инкубированные с AT	Нейтрофилы, инкубированные с BSO	Интактные нейтрофилы/плазма крови	Нейтрофилы, инкубированные с 200 мкМ H ₂ O ₂	Нейтрофилы, инкубированные с 200 мкМ H ₂ O ₂ и NEM	Нейтрофилы, инкубированные с 200 мкМ H ₂ O ₂ и DTE	Нейтрофилы, инкубированные с 200 мкМ H ₂ O ₂ и AT	Нейтрофилы, инкубированные с 200 мкМ H ₂ O ₂ и BSO
Определение содержания ИЛ-8 и ФНО- α в супернатантах культур нейтрофилов крови	16	8	8	7	7	8	8	4	4	4	4
Определение продукции гидроксильного радикала и активности МПО в нейтрофилах крови	39	11	11	8	7	22	13	8	8	5	5
Определение активности глутатионпероксидазы и тиоредоксинредуктазы в нейтрофилах крови	23	11	11	8	8	18	13	8	8	5	5
Определение содержания GSH и GSSG в нейтрофилах	23	11	8	8	8	12	10	5	5	5	5
Определение концентрации SH-групп белков и белково-связанного глутатиона в нейтрофилах крови	23	11	8	8	8	12	10	5	5	5	5
Оценка содержания КПБ в нейтрофилах крови	16	5	5	5	5	14	12	6	6	6	6
Определение уровня КПБ плазмы крови	28	Не определяли				15	Не определяли				
Определение содержания битирозина и окисленного триптофана в плазме крови	14	Не определяли				6	Не определяли				
Определение содержания ТБК-активных продуктов в плазме крови	48	Не определяли				27	Не определяли				
Определение содержания ЦП в плазме крови	35	Не определяли				27	Не определяли				
Определение активности каталазы в плазме крови	48	Не определяли				25	Не определяли				

При оценке полученных данных использовали методы статистического описания и проверки статистических гипотез [Лакин Г.Ф., 1980]. Для описания полученных количественных данных каждой выборки использовали параметры распределения. Для каждой выборки вычисляли средневывборочные характеристики: среднее арифметическое, среднее квадратичное отклонение и ошибка среднего или медиана, первый и третий квартили. Для проверки нормальности распределения показателей каждого параметра использовали тест Шапиро-Уилка. Так как распределение данных не подчинялось нормальному закону, для оценки достоверности различий независимых выборок использовали ранговый критерий Манна-Уитни. Для оценки различий между зависимыми выборками применяли непараметрический критерий Вилкоксона. Для выявления взаимосвязей между показателями, оценки их силы и направления применяли непараметрический корреляционный анализ Спирмена. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Патогенез острых воспалительных заболеваний, в том числе пневмонии, в той или иной степени связан с развитием ОС. В легких увеличение продукции АФК нейтрофилами может индуцировать апоптоз пневмоцитов, усиливая при этом пролиферацию фибробластов, что является одной из причин фиброза легких [Wenger R. H., 2000; Peers C., Kemp P. J., 2001]. При этом сами эффекторные клетки воспаления могут подвергаться повреждающему действию активных форм кислорода. Важную роль в защите клеток от окислительного стресса играет тиолдисульфидная система.

Нами было предпринято комплексное исследование, направленное на изучение роли тиолдисульфидной системы в регуляции процессов окислительной модификации белков и поддержании функционального состояния нейтрофильных лейкоцитов крови при внебольничной пневмонии и экспериментальном окислительном стрессе, индуцированным 200 мкМ перекисью водорода.

На первом этапе исследования мы оценивали параметры, характеризующие функциональные свойства, состояние тиолдисульфидной системы, окислительную модификацию белков в нейтрофилах при остром воспалении в клинике внутренних болезней на примере ВП. В плазме крови обследованных пациентов с ВП проводили оценку ряда параметров ПОЛ, системы АОЗ и окислительной модификации белков (клинический блок).

Уровень продукции HO^\bullet нейтрофильными лейкоцитами крови в подгруппах больных с преимущественно альвеолярным и интерстициальным типами инфильтрации легочной паренхимы был сопоставим ($p > 0,05$) и достоверно превышал соответствующие значения в культуре нейтрофилов здоровых доноров, составляющие 25,32 (19,87-27,60) нМ/мг белка ($p < 0,05$).

Исследование активности миелопероксидазы в нейтрофилах, выделенных из крови пациентов с ВП, свидетельствовало о достоверном ($p < 0,05$) увеличении изучаемого показателя относительно значений контроля,

составляющих 715,80 (669,80-741,10) у.е./мг белка, до величины 869,20 (793,20-954,10) у.е./мг белка у больных с преимущественно альвеолярным типом инфильтрации легкого и до величины 770,70 (745,0-884,0) у.е./мг белка у больных с интерстициальным типом поражения ткани легкого. Значимых различий по этому показателю между подгруппами пациентов с ВП выявлено не было ($p>0,05$).

В супернатантах культур нейтрофилов, выделенных из крови здоровых доноров, уровень продукции провоспалительных цитокинов ИЛ-8 и ФНО- α составлял 281,10 (273,70-304,10) пг/мл и 124,52 (89,0-156,0) пг/мл, соответственно. У больных ВП продукция нейтрофилами ИЛ-8 и ФНО- α статистически значимо ($p<0,05$) увеличивалась: при преимущественно альвеолярном типе инфильтрации легочной паренхимы соответственно до 330,0 (315,21-345,90) пг/мл и 171,02 (166,4-177,70) пг/мл, а в случае интерстициального варианта инфильтрации – до 320,60 (310,60-328,90) пг/мл и 154,21 (131,60-170,90) пг/мл.

Активация нейтрофилов при остром воспалении становится потенцирующим моментом в развитии окислительного стресса на уровне целого организма, который всегда сопровождается выраженными изменениями в системе про-/антиоксиданты крови. При исследовании содержания ТБК-АП в плазме крови у больных ВП было установлено возрастание данного параметра, характеризующего интенсивность процессов ПОЛ, относительно значений показателя в группе здоровых доноров (0,19 (0,17-0,21) мкмоль/л) ($p<0,05$). Значимых различий по этому показателю между подгруппами пациентов с ВП выявлено не было ($p>0,05$). Повышенная продукция АФК нейтрофилами в очаге воспаления приводит к активации процессов липопероксидации в мембранах клеток и накоплению продуктов ПОЛ. Конечные продукты ПОЛ, в частности малоновый диальдегид, достаточно легко мигрируют через клеточные мембраны, чем обусловлено увеличение их содержания в плазме крови. Активация процессов ПОЛ приводит к дестабилизации липидного бислоя, снижению устойчивости мембран клеток к прооксидантным воздействиям, нарушению структуры мембран и функций клеток.

