

КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

*Прогресс науки определяется
трудами ее ученых
и ценностью их открытий.
Л. Пастер*

УДК616.248:612.273:612.015.1

**Л.П. Галактионова, Б.Я. Варшавский,
Ю.В. Кореновский**

larta@pisem.net

ВЛИЯНИЕ ИНТЕРВАЛЬНОЙ ГИПОКСИИ НА ОКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНЫЙ СТАТУС БОЛЬНЫХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ

Алтайский государственный
медицинский университет,
г. Барнаул

ВВЕДЕНИЕ

Согласно общепринятой парадигме, бронхиальная астма (БА) является воспалительным заболеванием дыхательных путей, в развитии которого ведущую роль отводят иммунологической реакции на воздействие аллергена [1,2,3,4]. В последние годы появились доказательства, что иницирующая роль в патогенезе БА принадлежит не иммунным, а эпителиальным клеткам бронхиального дерева, врожденная дисфункция которых проявляется в виде гиперчувствительности к естественным поллютантам уже в раннем возрасте [5,6,7]. Лишь вторичным моментом можно рассматривать привлечение и активацию в бронхиальные ткани соответствующих иммунокомпетентных клеток, приводящих к развитию стойкого воспалительного процесса.

Физиологической реакцией эпителиоцитов дыхательных путей на поллютант является генерация свободнорадикальных медиаторов O_2 и NO , вызывающих, с одной стороны, окисление вдыхаемых веществ, а с другой, активацию соседних и прилежащих эпителиальных, мышечных и других клеток с целесообразным изменением их функции [8,9]. Одновременно субстратная индукция этими агентами антиоксидантных ферментов [10] супероксиддисмутазы (СОД), каталазы (КАТ) и глутатионперокси-

дазы (ГП) предотвращает локальное накопление этих медиаторов и трансформацию физиологической реакции в повреждающую патологическую [11]. Ранее нами было показано, что у больных БА как в период обострения, так и в период ремиссии активность основных антиоксидантных ферментов значительно снижена по сравнению со здоровыми людьми [12], причем не только в тканях бронхиального дерева, но и в других клетках организма, что указывает на системный характер данной патологии [13,14]. Поэтому при неадекватной нейтрализации свободно-радикальных медиаторов в эпителиоцитах синтезируется ряд липидных (простагландины, тромбоксаны, лейкотриены) и белковых (хемокины, цитокины) медиаторов, вызывающих самоподдерживающийся оксидативный стресс, а отсюда патологический процесс, что и наблюдается у больных БА [15,16,17]. Поэтому вышеизложенное позволяет рассматривать недостаточную активность антиоксидантных ферментов (СОД, КАТ, ГП) у больных БА как одно из ключевых звеньев развития данного заболевания.

Учитывая последние сведения о том, что основным способом регуляции активности этих ферментов является не столько гормональная, сколько субстратная индукция, мы предположили, что регулярное умеренное усиление продукции активных форм кислорода повлечет за собой повышение активности антиоксидантных ферментов. Исходя из этого, мы применили с целью предупреждения обострений у больных БА в период ремиссии курс дозированной гипоксии с регулярным увеличением гипоксического периода. В связи с этим целью нашей работы явилось изучение влияния интервальной нормобарической гипокситерапии (ИНГ) на оксидантный статус больных БА и активность основных антиоксидантных ферментов: СОД, КАТ, ГП.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании приняли участие 30 больных БА, у всех заболевание средней степени тяжести в фазе ремиссии. Длительность заболевания 2-5 лет, без осложнений. Среди них было мужчин -10, женщин -20, средний возраст их составлял $43,4 \pm 0,55$ года. Исходно у всех больных отсутствовали признаки артериальной гипоксемии. В состоянии покоя насыщение крови кислородом - $S_aO_2 \geq 96\%$. Все больные получали по показаниям базисную терапию с использованием ингаляционных глюкокортикоидов, теофиллинов или β_2 -агонистов длительного действия. Контрольная группа состояла из 20 практически здоровых добровольцев (13 мужчин, 7 женщин) в возрасте от 25 до 45 лет ($40 \pm 1,4$ года).

Для характеристики функции внешнего ды-

КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

хания (ФВД,) на пневмотахопесспирографе "Spirolan" у больных определяли: форсированную жизненную емкость легких (ФЖЕЛ), объем форсированного выдоха за первую секунду (ОФВ₁), пиковую объемную скорость экспираторного потока (ПОС_{выд}) и максимальные объемные скоростные потоки выдоха на уровне 25%, 50%, 75% от ФЖЕЛ (МОС_{25%-75%}).

Больные прошли курс ИНГ с использованием установки Типоксикатор БИО-НОВА 204", 20 ежедневных сеансов, один сеанс - 6 циклов по 10 мин., один цикл - первые три дня - дыхание гипоксически-газовой смесью (10-12%) - 1 мин. (постепенное увеличение до 5 мин.) чередовалось с дыханием атмосферного воздуха - 9 мин. (постепенное уменьшение до 5 мин.), один цикл - в последующие дни - дыхание гипоксически-газовой смесью - 5 мин. чередовалось с дыханием атмосферного воздуха - 5 мин. На протяжении курса интервальной гипоксии не отмечалось случаев клинического ухудшения.

