

На правах рукописи

**Носарева Ольга Леонидовна**

**Состояние антиоксидантной  
и детоксикационной защиты организма  
при псевдотуберкулезе у детей**

14.00.16 – патологическая физиология

14.00.10 – инфекционные болезни

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

ТОМСК-2006

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

**Научные руководители:**

кандидат медицинских наук

**Жаворонок Татьяна Васильевна**

доктор медицинских наук,  
профессор

**Помогаева Альбина Петровна**

**Официальные оппоненты:**

доктор медицинских наук,  
профессор, академик РАМН

**Дыгай Александр Михайлович**

кандидат медицинских наук,  
доцент

**Одинцова Людмила Николаевна**

**Ведущая организация:**

ГОУ ВПО «Омская государственная медицинская академия» Росздрава,  
г. Омск

Защита диссертации состоится «\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2006 г. в \_\_\_\_\_ часов на заседании Диссертационного Совета 208.096.01 при Сибирском государственном медицинском университете (634050 г. Томск, Московский тракт, 2).

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке Сибирского государственного медицинского университета (634050 г. Томск, пр. Ленина, 107).

Автореферат разослан «\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2006 года.

Ученый секретарь  
диссертационного совета



**Суханова Г.А.**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность исследования

За последние 10 лет чрезвычайно возрос интерес к изучению псевдотуберкулёза, который относят к иерсиниозам [Yoshino K. et al., 1995; Быданов М.Л., 1999; Беседнова Н.Н., Сомов Г.П., 2000; Сомов Г.П. и др., 2001; Шурыгина И.А. и др., 2003; Бехтерева М.К. и др., 2004; Учайкин В.Ф. и др., 2005]. Псевдотуберкулез чаще всего встречается в Сибирском и Дальне-Восточном регионах России, в Скандинавии, на севере США и в Канаде. По официальным данным санитарно-эпидемиологического центра г. Томска, частота встречаемости заболевания в период с 1999 по 2004 гг. составила 374 случая на 10 000 детского населения, что превышает в 2,23 раза заболеваемость среди взрослого контингента – 168 случаев на 10 000 человек. Среди остальных острых кишечных инфекций псевдотуберкулез занимает второе место после дизентерии. Особенно обращает на себя внимание рост заболеваемости у детей [Дроздов В.Н., Махмудов О.С., 1981; Ющенко Г.В., 1998; Быданов М.Л., 1999; Учайкин В.Ф. и др., 2005]. Даже при своевременной адекватной антибактериальной терапии частота негладкого течения псевдотуберкулеза может достигать 13,6-43,5% [Бениова С.Н., Маркелова Е.В., 2003], в связи, с чем сохраняется необходимость тщательного изучения патогенеза этого заболевания.

*Yersinia pseudotuberculosis* обладает целым набором факторов патогенности, препятствующих воздействию защитных механизмов хозяина. Все компоненты инфекционного процесса претерпевают непрерывные и существенные изменения за счет широкого распространения врожденных и приобретенных иммунодефицитов, ухудшающейся экологической обстановки и возникновения у микроорганизмов новых патогенных свойств, в том числе устойчивости к традиционной антибиотикотерапии. Иммунологические аспекты заболевания наиболее изучены [Кудрина Н.В., 1993; Логвиненко А.А., 2000], однако они не раскрывают всей глубины возникающей патологии.

Важное место в патогенезе псевдотуберкулеза, как и любого другого инфекционного воспаления, занимают свободно-радикальные процессы. При этом в результате накопления активных форм кислорода и недостаточности компонентов антиоксидантной системы организма наблюдается дисбаланс в системе про-/антиоксиданты [Разник С.Д., 1999; Шепелев А.П. и др., 2000; Hong J.H. et al., 2004]. Активации окислительных механизмов способствует также нарушение процессов микроциркуляции в органах и тканях [Нагоев Б.С. и др., 2002]. Негативное действие активных форм кислорода реализуется в модификации липидных и белковых молекул, сопровождающейся повреждением мембранных структур и ключевых ферментов антиоксидантной защиты [Зиновьева В.Н., Островский О.В., 2002]. Важнейшее место в системе антирадикальной защиты и детоксикации различных ксенобиотиков и токсинов в организме принадлежит системе глутатиона [Glauser T.A. et al., 1999; Sommerburg O. et al., 2002; Hostetler C.E., Kincaid R.L., 2004; Леонова З.А., 2005], которая участвует в поддержании тиол-дисульфидного равновесия,

регулирует углеводный, липидный и белковый обмены, свойства и функции биологических мембран [Горожанская Э.Г., 2001].

*Yersinia pseudotuberculosis*, ее эндотоксин воздействует на систему цитохрома P<sub>450</sub>, вследствие чего снижается монооксигеназная активность и детоксикационная функция печени [Разник С.Д., 1999]. Цитохром P<sub>450</sub>-зависимую реакцию гидроксилирования необходимо рассматривать в тесной связи с реакциями перекисного окисления липидов, так как оба типа реакций обеспечиваются единой системой транспорта электронов и протонов, локализованных в эндоплазматическом ретикулуме гепатоцитов [Archakow A., Wachnowa G., 1990; Матюшин Б.Н. и др., 1994; Логинов А.С. и др., 1995]. Вследствие функционального дисбаланса клеток печени возникает реактивный гепатит. Поэтому исследование детоксикационной функции организма при псевдотуберкулезе приобретает особую актуальность [Комаров Ф.И. и др., 1995; Величковский Б.Т., 2000].

В литературе приводятся, главным образом, общие сведения о механизмах повреждения мембранных структур клеток организма без учета особенностей этих нарушений при формировании псевдотуберкулеза различных степеней тяжести и вариантов течения болезни. Однако комплексной оценки показателей антиоксидантной и детоксикационной систем организма при псевдотуберкулезе у детей не проводилось. Практически отсутствуют сравнительные данные об активности ферментов, участвующих в нейтрализации продуктов перекисного окисления липидов при этом заболевании. Полученные результаты позволят расширить фундаментальные представления о патогенезе псевдотуберкулеза, станут важным источником поиска эффективных средств лечения и профилактики негладкого течения заболевания.

#### **Цель работы:**

Оценить состояние процессов перекисного окисления липидов, системы антиоксидантной защиты и детоксикационной функции организма в зависимости от тяжести и течения псевдотуберкулеза у детей для прогнозирования исходов заболевания и влияние терапии селенитом натрия на состояние системы глутатиона и течение инфекции.

Предпринятое исследование было сосредоточено на решении следующих **основных задач**:

1. Установить характер изменений содержания продуктов перекисного окисления липидов – диеновых конъюгатов и ТБК-реактивных продуктов в плазме крови у детей с псевдотуберкулезом в зависимости от тяжести и течения заболевания.

2. Охарактеризовать состояние антиоксидантной защиты и детоксикационной функции организма у больных псевдотуберкулезом в зависимости от тяжести и течения заболевания.

3. Оценить параметры глутатионзависимой системы в эритроцитах у детей с псевдотуберкулезом при включении селенита натрия в схему лечения.

4. Оценить роль нарушений системы антиоксидантной защиты и детоксикационной функции организма в патогенезе псевдотуберкулеза у детей.

### **Положения, выносимые на защиту:**

1. В разгар псевдотуберкулеза происходит снижение концентрации восстановленного глутатиона и отмечается дисбаланс активности ферментов его метаболизма (глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза, глутатион-S-трансфераза), а также активация каталазы в эритроцитах. Утяжеление инфекционного процесса сопровождается увеличением расхода восстановленного глутатиона, ингибированием работы глутатионзависимых ферментов и активацией каталазы в эритроцитах.

2. В период угасания клинической симптоматики у больных среднетяжелой и тяжелой формами псевдотуберкулеза при негладком течении не наблюдается нормализации показателей системы глутатиона, что указывает на их прогностическую значимость.

3. Фармакологическая коррекция селенитом натрия способствует восстановлению содержания восстановленного глутатиона, активности глутатионзависимых ферментов и предупреждению негладкого течения заболевания.

4. В разгар псевдотуберкулеза утяжеление инфекционного процесса сопровождается снижением детоксикационного потенциала организма.

5. Показатели системы глутатиона (восстановленный глутатион, глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза, глутатион-S-трансфераза) и интегральные показатели (восстановленный глутатион/ТБК-реактивные продукты, восстановленный глутатион/глутатионредуктаза, глутатионпероксидаза/каталаза) могут использоваться как дополнение к комплексной оценке тяжести инфекционного процесса и для прогнозирования негладкого течения заболевания.