На фоне повышенного содержания ТБК-АП в плазме крови у пациентов с ВП отмечалось значительное увеличение концентрации белка острой фазы воспаления – церулоплазмина ($p<0,05$), обладающего выраженным антиоксидантным потенциалом, относительно значений показателя в группе здоровых лиц (62,30 (54,41-69,11) мг/л). Сравнение величин данного показателя между подгруппами пациентов с ВП достоверных различий не выявило ($p>0,05$). Церулоплазмин обладает супероксиддисмутазной и феррооксидазной активностью, а также является ингибитором образования гипохлорита. Наряду с этим он может выступать в плазме в качестве прооксиданта, индуцируя окислительную модификацию липопротеинов низкой плотности [Барабой В. А., 1992; Atanasiu R. L., 1998].

При этом в плазме крови пациентов как с преимущественно альвеолярным типом инфильтрации легочной паренхимы, так и

интерстициальным, отмечалось снижение активности каталазы ($p < 0,05$) по сравнению с соответствующим значением в группе здоровых доноров (26,17 (24,54-27,78) мкат/л). Это могло происходить в результате ингибирования активного центра и повреждения структуры фермента, чему способствуют токсические эффекты АФК и продуктов ПОЛ, повышенное содержание которых отмечалось у пациентов с ВП. Нарушение работы ферментов АОЗ в свою очередь может приводить к дополнительной генерации АФК.

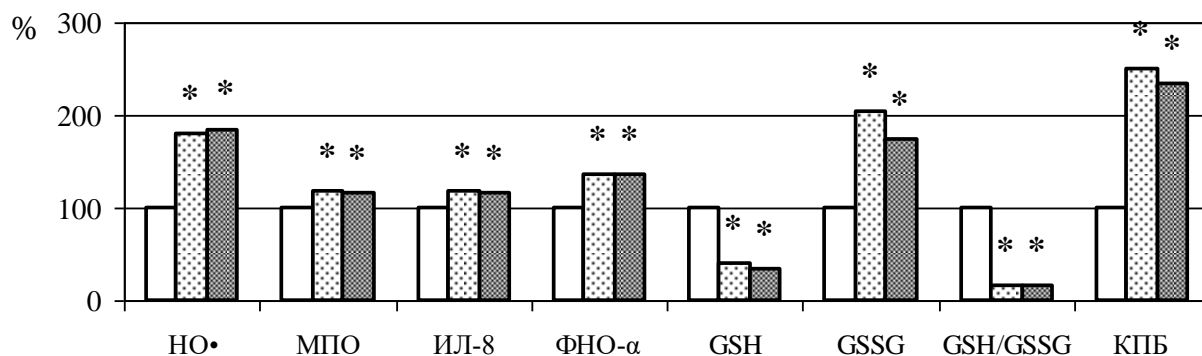
Активность процессов ПОЛ и состояние системы АОЗ в плазме крови, так же как и функциональный статус эффекторных клеток воспаления – нейтрофилов (оцениваемый по активности МПО, продукции гидроксильного радикала, ИЛ-8 и ФНО- α), по нашим данным не зависит от типа инфильтративного поражения ткани легкого у больных с ВП. Это позволило нам в дальнейших исследованиях объединить пациентов с преимущественно альвеолярным и интерстициальным типами инфильтрации легочной паренхимы в одну группу пациентов с ВП.

Следующим этапом работы явилось проведение исследования *in vitro* на нейтрофильных лейкоцитах крови здоровых доноров и пациентов с ВП. В нейтрофилах здоровых доноров окислительный стресс *in vitro* моделировали с использованием перекиси водорода, которая способна легко проникать через гидрофобные мембраны клеток благодаря свойству электростатической нейтральности [Зенков Н. К. и соавт., 2001, Меньщикова Е. Б. и соавт., 2006]. Оптимальными для моделирования ОС по данным литературы являются концентрации H_2O_2 от 100 до 500 мкМ [Pietarinen-Runtti P. et al., 2000; Коваленко Е. И. и соавт., 2007]. Более высокие концентрации (от 1 мМ) активируют запуск программированной гибели культивируемых клеток [Cumming R. C. et al., 2004]. В наших исследованиях при проведении модельных экспериментов *in vitro* для индукции ОС была использована перекись водорода в конечной концентрации 200 мкМ, индуцирующая процессы ОМБ, но не способная активировать апоптоз [Grune T. et al., 1995].

При экспериментальном ОС и при внебольничной пневмонии отмечалось равнозначное повышение активности МПО и продукции гидроксильного радикала нейтрофилами ($p > 0,05$) (рис. 1). Содержание ИЛ-8 и ФНО- α в супернатантах культур нейтрофильных лейкоцитов крови при экспериментальном ОС также статистически значимо не отличался от такового в супернатантах культур нейтрофилов у больных ВП ($p > 0,05$). В регуляции синтеза провоспалительных цитокинов участвуют транскрипционные факторы семейства NF- κ B, активация которых может быть обусловлена изменением редокс-статуса клетки, что происходит при непосредственном участии АФК [Меньщикова Е. Б. и соавт., 2006]. Экспериментально доказано, что оксиданты могут прямо или опосредованно модулировать редокс-статус цистеиновых остатков факторов транскрипции, что регулирует их способность связываться с ДНК [Pool L. B. et al., 2004].

Оценка состояния ТДС в нейтрофилах крови здоровых доноров (рис. 1) показала, что при инкубации клеток с H_2O_2 концентрация GSH в них составила 1,97 (1,45-2,40) нмоль/ мг белка. По сравнению со значениями

этого параметра в контроле (интактные нейтрофилы здоровых доноров) в условиях экспериментального ОС внутриклеточное содержание GSH снижалось в 2,7 раза ($p < 0,05$), а при ВП в 3,0 раза ($p < 0,05$). Параллельно в культуре нейтрофилов, подвергнутых влиянию перекиси водорода, определялось содержание GSSG, которое составило 0,55 (0,51-0,59) нмоль/мг белка, что превышало аналогичные величины группы контроля в 2,0 раза ($p < 0,05$). При этом у пациентов с ВП содержание GSSG в нейтрофилах превышало соответствующие контрольные величины в 1,7 раза ($p < 0,05$).



□ Интактные нейтрофилы здоровых доноров

▨ Нейтрофилы здоровых доноров, инкубированные с 200 мкМ перекисью водорода

▩ Интактные нейтрофилы пациентов с внебольничной пневмонией

* – $p < 0,05$ уровень значимости различий по сравнению со значениями в интактных нейтрофилах здоровых доноров

Рис. 1. Параметры функционального состояния, тиолдисульфидной системы и окислительной модификации белков нейтрофильных лейкоцитов крови в условиях окислительного стресса *in vitro* и при внебольничной пневмонии.

Величина соотношения GSH/GSSG в нейтрофилах при ОС *in vitro* снижалась в 6,2 раза ($p < 0,05$), а у пациентов с ВП в 6,5 раза ($p < 0,05$) по сравнению с соответствующим контрольным значением. Соотношение содержания восстановленной и окисленной форм глутатиона является одним из важнейших параметров, отражающих степень выраженности ОС [Соколовский В. В., 1988, Day R. M., 2005].

Достоверных различий по содержанию GSH, GSSG, величине GSH/GSSG в нейтрофилах при ОС *in vitro* и у больных ВП выявлено не было ($p > 0,05$).

Содержание КПБ в нейтрофильных лейкоцитах здоровых доноров, инкубированных с H_2O_2 и полученных у больных ВП, превышало значения контрольной группы в 2,5 раза и 2,3 раза, соответственно ($p < 0,05$). Достоверных различий по этому показателю при экспериментальном ОС и при ВП также выявлено не было (рис. 1).

Сравнительный анализ показателей, характеризующих функциональные свойства (продукция гидроксильного радикала и провоспалительных цитокинов, активность МПО), состояние ТДС (содержание GSH и GSSG, величина соотношения GSH/GSSG) и ОМБ (содержание карбонильных производных белков) нейтрофилов крови показал, что все величины исследуемых параметров у больных ВП, статистически значимо не различались с таковыми при экспериментальном ОС, индуцированном 200 мкМ H_2O_2 . Полученный факт свидетельствует о том, что использованная нами концентрация H_2O_2 являлась адекватной для моделирования ситуации окислительного стресса, сопоставимого с ОС, развивающимся при остром воспалении.

При добавлении блокатора SH-групп NEM или BSO, являющегося ингибитором синтеза глутатиона, в культуру нейтрофилов с индуцированным ОС и взятых у больных ВП, отмечалось снижение продукции гидроксильного радикала (рис. 2) и активности миелопероксидазы в клетках. При этом было установлено снижение концентрации GSH (рис. 4). Участие глутатиона в регуляции функций нейтрофилов может быть связано с его влиянием на активность ферментов метаболизма арахидоновой кислоты [Chang L. C., Wang J. P., 2001; Hatzelmann A. et al., 2005; Коваленко Е. И. и соавт. 2007]. Также снижение содержания восстановленного глутатиона в нейтрофильных лейкоцитах здоровых доноров с индуцированным ОС и больных ВП, культивированных с BSO или АТ сопровождалось активацией окислительной модификации белков, что могло приводить к повреждению активного центра и структурных аминокислот МПО и НАДФН-оксидазы, и потере их способности к полноценному функционированию. Косвенным подтверждением данного предположения является наличие положительной корреляционной связи между содержанием GSH и активностью МПО ($r=0,70$, $p<0,05$ – при экспериментальном ОС в присутствии NEM; $r=0,61$, $p<0,05$ – при инкубации с BSO нейтрофилов, полученных у больных ВП).

Активность МПО в нейтрофилах при культивировании клеток в присутствии АТ (ингибитора каталазы) и в условиях ОС *in vitro*, и при остром воспалении была снижена, что с одной стороны может быть результатом непосредственного повреждения молекул белка высокими концентрациями H_2O_2 , с другой стороны на проявления активности МПО способны влиять изменения величины рН, а также концентрация субстратов, связывающихся с МПО [Коваленко Е. И. и соавт., 2007].

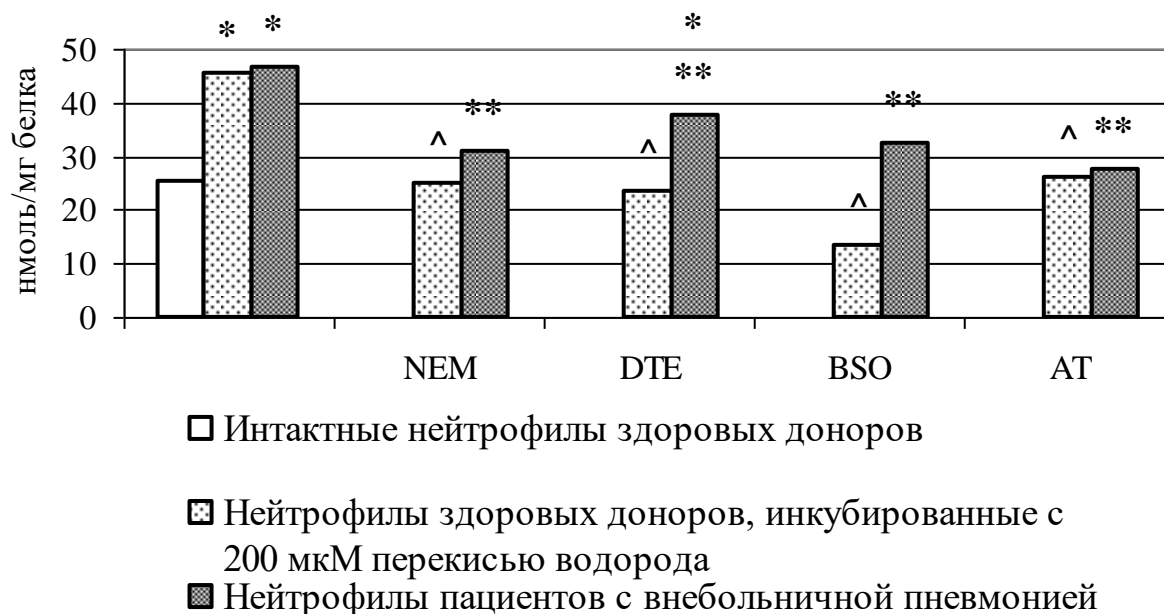
Отмеченное в нашем исследовании снижение продукции гидроксильного радикала нейтрофилами в присутствии АТ (рис. 2) можно объяснить ингибированием супероксиддисмутазной реакции, в ходе которой образуется H_2O_2 , используемая в дальнейшем в реакции Фентона для образования $HO\cdot$. Известно, что ингибирование каталазы ведет к снижению активности ферментов, чувствительных к окислению, в том числе и СОД [Байляк М. М. и соавт., 2008].