### **Научная новизна:**

В работе впервые проведено комплексное изучение неферментативного и ферментативного звена антиоксидантной защиты и детоксикационной функции организма у детей с учетом степени тяжести и вариантов течения псевдотуберкулеза. Выявлено, что активация окислительных процессов и угнетение антиоксидантной защиты вносят существенный вклад в формирование инфекционного воспаления и возникновение негладкого течения при поражении *Yersinia pseudotuberculosis*. Развитие псевдотуберкулеза сопровождается нарушением баланса в системе про-/антиоксиданты на уровне клетки и целого организма. Усиленный расход восстановленного глутатиона, при активации глутатионредуктазы и каталазы на фоне угнетения активности глутатионпероксидазы и глутатион-S-трансферазы в период ранней реконвалесценции выступают как прогностический признак негладкого течения болезни. Наиболее существенный дисбаланс компонентов антиоксидантной защиты организма, требующий дополнительной корректирующей терапии с помощью назначения антиоксидантных препаратов, наблюдается при среднетяжелой и тяжелой формах псевдотуберкулеза. В группе детей, получавших в качестве дополнения к традиционной этиотропной терапии препарат селенит натрия, не отмечалось негладкого течения псевдотуберкулеза. Выявлены реципрокные соотношения в изменении параметров

антиоксидантной защиты и показателей детоксикационной функции организма при развитии псевдотуберкулеза различных степеней тяжести на фоне гладкого и негладкого течения болезни у детей.

#### **Научно-практическая значимость:**

Выявленные особенности дисбаланса неферментативного и ферментативного компонентов антиоксидантной защиты и детоксикационного потенциала организма при воздействии *Yersinia pseudotuberculosis* на организм ребенка, позволили расширить существующие представления о патогенезе псевдотуберкулеза.

Полученные по итогам работы данные фундаментального характера могут быть использованы для разработки целенаправленной патогенетически обоснованной антиоксидантной коррекции системных нарушений при псевдотуберкулезе у детей.

Областями применения полученных данных являются патологическая физиология и инфекционные болезни. Результаты работы используются при проведении соответствующих курсов на кафедрах патологической физиологии и детских инфекционных болезней у студентов Сибирского государственного медицинского университета.

**Апробация работы.** Основные результаты диссертации обсуждены на: IV, V, VI Международных конгрессах молодых ученых и специалистов «Науки о человеке» – Томск, 2003, 2004, 2005; IX Всероссийской научно-практической конференции «Молодые ученые в медицине» посвященной 190-летию Казанского государственного медицинского университета – Казань, 2004; Международной научной конференции «Развитие международного сотрудничества в области изучения инфекционных заболеваний» – Россия, Новосибирская область, 2004; III Конгрессе педиатров-инфекционистов России «Актуальные вопросы инфекционной патологии у детей. Инфекция и иммунитет» – Москва, 2004; V Сибирском физиологическом съезде – Томск, 2005; Всероссийской научно-практической конференции «Терапия инфекционных заболеваний у детей: современные представления и нерешенные вопросы» – Санкт-Петербург, 2005.

Основные результаты диссертации опубликованы в 24 печатных работах, 4 из которых в центральной печати (рецензируемых журналах из списка ВАК (2002)).

#### **Структура и объем диссертации**

Диссертация изложена на 201 странице машинописного текста. Состоит из введения, обзора литературы, главы «Материал и методы исследования», описания собственных результатов исследований и их обсуждения, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка цитируемой литературы. Диссертация иллюстрирована 15 рисунками и 14 таблицами. Список литературы содержит 286 источников, из них 147 отечественных и 139 – зарубежных авторов.

#### **МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

**Объектом исследования** являлись 139 детей в возрасте от 5 до 15 лет, находившихся на стационарном лечении в детской инфекционной больнице им.

заслуженного врача РФ Г.Е. Сибирцева г. Томска с диагнозом псевдотуберкулез (ПТ). При постановке клинического диагноза использовали классификацию с учетом клинико-патогенетического принципа А.А. Колтыпина (2001), согласно которой выделяются тип, тяжесть и течение ПТ. Группу контроля составили 45 практически здоровых детей соответствующего возраста. Все дети были разделены на группы с учетом степени тяжести и динамики течения ПТ (рис. 1).



Рис. 1. Распределение обследованных детей по степени выраженности процесса и динамике течения псевдотуберкулеза

Клиническое обследование больных ПТ проводилось в кишечном и гепатитном отделениях детской инфекционной больницы им. заслуженного врача РФ Г.Е. Сибирцева (гл. врач, к.м.н. В.Д. Бикетова).

Параклиническое обследование – в лабораториях вышеназванной больницы и детской больницы №1 г. Томска (гл. врач В.А. Карташов). Оно включало общий анализ крови, мочи, микроскопию фекалий, в том числе исследование на яйца гельминтов и простейших, бактериологическое исследование фекалий на патогенную и условно-патогенную микрофлору, а также фекалий, смывов из зева и мочи на иерсинии по методу Y.S. Paterson, R.A. Cook (1963), а также биохимическое исследование крови – определение активности АлАТ, АсАТ, показателей тимоловой пробы, содержания билирубина и его фракций.

Спектр основных биохимических исследований по теме диссертации был выполнен на базе кафедры биохимии и молекулярной биологии (заведующий – профессор В.Ю. Серебров) и ЦНИЛ СибГМУ (заведующий – профессор А.Н. Байков).

Анализы проводились с частотой 1 раз в 7-10 дней с момента поступления вплоть до выписки из стационара. Лечение больных осуществляли сотрудники кафедры детских инфекционных болезней (заведующая – профессор А.П. Помогаева). При установлении диагноза и формировании групп

исследования оценивались жалобы, данные анамнеза заболевания, эпидемиологического анамнеза, объективного обследования, результаты параклинических исследований. По результатам комплексного клинико-эпидемиологического и параклинического обследования диагноз ПТ был подтвержден у всех 139 детей, включенных в работу. Культура *Yersinia pseudotuberculosis* получена из фекалий у 14 (10,1%) больных. У 125 (89,9%) детей определялись в динамике болезни специфические антитела с титром от 1:100 до 1:3200.

**Материал для исследования:** слюна, эритроциты, нейтрофилы и плазма крови, взятой утром натощак из локтевой вены.

**Методы исследования.** Интенсивность процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в плазме крови оценивали по количеству диеновых конъюгатов (ДК) при специфическом поглощении липидным экстрактом в ультрафиолетовой области спектра [Гаврилов В.Б., Мишкорудная М.И., 1983], содержанию малонового диальдегида – основного представителя ТБК-реактивных продуктов (ТБК-РП), определяемого в тесте с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) [Владимиров Ю.А., Арчаков А.К., 1972]. Параметры неферментативного звена антиоксидантной защиты (АОЗ) организма оценивали в плазме крови – содержание витаминов А и Е на спектрофлуориметре Hitachi-850 по способности  $\alpha$ -токоферолацетата флуоресцировать при 320 нм, а ретинолацетата – при 460 нм [Черняускене Р.Ч. и др., 1984], в эритроцитах – содержание восстановленного глутатиона (ВГ) по реакции с 5,5'-дитио-бис-(2-нитробензойной кислотой) [Карпищенко А.И., 1998]. Параметры ферментативного звена АОЗ определяли как в плазме крови – общую пероксидазную активность по окислению гваякола в присутствии пероксида водорода с образованием соединения хиноидной природы желто-коричневой окраски [Левицкий А.П. и др., 1979], активность каталазы (КАТ) по способности катализировать цветную реакцию пероксида водорода с солями молибдата аммония [Королюк М.А., Иванова Л.И., 1988], супероксиддисмутазы (СОД) по способности тормозить реакцию автоокисления адреналина при рН=10,2 [Брусков А.С. и др., 1976], церулоплазмина по способности окислять диамины [Камышников В.С., 2000]; так и в клетках крови: в нейтрофилах – активность миелопероксидазы по способности катализировать окисление бензида пероксида водорода в нерастворимый оксибензидин, выпадающий в цитоплазме клеток в осадок в виде гранул желто-коричневого цвета [Делекторская Л.Н. и др., 1987]; в эритроцитах [Карпищенко А.И., 1998] – активность КАТ по скорости утилизации перекиси водорода, глутатионредуктазы (ГР) по НАДФ•Н-зависимому преобразованию окисленной формы глутатиона в ВГ, глутатионпероксидазы (ГП) по катализу реакции взаимодействия ВГ с гидроперекисью трет-бутила. Устойчивость эритроцитов к гемолитическому воздействию пероксида водорода (0,7 М) определяли в экспериментах *in vitro* [Покровский А.А., Абраров А.А., 1964]. Метаболическую функцию клеток печени оценивали по параметрам плазмы крови: активности 5'-нуклеотидазы – методом L. Marinetti (1968) по образованию неорганического фосфора, освобождающегося при гидролизе 5'-