При культивировании нейтрофилов в присутствии протектора SH-групп DTE продукция гидроксильного радикала также была снижена.

Восстановленный глутатион, как и SH-содержащие белки, является ингибитором АФК и стабилизатором мембран [Udupi V., 1992]. Внутри клетки GSH эффективно связывает ионы меди, препятствуя тем самым их вовлечению в реакцию Фентона, в ходе которой образуется HO^\bullet [Zhu Y., 2007].

В целом, результативность взаимодействия нейтрофильных лейкоцитов с микроорганизмами определяется интенсивностью проявления той или иной эффекторной функции, одной из которых является продукция клетками цитокинов [Малышев И. Ю. и соавт., 2004].

Показано, что при ОС, на фоне активации ПОЛ, снижения внутриклеточного содержания GSH и возрастания уровня GSSG наблюдается фосфорилирование и деградация I κ B и активация NF- κ B. Это, в частности, может привести к увеличению скорости транскрипции генов провоспалительных цитокинов [Дубинина Е. Е., 2006; Меньщикова Е. Б. и соавт., 2006].



*- $p < 0,05$ уровень значимости различий по сравнению с нейтрофилами здоровых доноров

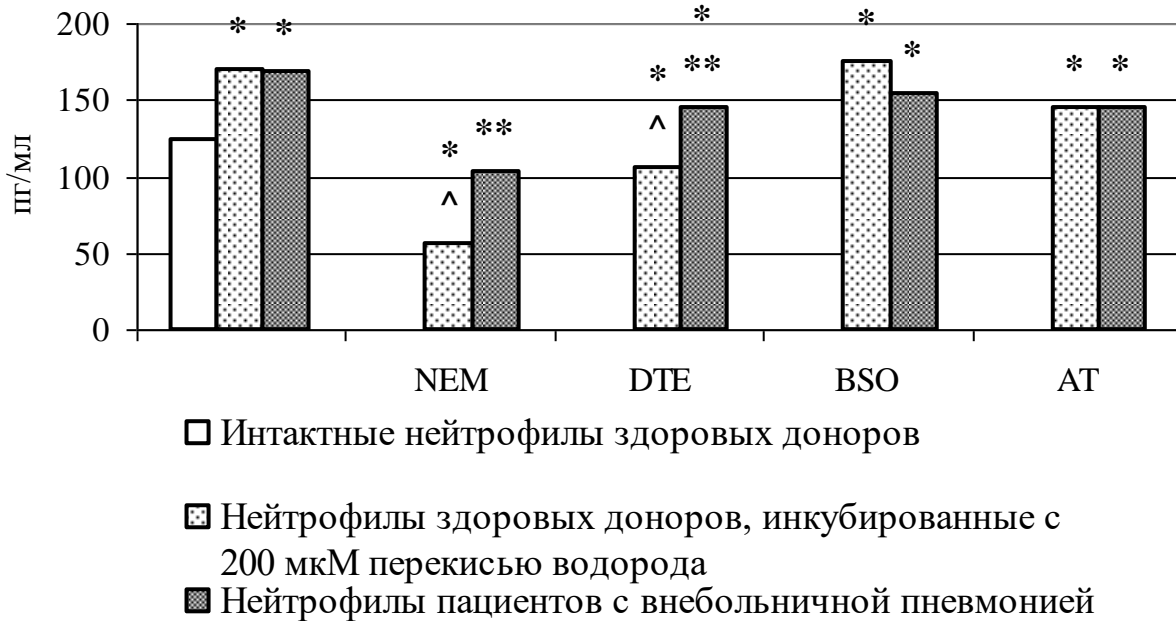
^- $p < 0,05$ уровень значимости различий по сравнению с нейтрофилами здоровых доноров, инкубированными с перекисью водорода

** - $p < 0,05$ уровень значимости различий по сравнению с интактными нейтрофилами пациентов с внебольничной пневмонией

Рис. 2. Продукция гидроксильного радикала нейтрофильными лейкоцитами крови пациентов с внебольничной пневмонией и при экспериментальном окислительном стрессе в условиях культивирования с NEM, DTE, BSO или AT.

Изменение продукции ФНО- α в условиях ОС наводит на мысль о вовлеченности редокс-сигнальных систем в регуляцию синтеза этого цитокина (рис. 3). В нашем исследовании отмечено наличие отрицательной корреляционной связи между продукцией ФНО- α и содержанием белково-

связанного глутатиона в нейтрофилах пациентов с ВП, при культивировании клеток в присутствии блокатора SH-групп ($r=-0,82$, $p<0,05$); продукцией ФНО- α и содержанием GSH в условиях экспериментального ОС ($r=-0,58$, $p<0,05$).



*- $p<0,05$ уровень значимости различий по сравнению с нейтрофилами здоровых доноров

[^]- $p<0,05$ уровень значимости различий по сравнению с нейтрофилами здоровых доноров, инкубированными с перекисью водорода

** - $p<0,05$ уровень значимости различий по сравнению с интактными нейтрофилами пациентов с внебольничной пневмонией

Рис. 3. Содержание ФНО- α в супернатантах культур нейтрофильных лейкоцитов крови пациентов с внебольничной пневмонией и при экспериментальном окислительном стрессе в условиях культивирования с NEM, DTE, BSO или AT.