аденозинмонофосфата, активности АлАТ, АсАТ и  $\gamma$ -глутамилтрансферазы ( $\gamma$ -ГТ) с помощью наборов фирмы «Лаксема». Детоксикационную функцию печени оценивали: по активности эритроцитарной глутатион-S-трансферазы (ГТ), катализирующей образование GS-2,4-динитробензола в реакции ВГ с 1-хлор-2,4-динитробензолом [Карпищенко А.И., 1998], количеству билирубина и его фракций в сыворотке крови с помощью наборов фирмы «Лаксема», показателям антипиринового теста (период полувыведения ( $T_{1/2}$ ), общий клиренс (Clr) препарата) в слюне по методу В. Brodie и соавт. (1949). В работе использовали реактивы фирм MP Biomedicals (США) и Диа М (Россия).

Статистическая обработка полученных данных выполнялась с использованием пакета Microsoft Excel-2000 и «Statistica 6.0». Результаты описательной статистики для количественных признаков представляли в формате  $\bar{O} \pm m$ , ( $\bar{O}$  – средняя величина изучаемого признака,  $m$  – стандартная ошибка средней величины). Проверку на нормальность распределения проводили с использованием критерия Шапиро-Уилкса. Достоверность различий в группах оценивалась с использованием непараметрического U критерия Манна-Уитни для попарно-несвязанных выборок. Различия считались достоверными при уровне значимости ( $p$ ) ниже 0,05 и 0,01. Степень зависимости между различными параметрами внутри исследуемых групп оценивалась с помощью критерия ранговой корреляции Спирмена. Различия между группами и коэффициенты корреляции ( $r_s$ ) считались достоверными при уровне значимости ( $p$ ) ниже 0,05 и 0,01 [Гланц С., 1999].

## **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

Бактерии и токсины *Yersinia pseudotuberculosis*, вызывая генерализованный процесс с повреждением всех органов и тканей, содействуют активации эффекторных клеток воспаления (нейтрофилы и макрофаги), массивной генерации ими активных форм кислорода (АФК) радикальной и нерадикальной природы. Активация свободно-радикальных реакций способствует реализации окислительного стресса (ОС), сопровождающегося ПОЛ мембран, окислительным повреждением белков и нуклеиновых кислот [Maltsev G., Vasilev A.V., 1999; Шепелев А.П. и др., 2000; Луцак В.И., 2001; Леонова З.А., 2005].

Легкая степень ПТ у детей проявлялась характерными клиническими симптомами заболевания с минимальной выраженностью и наименьшими проявлениями ОС. В разгар ПТ активная наработка продуктов ПОЛ – ДК и ТБК-РП (рис. 2) – сопровождалась снижением соотношения ВГ/ТБК-РП в 3,23 раза ( $p < 0,01$ ), количества ВГ в 1,55 раз ( $p < 0,01$ ) (рис. 3) при выраженном увеличении (в 2,49 раза,  $p < 0,01$ ) активности ГР (рис. 4) и снижении в 3,86 раза ( $p < 0,01$ ) индекса ВГ/ГР относительно аналогичных величин в группе здоровых детей (табл. 1).

Минимальное снижение уровня ВГ при легкой степени ПТ сочеталось с проявлением наибольшей активности ГП среди всех групп больных (рис. 5).

При этом увеличение соотношения ГП/КАТ в 1,23 раза ( $p < 0,05$ ) относительно аналогичных величин в группе контроля происходило не только за счет самого высокого повышения активности ГП (в 1,82 раза,  $p < 0,01$ ), но и умеренного (в 1,47 раза,  $p < 0,01$ ) – КАТ в эритроцитах у детей в разгар заболевания (рис. 6).

Таблица 1

Интегральные показатели при псевдотуберкулезе ( $\bar{O} \pm m$ )

Группы		n	ВГ (эритроциты) ТБК-РП (плазма)	ВГ (эритроциты) ГР (эритроциты)	ГП (эритроциты) КАТ (эритроциты)
I		45	49,07±1,81	144,97±17,08	2,52±0,22
II	ОП	17	15,17±1,74 **	37,55±4,11 **	3,11±0,14 *
	ПВ		34,55±2,74	86,85±10,03 **	5,58±0,16 **
III	ОП	64	9,94±0,74 **	27,19±1,52 **	2,11±0,10
	ПВ		31,21±1,49 **	63,54±4,39 **	3,53±0,36 *
IV	ОП	14	15,42±0,86 **	37,81±3,20 **	2,19±0,20
	ПВ		30,90±2,13 **	51,79±6,47 **	2,10±0,16
V	ОП	28	8,18±0,29 **	33,26±0,66 **	1,44±0,11 **
	ПР		17,32±1,20 **	47,07±4,10 **	1,65±0,12 **
	ПВ		23,61±0,48 **	89,00±0,15 **	2,25±0,16
VI	ОП	16	7,36±0,31 **	20,71±0,45 **	0,75±0,06 **
	ПР		14,54±0,13 **	19,89±0,21 **	1,47±0,01 **
	ПВ		25,43±0,32 **	21,67±1,24 **	1,21±0,14 **

*Примечание: \*\* и \* – уровни значимости различий по сравнению со значениями в группе здоровых детей (I) ( $p < 0,01$  и  $p < 0,05$ ); ОП – острый период болезни; ПР – период ранней реконвалесценции; ПВ – период выздоровления; ТБК-РП – ТБК-реактивные продукты; ВГ – восстановленный глутатион; ГР – глутатионредуктаза; ГП – глутатионпероксидаза; КАТ – каталаза*

Это способствовало своевременной нейтрализации избытка  $H_2O_2$ . В такой ситуации при легкой степени ПТ основная роль в антиперекисной защите клетки принадлежала ГП.

Полученные результаты указывают на наименьший дисбаланс процессов, протекающих в системе глутатиона в эритроцитах при легкой степени ПТ. На фоне достаточно высокого уровня ВГ скорость процессов детоксикации в ГТ-реакции увеличивалась пропорционально содержанию продуктов ПОЛ, что указывало на легкую форму ОС. Поддержанию редокс-состояния клеток способствует тесная взаимосвязь и сбалансированность эффектов ферментов-антиоксидантов и неферментативных соединений (витаминов Е и А, ВГ). Функционирование системы антиоксидантных ферментов на субклеточном уровне обеспечивается рядом процессов, сопряженных с изменением индекса НАДФ/НАДФН• $H^+$ , концентрации дыхательных субстратов, ионов металлов переменной валентности, особенно  $Fe^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$  [Медведева Л.В. и др., 2002].

Нарушение работы ферментов АОЗ вследствие инактивации микробными токсинами может приводить к дополнительной генерации АФК. Это служит одним из проявлений ОС, потенцирующим состояние дисбаланса про-/антиоксидантной системы организма [Дубинина Е.Е., 2001].



Рис. 2. Содержание ТБК-реактивных продуктов в плазме крови детей с псевдотуберкулезом в зависимости от степени тяжести и течения заболевания

Обозначения: \*\* и \* – уровни значимости различий по сравнению со значениями в группе здоровых детей (I) ( $p < 0,01$  и  $p < 0,05$ ); ## и # – уровни значимости различий по сравнению со значениями во II группе детей ( $p < 0,01$  и  $p < 0,05$ ); ♦♦ и ♦ – уровни значимости различий по сравнению со значениями в III группе детей ( $p < 0,01$  и  $p < 0,05$ )

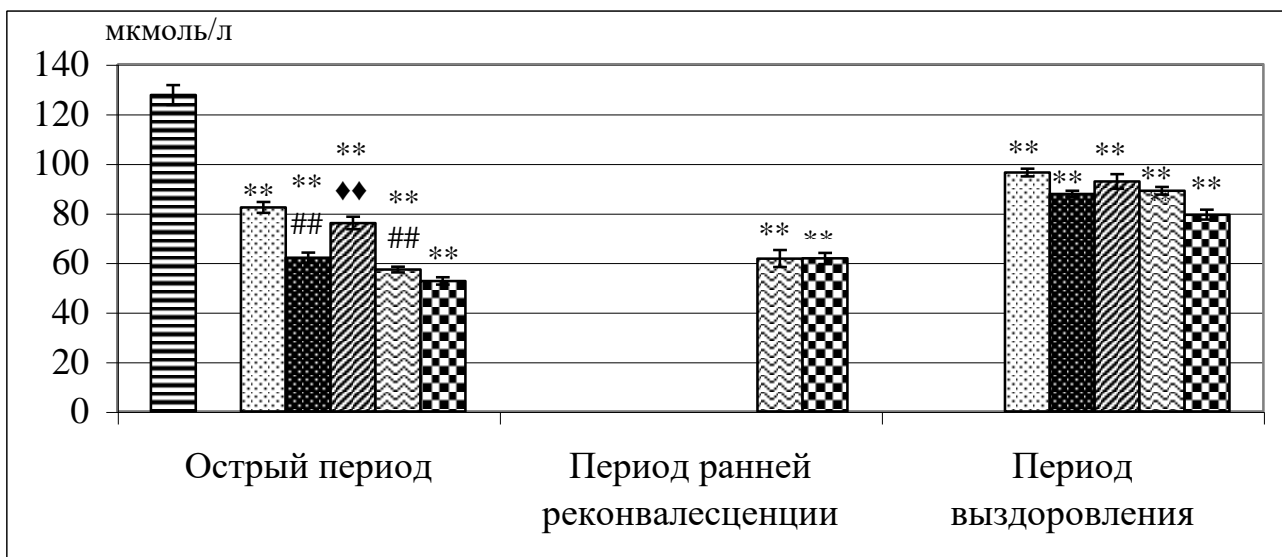


Рис. 3. Содержание восстановленного глутатиона в эритроцитах детей с псевдотуберкулезом в зависимости от степени тяжести и течения заболевания

Обозначения к рисунку такие же как к рисунку 2

Бактерии рода *Yersinia* обладают фосфолипазной активностью, способствующей процессам деградации основных липидных компонентов мембран [Кузнецов В.Г., 1992].

Дезорганизация бислоя липидов, представляющих субстрат, как для ПОЛ, так и для ферментативного гидролиза, есть причина нарушения работы мембраносвязанных энзимов и рецепторов, снижения способности клеток регулировать ионный, энергетический и антиоксидантный гомеостаз, что, в конечном итоге, способствует изменению метаболизма клетки, приводит к необратимым нарушениям ее структурно-функционального статуса [Backman L. et al., 1998; Новицкий В.В. и др., 2004].

При легкой форме ПТ происходила интенсивная утилизация глутатионовых конъюгатов с помощью  $\gamma$ -ГТ (рис. 8). Так, в острый период заболевания активность фермента увеличивалась в 3,81 раза ( $p < 0,01$ ) относительно контрольных значений. При этом отмечалось минимальное снижение детоксикационного потенциала гепатоцитов. Фаза выздоровления при легкой форме ПТ характеризовалась нормализацией всех изучаемых параметров.

При среднетяжелой форме ПТ, гладком течении активация процессов ПОЛ была более выраженной (рис. 2), усиливался расход ВГ. Его содержание было в 2,06 раза ниже, чем у здоровых детей ( $p < 0,01$ ) и в 1,33 раза ниже ( $p < 0,01$ ) чем у детей с легкой степенью болезни (рис. 3). Индекс ВГ/ТБК-РП составлял  $9,94 \pm 0,74$  ( $p < 0,01$ ). Это сопровождалось активацией работы ГР в 2,59 раза ( $p < 0,01$ ) относительно контрольных значений, однако индекс ВГ/ГР был в 1,38 раза ниже, чем у больных легкой степенью ПТ и в 5,33 раза ниже ( $p < 0,01$ ) этого показателя здоровых детей (табл. 1).

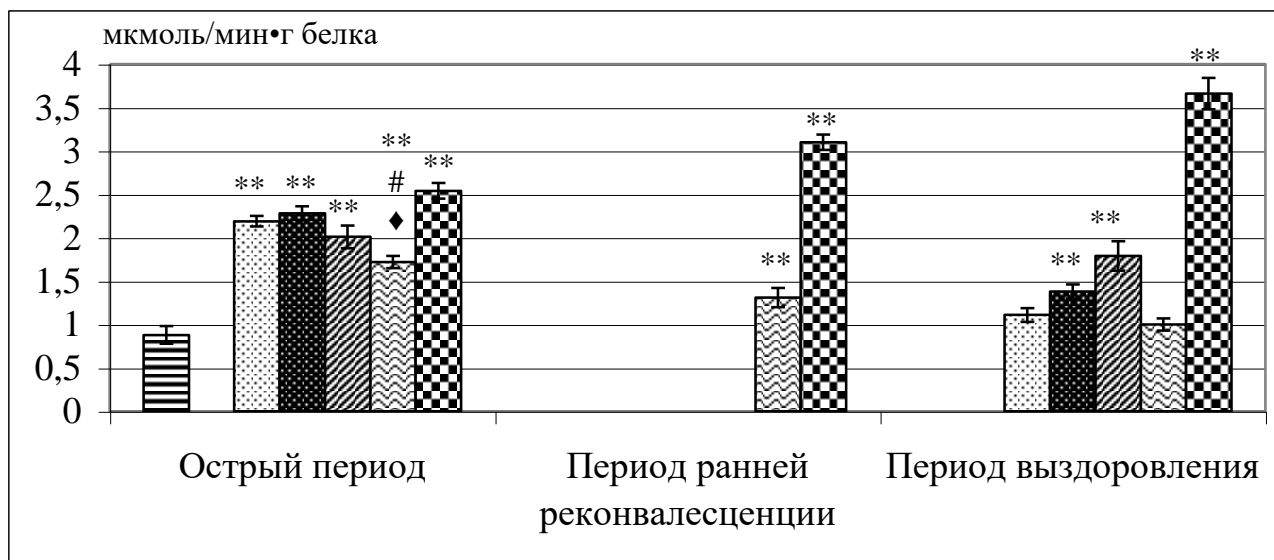


Рис. 4. Активность глутатионредуктазы в эритроцитах детей с псевдотуберкулезом в зависимости от степени тяжести и течения заболевания

Обозначения к рисунку такие же как к рисунку 2

Следовательно, глубина оксидативного дисбаланса была значительно больше по сравнению с легкой формой болезни. Дефицит ВГ в клетках и повышение в 5,84 раза ( $p < 0,01$ ) относительно контроля скорости СОД-реакции, нарабатывающей субстрат для работы ГП, способствовали увеличению активности последнего только в 1,53 раза (рис. 5).

Деградацию  $H_2O_2$  в сложившихся условиях осуществляла в основном каталаза, работающая в 1,83 раза ( $p < 0,01$ ) активнее, чем в контроле, и в 1,24 раза ( $p < 0,01$ ) активнее, чем у детей с легкой степенью тяжести ПТ. Параллельно активировалось образование глутатионовых конъюгатов ГТ (рис. 7), их утилизация  $\gamma$ -ГТ (рис. 8) и усугублялся дисбаланс систем детоксикации печени по сравнению с показателями больных легкой формой ПТ. Клинические симптомы и биохимические признаки развития реактивного гепатита при среднетяжелой форме ПТ также были более выражены.