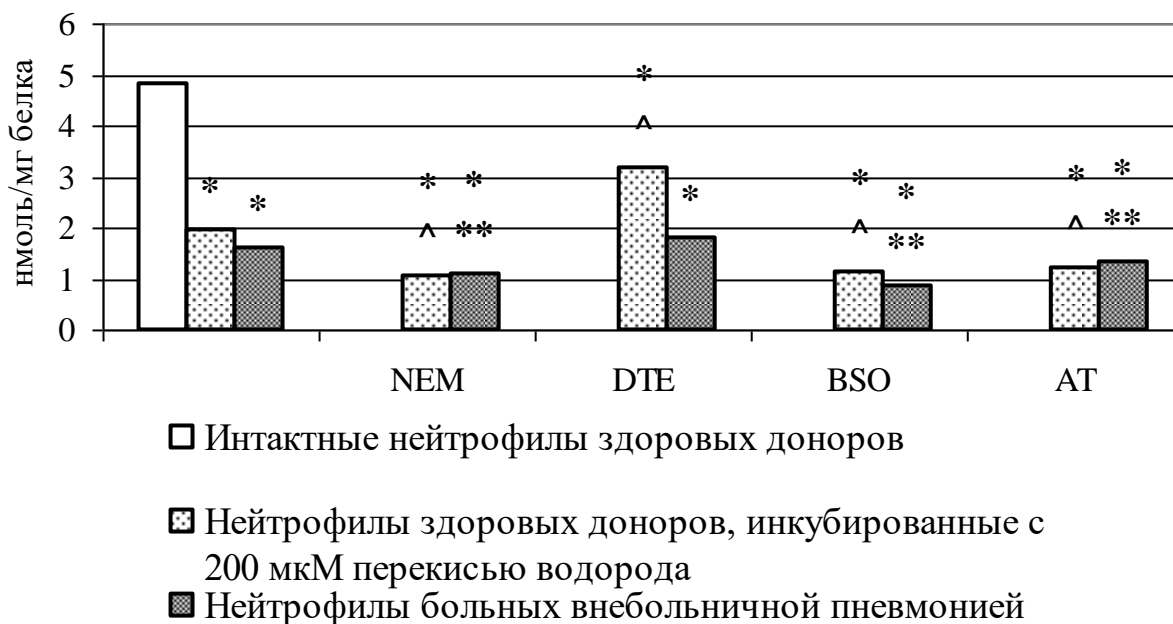
Наряду с этим в супернатантах культур нейтрофилов, инкубированных с 1,4-дителиоэритритолом, было отмечено снижение продукции клетками ФНО- α при индуцированном ОС и у пациентов с ВП. Показано, что химические соединения, обладающие антиоксидантными свойствами, в том числе DTE, предотвращают активацию NF- κ B, снижая эффективность фосфорилирования I κ B (возможно за счет ингибирования соответствующих киназ), что объясняет пониженный уровень ФНО- α [Дубинина Е. Е., 2006].

В свою очередь дефицит восстановленного глутатиона в случае применения NEM также приводил к снижению продукции провоспалительных цитокинов ИЛ-8 и ФНО- α (рис. 3). Известно, что активация факторов транскрипции и их связывание с регуляторными сайтами ДНК контролируется редокс-статусом, в особенности тиолдисульфидным балансом, показателем которого служит соотношение содержания

восстановленных и окисленных SH-групп [Меньщикова Е. Б. и соавт., 2006]. Для связывания NF-κB с ДНК необходимы восстановительные условия в ядре. В экспериментах *in vitro* было показано, что окисление цистеина в ДНК-связывающем домене NF-κB сопровождается образованием белково-связанного глутатиона и ингибированием ДНК-связывающей активности [Октябрьский О. Н., Смирнова Г. В., 2007], что могло происходить в случае применения NEM.

Токсическое действие АФК предотвращается в нейтрофилах за счет функционирования системы АОЗ, представленной ферментативными и неферментативными компонентами, эффекты которых тесно связаны друг с другом и четко сбалансированы между собой, способствуя поддержанию редокс-состояния клеток [Зенков Н. К. и соавт., 2001; Kiley P. J., 2004].

Зарегистрированное нами снижение внутриклеточной концентрации GSH при ОС (рис. 4) во многом обусловлено расходом глутатиона для обратимого связывания с SH-группами белков, которые в первую очередь подвергаются окислению АФК.



*- $p < 0,05$ уровень значимости различий по сравнению с нейтрофилами здоровых доноров

^- $p < 0,05$ уровень значимости различий по сравнению с нейтрофилами здоровых доноров, инкубированными с перекисью водорода

** - $p < 0,05$ уровень значимости различий по сравнению с интактными нейтрофилами пациентов с внебольничной пневмонией

Рис. 4. Содержание восстановленного глутатиона в нейтрофильных лейкоцитах крови пациентов с внебольничной пневмонией и при экспериментальном окислительном стрессе в условиях культивирования с NEM, DTE, BSO или AT.

В нашем исследовании величина соотношения GSH/GSSG была снижена, как в нейтрофилах у больных ВП, так и при экспериментальном

ОС. Это указывает на снижение буферной емкости системы глутатиона и, соответственно, ее протекторной роли в отношении обратимой модификации белковых молекул.

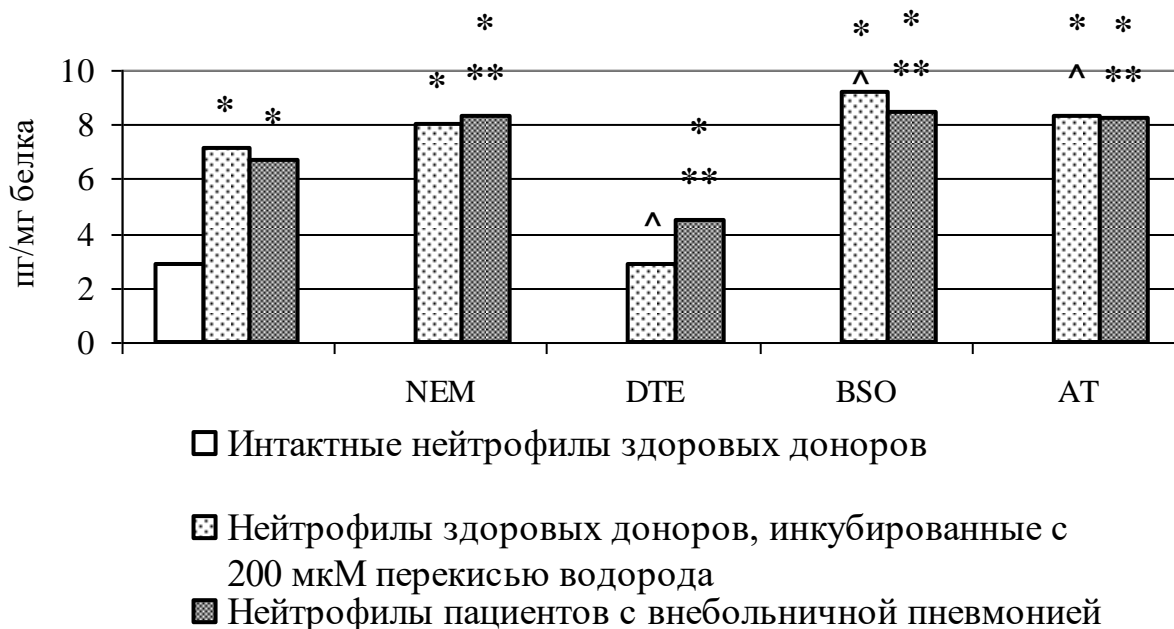
Снижение уровня GSH, составляющего около 90 % всех SH-групп клетки приводит к повышению доступности мембраны для токсического действия продуктов ПОЛ [Day R. M., 2005; Reed M. C., 2008], а в наших исследованиях отмечен рост содержания метаболитов ПОЛ в плазме крови пациентов с ВП ($r=-0,59$, $p<0,05$ – коэффициент корреляции между содержанием GSH в нейтрофилах и концентрацией ТБК-АП в плазме крови больных ВП). Снижение уровня GSH в нейтрофилах у больных ВП, объясняется не только его использованием в качестве носителя SH-групп, необходимых для защиты от HO^\bullet и других АФК, но и интенсивным расходом глутатионзависимой пероксидазой [Fuchs T. A., 2007, Меньшикова Е. Б. и соавт., 2008]. Однако сами АФК, в частности HO^\bullet , способны ингибировать фермент [Pigeolet E., Remacle J., 1991]. Активность глутатионпероксидазы в нейтрофилах, полученных у больных ВП, по сравнению с таковой в клетках здоровых доноров (160,6 (132,60-174,20) нмоль/(мин·мг белка)) была снижена в 1,6 раза, при экспериментальном ОС – в 2,2 раза ($p<0,05$).

Снижение восстановительного потенциала тиолдисульфидной системы при ОС может усугублять процессы окислительной деградации липидных и белковых молекул клеток. Оценка параметров ОМБ в нейтрофилах крови у пациентов с ВП и при моделировании ОС на клетках, полученных у здоровых доноров, показала увеличение содержания карбонильных производных белков (рис. 5). Повышение концентрации КПБ обусловлено гиперпродукцией АФК, дисбалансом системы АОЗ клеток, что характерно для острых воспалительных заболеваний. Большое количество карбонильных соединений, связанных с деградацией белков, образуется в результате металл-катализируемого окисления и при воздействии гипохлорита [Дубинина Е. Е., 2006]. Подтверждением данного положения служит наличие корреляционной связи между активностью МПО и содержанием КПБ в нейтрофилах ($r=0,74$, $p<0,05$ – при экспериментальном ОС, $r=0,76$, $p<0,05$ – при внебольничной пневмонии).

При сравнении концентрации КПБ в плазме крови пациентов с ВП по отношению к показателю в группе здоровых доноров отмечалось высокое их содержание, как при спонтанном, так и при металл-катализируемом окислении, свидетельствующее о высокой степени повреждения белков плазмы (рис. 6). При этом наших исследованиях был отмечен высокий коэффициент корреляции между содержанием КПБ в нейтрофилах и в плазме крови у больных внебольничной пневмонией ($r=0,83$, $p<0,05$ при спонтанном окислении, регистрируемом при длине волны 274 нм, $r=0,86$, $p<0,05$ – при металл-катализируемом окислении, регистрируемом при длине волны 363 нм).

Действие компонентов системы Фентона при металл-катализируемом окислении связывают, в основном, с генерацией HO^\bullet , однако не исключена возможность образования и других реакционных соединений, в частности

феррил- и перферрил-ионов (FeO^{2+} , FeOH^{3+}). В нашем исследовании отмечена взаимосвязь между содержанием продуктов металл-катализируемого окисления в плазме крови и уровнем продукции гидроксильного радикала нейтрофилами пациентов с ВП (коэффициент корреляции между показателями $r=0,90$, $p<0,05$ при длине волны 274 нм; $r=0,82$, $p<0,05$ при длине волны 373 нм).



*- $p<0,05$ уровень значимости различий по сравнению с нейтрофилами здоровых доноров

^- $p<0,05$ уровень значимости различий по сравнению с нейтрофилами здоровых доноров, инкубированных с перекисью водорода

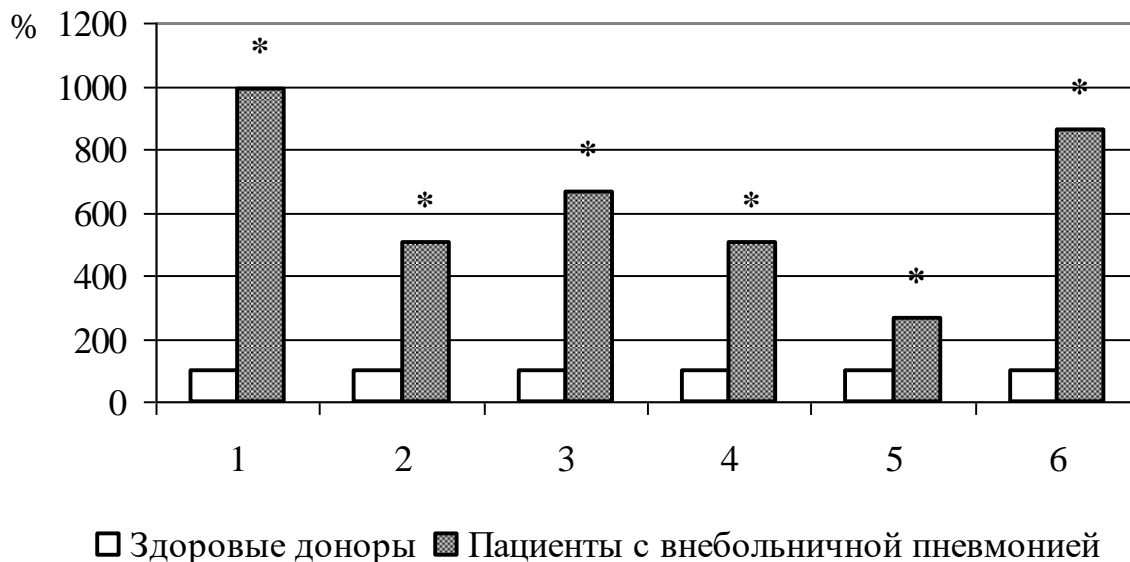
** - $p<0,05$ уровень значимости различий по сравнению с интактными нейтрофилами пациентов с внебольничной пневмонией

Рис. 5. Содержание карбонильных производных белков в нейтрофильных лейкоцитах крови пациентов с внебольничной пневмонией и при экспериментальном окислительном стрессе в условиях культивирования с NEM, DTE, BSO или AT.