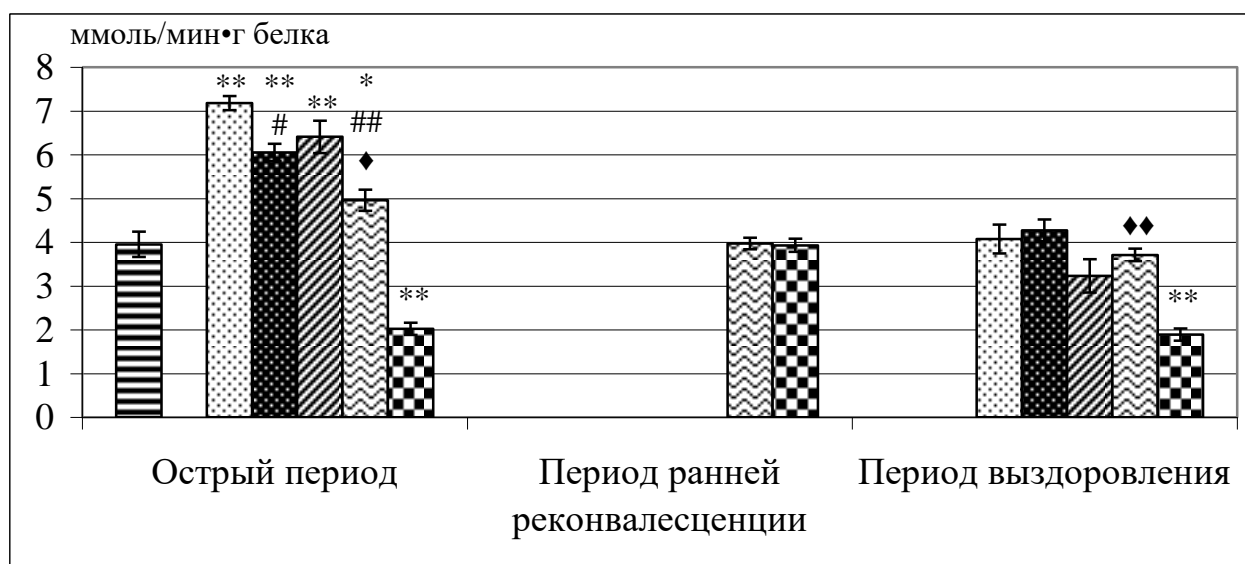


Рис. 5. Активность глутатионпероксидазы в эритроцитах детей с псевдотуберкулезом в зависимости от степени тяжести и течения заболевания

Обозначения к рисунку такие же как к рисунку 2

В группе детей со среднетяжелой формой ПТ, получавших дополнительно селенит натрия зафиксированы более высокий уровень ВГ (снижение в 1,68 раза,  $p < 0,01$ ) относительно контрольных значений) (рис. 3) и меньшая степень дезинтеграции работы глутатионзависимых ферментов. Индекс ВГ/ТБК-РП в разгар болезни снижался в 3,18 раза ( $p < 0,01$ ) по сравнению с контролем. Полученные данные не отличались от аналогичных показателей у детей с легкой формой заболевания. Встраивание атомов селена в активные центры ГП способствовало увеличению скорости работы фермента (в 1,62 раза,  $p < 0,01$ ) в острый период болезни как относительно контрольных значений, так и соответствующих величин в группе детей со среднетяжелой формой ПТ, не получавших селенит натрия (рис. 5). Снижение интегрального показателя ВГ/ГР соответствовало значению, полученному при легкой форме болезни (табл. 1).

Период выздоровления у детей со среднетяжелой формой ПТ, получавших препарат селена, характеризовался менее выраженным напряжением работы ГП (в 1,32 раза ниже,  $p < 0,01$ ) по сравнению с активностью этого фермента в группе больных той же степенью тяжести ПТ, получавших только стандартную этиотропную терапию.

Кроме того, в группе пациентов, получавших дополнительную селено-терапию, в острый период ПТ выявлены достоверно значимые корреляции между содержанием ВГ и активностью ГП и ГТ, а в период выздоровления – только между ВГ и ГП. Установленные факты могут свидетельствовать о протекторных эффектах селено-терапии на систему глутатиона в эритроцитах детей, больных ПТ.

Это связано с влиянием препарата селена на течение окислительно-восстановительных реакций не только посредством встраивания атомов микроэлемента в активный центр ГП и собственных антиоксидантных эффектов, но и со способностью оказывать благоприятные эффекты на метаболические процессы, поддерживающие концентрацию ВГ на оптимальном уровне для адекватной работы глутатионзависимых ферментов [Гусев В.И. и др., 2002]. В частности, при селено-терапии скорость ГТ-реакции в разгар ПТ была ниже, чем у детей при легкой форме болезни (рис. 7). У детей со среднетяжелой формой ПТ, получавших селенит натрия не отмечалось формирования негладкого течения болезни.

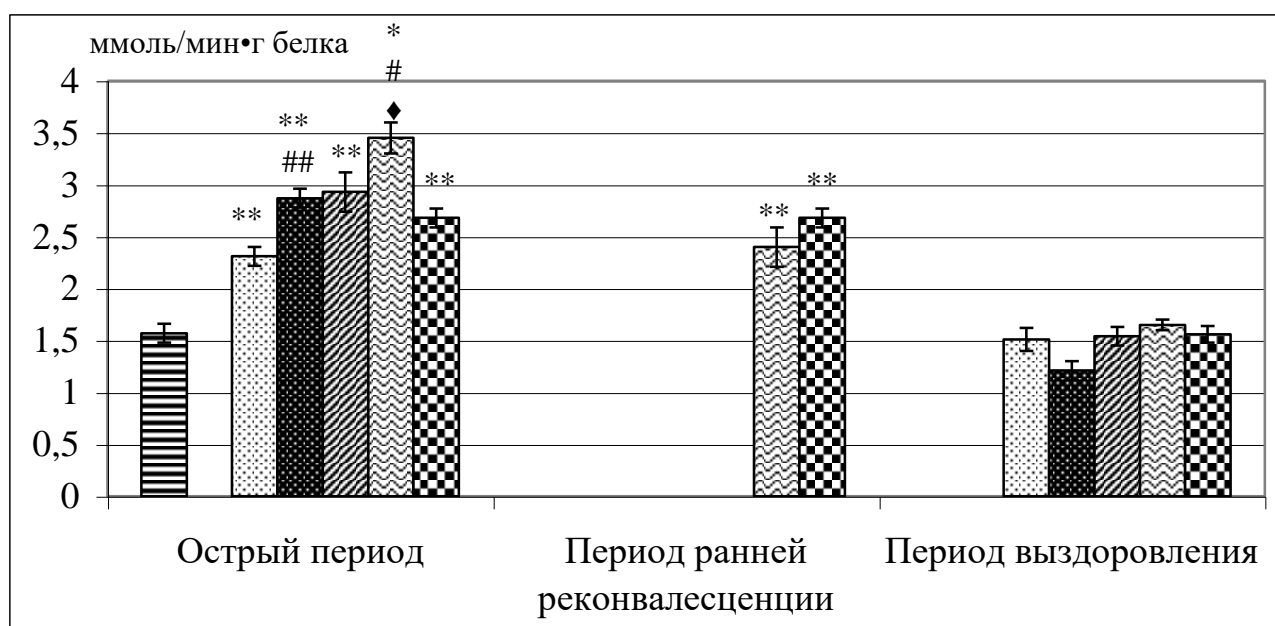


Рис. 6. Активность каталазы в эритроцитах детей с псевдотуберкулезом в зависимости от степени тяжести и течения заболевания  
Обозначения к рисунку такие же как к рисунку 2

Пациенты со среднетяжелой формой ПТ составляли основную долю детей заболевших ПТ, поэтому наиболее важно выявление критериев, способствующих прогнозированию негладкого течения болезни. Такими критериями служили отсутствие подъема концентрации ВГ в период ранней реконвалесценции

и недостаточная активность пула глутатионзависимых ферментов в целом во все периоды исследования (рис. 3, 4, 5, 7, 9).

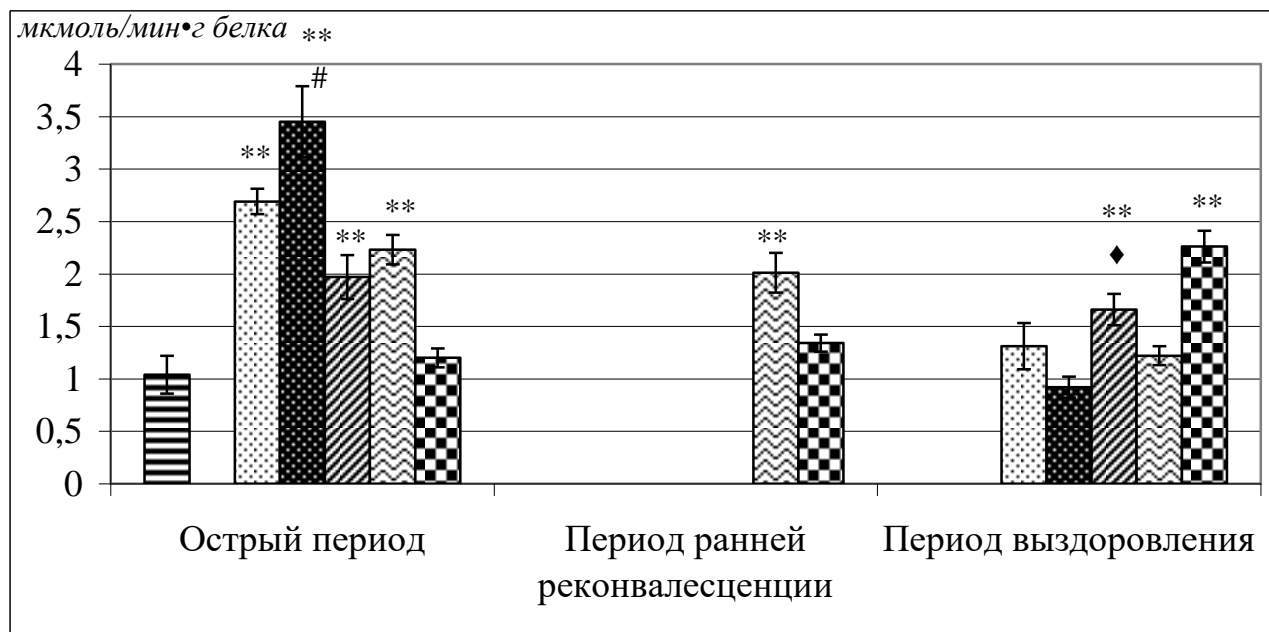


Рис. 7. Активность глутатион-S-трансферазы в эритроцитах детей с псевдотуберкулезом в зависимости от степени тяжести и течения заболевания

Обозначения к рисунку такие же как к рисунку 2

У больных с тяжелой степенью ПТ признаки формирования негладкого течения болезни проявлялись наиболее ярко. Дисбаланс в системе про-/антиоксиданты у этих детей был максимально выражен в острый период. В разгар болезни регистрировалось минимальное среди всех форм ПТ содержание ВГ в эритроцитах (в 2,43 раза,  $p < 0,01$ ) ниже контроля) (рис. 3) при максимальном снижении соотношения ВГ/ТБК-РП – в 6,67 раза ( $p < 0,01$ ) по сравнению с соответствующим индексом в группе контроля. Учитывая жизненно важное значение глутатиона для нормального функционирования клеток, в них происходили перестройки метаболизма, направленные на поддержание его необходимого уровня.

Так, самый низкий уровень тиола способствовал наиболее активной работе ГР по восстановлению окисленной формы глутатиона. Активность фермента относительно контроля повышалась в 2,87 раза ( $p < 0,01$ ) на пике болезни, продолжая нарастать к периоду ранней реконвалесценции до 3,52 раз ( $p < 0,01$ ), при формировании второй волны болезни, становясь максимальной в период выздоровления (повышение в 4,16 раза ( $p < 0,01$ )) (рис. 4).

Однако напряженное функционирование ГР не смогло осуществить полную биорегенерацию окисленного глутатиона и обеспечить достаточное поступление ВГ в окислительно-восстановительные процессы и реакции конъюгации.

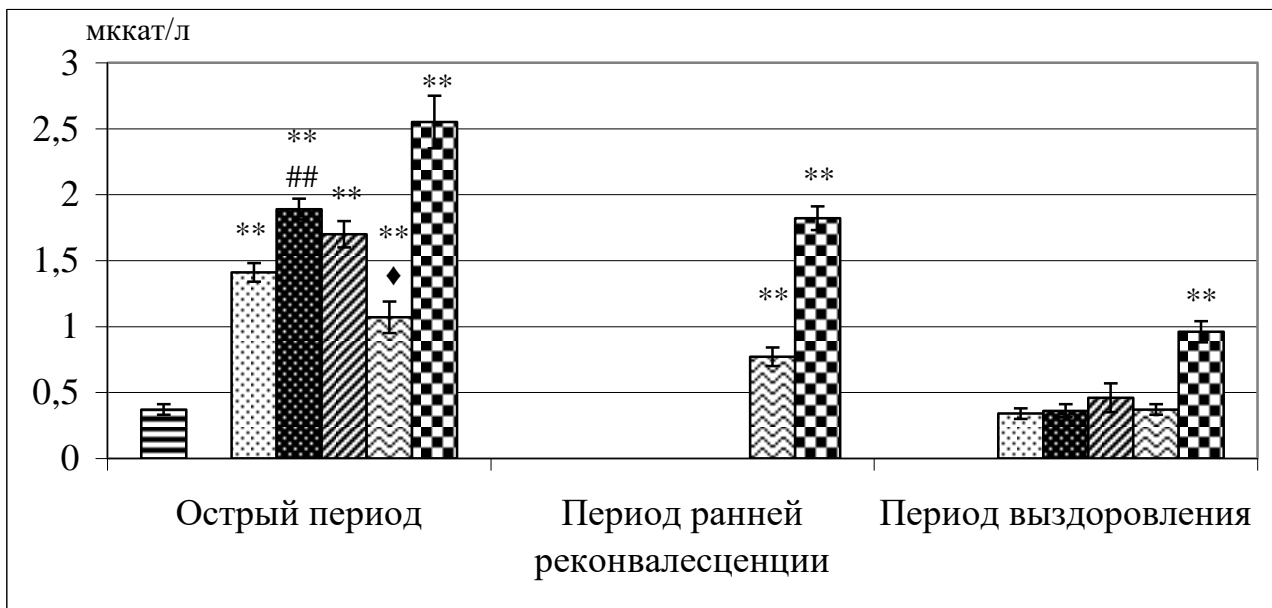


Рис. 8. Активность  $\gamma$ -глутамилтрансферазы в плазме крови детей с псевдотуберкулезом в зависимости от степени тяжести и течения заболевания

Обозначения к рисунку такие же как к рисунку 2

У детей с тяжелой формой ПТ активность ГП и ГТ, участвующих в глутатионзависимых процессах репарации и детоксикации, в разгар болезни была достоверно ниже контрольных величин, либо сопоставимой с таковыми (рис. 5, 6). В период ранней реконвалесценции активность этих ферментов по-прежнему не отличались от значений здоровых детей с наметившейся тенденцией к возрастанию. На фоне глубокого дефицита ВГ при такой динамике функционирования ни ГП, ни ГТ не могли обеспечить требуемой мощности АОЗ эритроцитов. При этом в антиперекисной защите отмечалось переключение акцента с ГП на преимущественное функционирование КАТ. Важно отметить, что по сравнению со среднетяжелой, негладкой формой болезни у детей с тяжелым вариантом ПТ соотношение ВГ/ГР было в 2,37 раза, а индекс ГП/КАТ – в 1,12 раза ниже. У детей с тяжелой формой ПТ интегральный показатель ГП/КАТ снижался в разгар болезни в 3,36 раза ( $p < 0,01$ ), в период ранней реконвалесценции – в 1,71 раза ( $p < 0,01$ ) относительно контрольных значений (табл. 1). Фаза выздоровления характеризовалась минимальной по сравнению со всеми группами больных нормализацией интегральных показателей, зависящих от функциональной активности системы глутатиона в целом.

Чрезмерное накопление окисленного глутатиона и конъюгатов глутатиона, образующихся в глутатион-S-трансферазной и глутатионпероксидазной реакциях при тяжелой форме ПТ, сопровождалось самой активной работой  $\gamma$ -ГТ (повышение в 6,89 раза ( $p < 0,01$ ) относительно контроля) (рис. 8).



# Псевдотуберкулез



Рис. 9. К механизму развития негладкого течения псевдотуберкулеза (разгар болезни)

Активация  $\gamma$ -ГТ – многофункционального фермента, характеризующего состояние систем желчевыделения и микросомального окисления печени, а также утилизирующего конъюгаты с ВГ, происходила в острый период ПТ параллельно с утяжелением клинических проявлений болезни. У детей с тяжелой формой ПТ установлены выраженные симптомы реактивного гепатита, подтвержденного лабораторными методами и максимальное снижение детоксикационного потенциала клеток. Это, также, могло служить предрасполагающим фактором для развития негладкого течения заболевания.

Следовательно, уровень ВГ в клетках существенно влияет на тяжесть ПТ у детей, а показатель его содержания в эритроцитах у больных высоко информативен в прогнозировании негладкого течения среднетяжелой и тяжелой форм уже в начальный период болезни. Наибольшую значимость результаты исследования системы ВГ/глутатионзависимые ферменты представляют при определении прогностических критериев негладкого течения ПТ в период ранней реконвалесценции при среднетяжелой форме болезни.