Глубокие окислительные повреждения белков при ВП подтверждаются также зарегистрированной нами в плазме крови высокой концентрацией практически нерепарируемых стабильных модификаций триптофана и тирозина (рис. 6). Образование модифицированных остатков тирозина связано с функционированием синтазы оксида азота и МПО [Рябов Г. А., Азизов Ю. М., 2002], активность последней в нейтрофилах пациентов с ВП и при экспериментальном ОС была существенно увеличена ($r=0,82$, $p<0,05$ – коэффициент корреляции между активностью МПО и содержанием битирозина в плазме пациентов с ВП).

В плазме крови пациентов с ВП было отмечено значительное повышение содержания окисленных остатков триптофана, образование которых связывают с действием гидроксильного радикала [Aqilina J. A. et al.,

2000; Дубинина Е. Е., 2006] (коэффициент корреляции между содержанием окисленного триптофана и уровнем продукции HO^{\bullet} нейтрофилами $r=0,94$, $p<0,05$).



* – $p<0,05$ уровень значимости различий по сравнению со значениями в плазме крови здоровых доноров

Рис. 6. Показатели окислительной модификации белков плазмы крови у пациентов с внебольничной пневмонией

Примечание: 1 – КПБ при спонтанном окислении ($\lambda=274$ нм), 2 – КПБ при спонтанном окислении ($\lambda=363$ нм), 3 – КПБ при металл-катализируемом окислении ($\lambda=274$ нм), 4 – КПБ при металл-катализируемом окислении ($\lambda=363$ нм), 5 – битирозин, 6 – окисленный триптофан

Усиление окисления белков в условиях низкого содержания восстановленных эквивалентов в нейтрофильных лейкоцитах больных ВП и с индуцированным ОС, культивированных с BSO или АТ, в нейтрофилах пациентов с ВП при инкубации с NEM, вероятно, связано с нарушением баланса про-/антиоксиданты в эффекторных клетках острого воспаления. Это подтверждается наличием отрицательной корреляционной связи между содержанием GSH и уровнем КПБ в интактных нейтрофилах больных ВП ($r=-0,72$, $p<0,05$), а также между величиной соотношения GSH/GSSG и уровнем КПБ ($r=-0,88$, $p<0,05$) в условиях ОС *in vitro*. Ингибирование синтеза GSH в нейтрофилах приводит к нарушению образования дисульфидных связей белок-SSG, которые сохраняют SH-группы белков от необратимого окисления. В наших исследованиях содержание КПБ было максимально повышено в нейтрофилах, инкубированных с BSO, когда в условиях отсутствия синтеза GSH не отмечалось дополнительного образования белок-SSG.

Таким образом, при экспериментальном ОС и у пациентов с ВП существенная роль в антиоксидантной защите принадлежит

тиолдисульфидной системе, буферная емкость которой создает резерв для защиты SH-групп белков от необратимой окислительной модификации. Окислительные модификации, модулирующие активность протеинов, в частности образование карбонильных производных и глутатионилирование белков, могут участвовать в механизмах изменений функциональных свойств нейтрофильных лейкоцитов крови (повышение продукции гидроксильного радикала, ИЛ-8, ФНО- α и активности миелопероксидазы). При пониженном содержании GSH и низкой скорости регенерации GSSG в нейтрофилах повышается степень риска необратимого окислительного повреждения белков, следствием чего является нарушение их функциональной активности [Berlett B. S., Stadtman E. R., 1997; Ramirez D. C. et al., 2005]. В частности, ингибирование каталазы или синтеза глутатиона в нейтрофильных лейкоцитах крови сопровождается снижением активности миелопероксидазы и способности продуцировать гидроксильный радикал, необходимых для обеспечения микробицидной функции. С другой стороны, окислительная модификация белков приводит к изменению их антигенных свойств, а активация ПОЛ способствует образованию хемоаттрактантов, увеличивающих миграцию фагоцитов и в очагах воспаления может сформироваться порочный круг.

ВЫВОДЫ

1. Развитие окислительного стресса при внебольничной пневмонии и индукции *in vitro* 200 мкМ перекисью водорода сопровождается изменениями функциональных свойств нейтрофильных лейкоцитов крови, характеризующимися возрастанием продукции гидроксильного радикала, провоспалительных цитокинов (ИЛ-8 и ФНО- α) и активности миелопероксидазы.
2. Дисбаланс тиолдисульфидной системы в нейтрофилах крови у пациентов с внебольничной пневмонией и при экспериментальном окислительном стрессе характеризуется снижением содержания восстановленного глутатиона, тиоловых групп белков, активности глутатионпероксидазы и возрастанием концентрации окисленной формы глутатиона.
3. В условиях окислительного стресса у пациентов с внебольничной пневмонией и при индукции *in vitro* перекисью водорода в нейтрофильных лейкоцитах крови повышается содержание карбонильных производных белков; в плазме крови больных внебольничной пневмонией увеличивается концентрация карбонильных производных белков, битирозина и окисленного триптофана.
4. Восстановленный глутатион в нейтрофилах крови больных внебольничной пневмонией и в условиях окислительного стресса *in vitro* участвует в защите белков от окислительного повреждения: снижение его внутриклеточной концентрации при культивировании нейтрофильных лейкоцитов с ингибитором синтеза глутатиона бутионин-сульфоксимином

или каталазы 3-амино-1,2,4-триазолом сопровождается увеличением содержания карбонильных производных белков; культивирование клеток с протектором SH-групп 1,4-дитиоэритритолом приводит к снижению концентрации карбонильных производных белков.

5. Блокирование SH-групп глутатиона и белков N-этилмалеимидом в нейтрофилах крови пациентов с внебольничной пневмонией и при экспериментальном окислительном стрессе сопровождается снижением активности миелопероксидазы, продукции ИЛ-8, ФНО- α и гидроксильного радикала; ингибирование синтеза глутатиона бутионин-сульфоксимином в нейтрофильных лейкоцитах приводит к нарушению образования белково-связанного глутатиона, снижению активности миелопероксидазы и способности продуцировать гидроксильный радикал на фоне повышенной продукции провоспалительных цитокинов.

6. Молекулярные механизмы изменений функционального состояния нейтрофильных лейкоцитов крови (продукции гидроксильного радикала, ИЛ-8, ФНО- α и активности миелопероксидазы), сопряженные с дефицитом восстановленного глутатиона и степенью окислительной модификации белков, являются однотипными у больных внебольничной пневмонией и при окислительном стрессе *in vitro*.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Деадаптивные изменения структурно-метаболических свойств нейтрофилов при острой пневмонии [текст] / Т. В. Жаворонок, Г. В. Петина, Е. А. Степовая и др. // Вестник ТГУ: материалы научных конференций, симпозиумов, школ, проводимых в ТГУ – Томск, 2006. – № 21. – С. 34-35.
2. Нарушение окислительного метаболизма при острых воспалительных заболеваниях [текст] / Т. В. Жаворонок, Е. А. Степовая, Н. В. Рязанцева, Г. В. Петина и др. // Клиническая лабораторная диагностика. – 2006. – № 12. – С. 10-14.
3. Дополнительные возможности в диагностике внебольничной пневмонии [текст] / Ф. Ф. Тетенов, Т. С. Агеева, Т. В. Жаворонок, Н. Г. Кривоногов, А. В. Дубоделова, Г. В. Петина и др. // Сибирский медицинский журнал. – 2007. – Т. 68. – № 1. – С. 54-57.
4. Петина, Г. В. Окислительный метаболизм и антиоксиданты в нейтрофилах у больных пневмонией и при окислительном стрессе [текст] / Г. В. Петина // Науки о человеке: материалы VII Конгресса молодых ученых и специалистов. – Томск, 2007. – С. 192-193.
5. Окислительный метаболизм клеток в дебюте внебольничной пневмонии [текст] / Т. В. Жаворонок, Е. А. Степовая, Н. В. Рязанцева, Г. В. Петина и др. // Материалы XX Съезда Физиологического общества им. И. П. Павлова. – М., 2007. – С. 226-227.
6. Внебольничные пневмонии: клинико-сцинтиграфическая характеристика и окислительный дисбаланс клеток [текст] / Т. С. Агеева, Т. В. Жаворонок, Ф. Ф. Тетенов, Н. Г. Кривоногов, Н. В. Рязанцева, В. Д. Завадовская, Е. А. Степовая, А. В. Дубоделова, Г. В. Петина и др. // Клиническая медицина. – 2007. – № 7. – С. 43-48.
7. Влияние окислительного стресса на редокс-состояние и реализацию апоптотической программы нейтрофильных лейкоцитов периферической крови [текст] / Т. В. Жаворонок, Е. А. Степовая, Н. В. Рязанцева, Г. В. Петина и др. // Фундаментальные исследования: материалы III общероссийской научной конференции с международным участием «Перспективы развития вузовской науки». – Дагомыс-Сочи, 2007. – № 12 (часть вторая). – С. 383.
8. Оценка процессов окислительной модификации белков нейтрофилов и эритроцитов в условиях окислительного стресса [текст] / Т. В. Жаворонок, Е. А. Степовая, Г. В. Петина и др.

др. // Фундаментальные исследования: материалы III общероссийской научной конференции с международным участием «Перспективы развития вузовской науки». – Дагомыс-Сочи, 2007. – № 12 (часть вторая). – С. 383-384.

9. Окислительный метаболизм и апоптоз нейтрофильных лейкоцитов при внебольничной пневмонии [текст] / Т. В. Жаворонок, Г. В. Петина, Т. С. Агеева и др. // Материалы XVII Национального конгресса по болезням органов дыхания. – Казань, 2007. – С. 128.

10. Оценка окислительной модификации белков и метаболический статус нейтрофилов при внебольничной пневмонии в зависимости от характера легочного инфильтрата [текст] / Т. В. Жаворонок, Г. В. Петина, Ю. В. Стариков и др. // Клиническая лабораторная диагностика: национальные дни лабораторной медицины России. – М., 2007. – № 9. – С. 85.

11. Участие системы глутатиона в редокс-регуляции нейтрофилов при внебольничной пневмонии и окислительном стрессе *in vitro* [текст] / Т. В. Жаворонок, Г. В. Петина, Ю. В. Стариков и др. // Вятский медицинский вестник: материалы всероссийской научно-практической конференции «Актуальные вопросы современной биохимии», посвященной 20-летию Кировской государственной медицинской академии. – Киров, 2007. – № 4. – С. 98-99.

12. Тиол-дисульфидная составляющая редокс-регуляции нейтрофилов при внебольничных пневмониях [текст] / Т. В. Жаворонок, Г. В. Петина, Ю. В. Стариков и др. // Материалы II Конгресса терапевтов «Новый курс: консолидация усилий по охране здоровья нации». – М., 2007. – С. 75-76.

13. Community-acquired pneumonia acute period : neutrophil redox-potential and protein oxidative modification process [текст] / Т. Zhavoronok, Ye. Stepovaya, N. Ryazantseva, G. Petina et al. // European Respiratory Journal: Abstracts 18th ERS Annual Congress. - Berlin, Germany, 2008. – Vol. 32. – № 52. – P. 969.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АТ – 3-амино-1,2,4-триазол

BSO – бутионин-сульфоксимин

DTE – 1,4-дитиоэритритол

GSH – восстановленный глутатион

GSSG – окисленный глутатион

HO[•] – гидроксильный радикал

H₂O₂ – перекись водорода

NEM – N-этилмалеимид

АОЗ – антиоксидантная защита

АФК – активные формы кислорода

Белок-SH – SH группы белков

Белок-SSG – белково-связанный глутатион

ВП – внебольничная пневмония

ИЛ-8 – интерлейкин-8

КПБ – карбонильные производные белков

МПО – миелопероксидаза

ПОЛ – перекисное окисление липидов

ОМБ – окислительная модификация белков

ОС – окислительный стресс

ТБК-АП – ТБК-активные продукты

ТДС – тиолдисульфидная система

ФНО-α – фактор некроза опухоли α

Тираж 100 экз.
Отпечатано в КЦ «Позитив»
634050 г. Томск, пр. Ленина 34а