На основании постоянства динамики выявленных изменений можно рекомендовать интегральные соотношения для прогнозирования течения ПТ у детей. Самыми значимыми интегральными показателями в прогнозе такого варианта заболевания служат ВГ/ТБК-РП, ГП/КАТ и ВГ/ГР. Наиболее прогностически ценными критериями являются: снижение в острый период ПТ абсолютных величин соотношений ВГ/ТБК-РП ниже 10,0; ВГ/ГР ниже 34,0 и ГП/КАТ ниже 1,5; а также отсутствие восстановления указанных индексов до контрольных значений в период ранней реконвалесценции. Чем тяжелее форма ПТ, тем меньшие значения этих соотношений регистрируются. Так, в период ранней реконвалесценции ПТ при угасании клинических симптомов и формировании негладкого течения среднетяжелой и тяжелой форм болезни значения соотношений почти в 2,0 раза меньше, чем в период выздоровления при гладком течении среднетяжелой формы ПТ, и более чем в 3,0 раза ниже соответствующих величин у здоровых детей.

Проведенный корреляционный анализ показал, что число значимых взаимосвязей между различными показателями антиоксидантной системы и метаболитами ПОЛ возрастало с утяжелением патологического процесса.

Таким образом, с утяжелением инфекционного процесса у пациентов с ПТ нами отмечено увеличение накопления продуктов ПОЛ, углубление дисбаланса в работе АОЗ организма, а при негладкой динамике заболевания отсутствие нормализации изучаемых параметров в период ранней реконвалесценции при угасании клинической симптоматики (рис. 10). Это указывает на большую прогностическую значимость динамики изменения параметров системы глутатиона и функционирования КАТ при ПТ у детей.

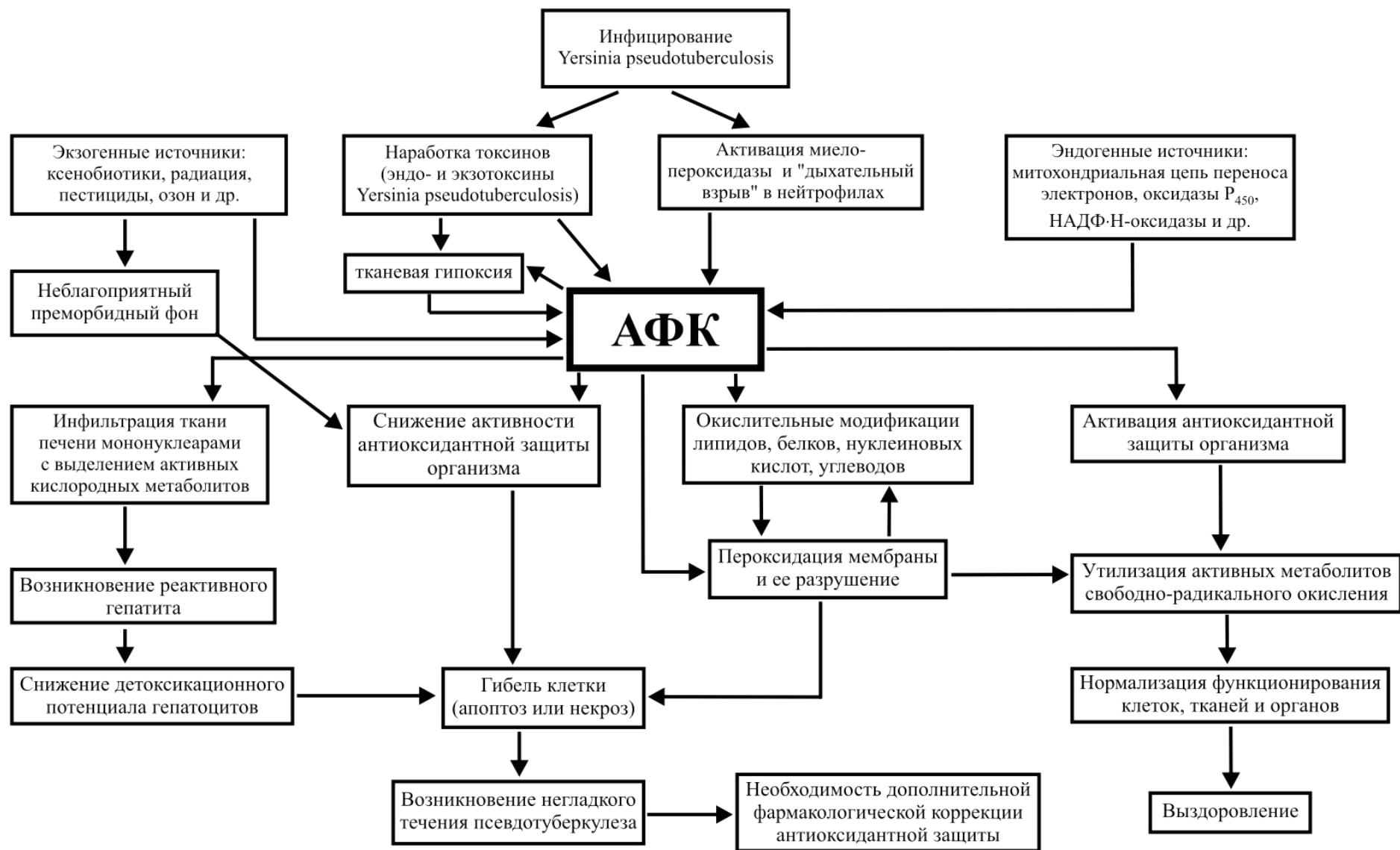


Рис. 10. Значение окислительного стресса в патогенезе псевдотуберкулеза (по результатам собственных исследований и данным литературы)

## **ВЫВОДЫ**

1. Содержание продуктов перекисления липидов – диеновых конъюгатов и ТБК-реактивных продуктов – в плазме крови у детей с псевдотуберкулезом увеличивается в разгар заболевания и в период ранней реконвалесценции у больных при негладком течении среднетяжелой и тяжелой форм болезни.

2. Нарастание степени тяжести псевдотуберкулеза у детей сопровождается снижением показателей антиоксидантной защиты крови с преимущественным падением концентрации восстановленного глутатиона и активности глутатионзависимых ферментов при активации каталазы в эритроцитах. Увеличение степени тяжести псевдотуберкулеза происходит при снижении детоксикационного потенциала организма и развитии реактивного гепатита.

3. Сохранение дисбаланса показателей системы глутатиона при угасании клинических симптомов, в период ранней реконвалесценции является прогностическим критерием негладкого течения заболевания.

4. Включение селенита натрия в терапию детей, больных псевдотуберкулезом, способствует увеличению содержания восстановленного глутатиона, оптимизации работы глутатионпероксидазы и циклическому течению среднетяжелой формы заболевания.

5. Дисбаланс антиоксидантной защиты и снижение детоксикационной функции организма у больных псевдотуберкулезом – важные патогенетические звенья формирования негладкого течения болезни.

## **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

1. При выявлении усиленного расхода восстановленного глутатиона в клетках организма в острый период псевдотуберкулеза необходимо определять при угасании клинических симптомов полный спектр показателей системы глутатиона для выявления степени дисбаланса ферментативного звена антиоксидантной защиты (глутатионзависимые ферменты, супероксиддисмутаза и каталаза) у детей со среднетяжелой и тяжелой формами псевдотуберкулеза для прогнозирования негладкого течения болезни.

2. Для выделения групп «риска» по возникновению негладкого течения среднетяжелой и тяжелой форм псевдотуберкулеза, целесообразно включать, наряду с определением активности глутатионзависимых ферментов, определение концентрации ТБК-реактивных продуктов и активности каталазы с последующим вычислением интегральных показателей (восстановленный глутатион/ТБК-реактивные продукты, восстановленный глутатион/глутатионредуктаза, глутатионпероксидаза/каталаза).

3. При выявлении дисбаланса в системе глутатионзависимых ферментов у детей со среднетяжелой и тяжелой формами псевдотуберкулеза в период исчезновения клинической симптоматики показана патогенетически обоснованная коррекция регистрируемых нарушений (селенитом натрия, витаминами Е, С, А) для предупреждения негладкого течения заболевания.

## СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ:

1. Показатели антиоксидантной защиты при псевдотуберкулезе // Межрегиональная научная конференция, посвященная 100-летию со дня рождения академика АМН СССР С.П. Карпова (Тезисы докладов). – Томск, 7-10 октября 2003 г. – С. 109-110. (Соавт. Жаворонок Т.В., Патрушев В.К.)
2. Интенсивность перекисного окисления липидов и антиокислительная активность крови у детей при псевдотуберкулезе // VI Российский съезд врачей-инфекционистов. – Санкт-Петербург, 29-31 октября 2003 г. – С. 128. (Соавт. Жаворонок Т.В., Помогаева А.П., Патрушев В.К.)
3. Некоторые показатели срыва метаболизирующей функции печени у детей с псевдотуберкулезом // VI Российский съезд врачей-инфекционистов. – Санкт-Петербург, 29-31 октября 2003 г. – С. 171-172. (Соавт. Климанова Е.М., Помогаева А.П., Ковширина Ю.В., Жаворонок Т.В., Чиняева Н.С., Катанасова Л.Л., Гоздан Т.М.)
4. Активность антиперекисных ферментных систем крови при псевдотуберкулезе у детей // VI Российский съезд врачей-инфекционистов. – Санкт-Петербург, 29-31 октября 2003 г. – С. 279-280. (Соавт. Жаворонок Т.В., Ковширина Ю.В., Помогаева А.П.)
5. Состояние монооксигеназной системы и свободного радикального окисления липидов у детей с псевдотуберкулезом // Развитие международного сотрудничества в области изучения инфекционных заболеваний: Тезисы докладов Международной конференции. – Новосибирская область, 8-10 сентября 2004 г. – С. 60-61. (Соавт. Климанова Е.М., Помогаева А.П., Жаворонок Т.В.)
6. Антипириновый тест у детей при псевдотуберкулезе // Науки о человеке – Сборник статей молодых учёных и специалистов (по материалам IV конгресса). – Томск, 15-16 мая 2003 г. – С. 76.
7. Обоснование включения ингибитора циклооксигеназы в комплексное лечение детей с иерсиниозами // Научные труды 4-ой международной научно-практической конференции «Здоровье и образование в XXI веке». – Москва, 23-25 мая 2003 г. – С. 696. (Соавт. Жаворонок Т.В., Климанова Е.М.)
8. Состояние микросомального окисления и окислительного метаболизма мембран у детей при псевдотуберкулезе // Сибирский журнал гастроэнтерологии и гепатологии. – 2003 г. – № 16-17. – С. 191-194. (Соавт. Жаворонок Т.В., Помогаева А.П., Климанова Е.М.)
9. Активация оксидативных процессов как фактор потенцирования патогенных эффектов бактерий рода *Yersinia* // Развитие международного сотрудничества в области изучения инфекционных заболеваний: Тезисы докладов Международной конференции. – Новосибирская область, 8-10 сентября 2004 г. – С. 95. (Соавт. Жаворонок Т.В., Климанова Е.М., Стариков Ю.В., Бутусова В.Н.)
10. Вклад свободнорадикального окисления в формирование осложнений инфекционного процесса у детей // III Конгресс детских инфекционистов России «Актуальные вопросы инфекционной патологии у детей. Инфекция и

иммунитет»: Материалы конгресса. – Москва, 8-10 декабря 2004 г. – С. 166. (Соавт. Жаворонок Т.В., Помогаева А.П., Бутусова В.Н.)

11. Метаболизм глутатиона и оксидативный стресс при остром воспалении // Здоровоохранение Башкортостана. – 2004 г. – №4 – С. 94-96. (Соавт. Жаворонок Т.В., Помогаева А.П., Бутусова В.Н., Климанова Е.М.)

12. Антипириновый тест и состояние печени у детей при инфицировании *Yersinia pseudotuberculosis* // Молодые ученые в медицине: Тезисы докладов IX Всероссийской научно-практической конференции посвященной 190-летию Казанского государственного медицинского университета. – Казань, 20-21 апреля 2004 г. – С. 34-35. (Соавт. Жаворонок Т.В., Климанова Е.М., Чиняева Н.С.)

13. Антипириновый тест как метод оценки детоксицирующей функции печени у детей при вирусном гепатите В и псевдотуберкулезе // Труды института прогрессивных исследований. – Вып. 4. – Изд. Института прогрессивных исследований. – Арад (Израиль), 2004 г. – С. 187-190. (Соавт. Помогаева А.П., Жаворонок Т.В., Климанова Е.М.)

14. Роль глутатиона в антиперекисной защите организма при инфекционной патологии у детей // Науки о человеке: Сборник статей молодых учёных и специалистов (по материалам V конгресса). – Томск, 20-21 мая 2004 г. – С. 117-118. (Соавт. Стариков Ю.В., Бутусова В.Н., Жаворонок Т.В., Климанова Е.М.)

15. Дисбаланс оксидативных процессов в крови детей при иерсиниозах // Материалы III Всероссийской научно-практической конференции в сборнике статей «Функциональная морфология биологических жидкостей». – Москва, 15-16 июня 2004 г. – С. 22-24. (Соавт. Жаворонок Т.В., Климанова Е.М., Стариков Ю.В., Бутусова В.Н., Помогаева А.П.)

16. Особенности компенсаторной мобилизации системы глутатиона при гладком течении псевдотуберкулеза у детей // Актуальные проблемы патофизиологии: Материалы XI Межвузовской конференции молодых ученых. – Санкт-Петербург, 21-22 апреля 2005 г. – Ч. I. – С. 18-20. (Соавт. Жаворонок Т.В., Помогаева А.П., Климанова Е.М.)

17. Микросомальное окисление и состояние печени у детей при инфицировании *Yersinia pseudotuberculosis* // Актуальные проблемы патофизиологии: Материалы XI Межвузовской конференции молодых ученых. – Санкт-Петербург, 21-22 апреля 2005 г. – Ч. I. – С. 50-52. (Соавт. Жаворонок Т.В., Помогаева А.П., Ковширина Ю.В., Стариков Ю.В.)

18. Концентрация глутатиона, активность глутатионредуктазы и глутатионпероксидазы у детей при инфекционной патологии // Молодые ученые в медицине: Тезисы докладов X Всероссийской научно-практической конференции посвященной 1000-летию Казани и 60-летию Победы в Великой Отечественной войне. – Казань, 26-27 апреля 2005 г. – С. 81. (Соавт. Жаворонок Т.В.)

19. Состояние антиоксидантной защиты при остром воспалительном процессе у детей // Науки о человеке: Материалы VI конгресса молодых учёных и специалистов. – Томск: СибГМУ, 19-20 мая 2005 г. – С. 38.

20. Нарушение физиологических функций печени и поджелудочной железы при псевдотуберкулезе у детей // Бюллетень сибирской медицины – приложение 1. – Томск, 2005 г. – С. 59. (Соавт. Жаворонок Т.В., Помогаева А.П., Левашкина Е.А., Стариков Ю.В.)

21. Значение системы глутатиона для адаптивной компенсации функций эритроцитов при воспалении // Бюллетень сибирской медицины – приложение 1. – Томск, 2005 г. – С. 140. (Соавт. Жаворонок Т.В., Бутусова В.Н., Помогаева А.П., Петина Г.В.)

22. Нарушение физиологического баланса в системе прооксиданты-антиоксиданты при остром воспалении // Бюллетень сибирской медицины – приложение 1. – Томск, 2005 г. – С. 174. (Соавт. Жаворонок Т.В., Помогаева А.П., Бутусова В.Н., Стариков Ю.В.)

23. Коррекционная терапия активности Se-зависимой глутатионпероксидазы при псевдотуберкулезе у детей // Всероссийская научно-практическая конференция «Терапия инфекционных заболеваний у детей: современные представления и нерешенные вопросы»: Материалы конференции. – Санкт-Петербург, 11-13 октября 2005 г. – С. 107. (Соавт. Жаворонок Т.В., Помогаева А.П., Климанова Е.М.)

24. Особенности детоксикации с участием ферментов микросомального окисления и глутатион-зависимых ферментов при псевдотуберкулезе у детей // Бюллетень сибирской медицины – 2005. – №1 – С. 16-20. (Соавт. Жаворонок Т.В., Помогаева А.П., Бутусова В.Н., Стариков Ю.В., Климанова Е.М., Петина Г.В., Степовая Е.А.)

#### Список сокращений:

АОЗ – антиоксидантная защита  
АФК – активные формы кислорода  
ВГ – восстановленный глутатион  
ГП – глутатионпероксидаза  
ГР – глутатионредуктаза  
ГТ – глутатион-S-трансфераза  
ДК – диеновые конъюгаты  
КАТ – каталаза

ОС – окислительный стресс  
ПОЛ – перекисное окисление липидов  
ПТ – псевдотуберкулез  
СОД – супероксиддисмутаза  
ТБК – тиобарбитуровая кислота  
ТБК-РП – ТБК-реактивные продукты  
γ-ГТ – γ-глутамилтрансфераза