До курса ИНГ и после последнего сеанса в плазме крови у больных БА исследовали основные показатели оксидантно-антиоксидантного статуса организма. В плазме определяли общую прооксидантную активность (ОПА) по накоплению в модельной системе продуктов перекисного окисления ТВИН-80, реагирующих с ТБК, основную часть которых составляет, как известно, малонилдальдегид [18], а также тиобарбитурат-реактивные продукты (ТБРП), как конечный продукт перекисного окисления [19]. В эритроцитах определяли общую антиоксидантную активность (ОАА) по степени ингибирования Fe²⁺/аскорбат-индуцированного окисления ТВИН-80 гемолизатом [20], активность супероксиддисмутазы (СОД) по подавлению образования иитроформаза - продукта восстановления нитротетразолия синего супероксидом, образующимся при взаимодействии феназинметасульфата и НАДН [21], активность каталазы (КАТ) по подавлению окисления молибдата перекисью водорода [21] и активность глутатионпероксидазы (ГП) по убыли восстановленного глутатиона при его окислении под действием фермента гидроперекисью третичного бутила. Концентрацию восстановленного глутатиона определяли по поглощению тионитрофенольного аниона (ТНФА), образующегося при взаимодействии SH-групп глутатиона с 5,5-

дитио-бис-2-нитробензойной кислотой (ДТНБК) [22].

ОПА и ТБРП расценивали как показатели, характеризующие оксидантный статус, в частности, ОПА - показатель суммарной концентрации всех свободно-радикальных метаболитов, а ТБРП - конечные продукты свободно-радикального окисления, ОАА, СОД, КАТ и ГП - как показатели антиоксидантного статуса.

Статистический анализ данных произведен в Центре БИОСТАТИСТИКА (E-mail: point@stn.tomsk.ru).

Проверка гипотез нормальности распределения осуществлялась с использованием критерия Шапиро-Уилка. Большая часть признаков не подчиняется нормальному распределению. Сравнение трех групповых средних (контроль, группа больных БА до курса ИНГ, группа больных БА после курса ИНГ) проведена несколькими статистическими методами для получения более полной информации. Первый метод - классический однофакторный дисперсионный анализ, второй метод - непараметрический дисперсионный анализ Краскела-Уоллиса на ранговых метках Вилкоксона, третий - медианный критерий и четвертый метод - непараметрический аналог критерия Стьюдента - критерий Ван дер Вардена. Критический уровень значимости для всех статистических критериев принимался равным 5%.

При сравнении двух групп (группа больных БА до курса ИНГ, группа больных БА после курса ИНГ) также применялись методы у всех показателей, кроме ТБРП, достигнутый уровень значимости меньше 5%, поэтому принимается гипотеза о неравенстве, т.е. средние отличаются между собой статистически значимо. Выборочные средние представлены в виде $M \pm m$, где M - среднее, m - ошибка среднего. Также для исследуемых количественных по-

Таблица 1

Показатели функций внешнего дыхания у больных БА ($M \pm m$)

Показатели	Контрольная группа	Больные бронхиальной астмой
ФЖЕЛ, %	123,1±2,4	112,1±2,3
ОФВ ₁ , %	111,2±2,14	90,6±1,8
ПОС _{выд} , %	90,0±2,03	77,2±1,9
МОС _{75%}	92,7±2,4	89,3±3,6
МОС _{50%}	99,1±2,8	86,5±1,5
МОС _{25%}	101,3±3,5	79,7±3,1

ПРИМЕЧАНИЕ: средние отличаются между собой статистически значимо, так как достигнутый уровень значимости меньше 5%.

казателей были оценены коэффициенты непараметрической корреляции Спирмена.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные исследования показали, что у всех больных до курса ИНГ основные показатели ФВД (ФЖЕЛ, ОФВ, и ПОСвзд) не достигают уровня здоровых людей. При определении уровня бронхиальной обструкции найдено, что у всех больных статистически значимо снижены показатели, характеризующие

проходимость мелких (МОС_{25%}) и средних (МОС_{50%}) бронхов, тогда как крупные в патологический процесс вовлечены в гораздо меньшей степени, о чем свидетельствует незначительные изменения показателя МОС_{75%}. (табл.1). Это указывает на определенную степень скрытой обструкции на уровне средних и мелких бронхов у больных БА, что подтверждает хронический характер изучаемой патологии.

При исследовании основных показателей оксидантно-антиоксидантного статуса установлено, что у больных БА по сравнению со здоровыми людьми был значительно повышен уровень ОПА (рис.1) в плазме и почти в 1,7 раза увеличена концентрация ТБРП (рис.2). Ранее подобные результаты были получены и другими исследователями [23,24], что рассматривается как доказательство сохранения оксидативного стресса и в фазу ремиссии.

Из представленных данных на рис. 3 следует, что у больных БА ОАА в эритроцитах была существенно ниже, чем у здоровых субъектов, указывая на относительную недостаточность общей внутриклеточной антиоксидантной защиты в организме. В качестве основной причины недостаточности внутриклеточной антиоксидантной защиты у больных БА выступает выявленный дефицит активности всех трех основных антиоксидантных ферментов - СОД, КАТ и ГП, выраженность которого для каждого из ферментов мало отличается от степени снижения ОАА.

В результате интервальной гипоксии наступило улучшение основных показателей ФВД (ОФВ, и ПОС_{выл}), а также бронхиальной проходимости (МОС_{50к}, МОС_{25х}), хотя и статистически не значимое. Следует полагать, что определенная степень скрытой обструкции на уровне средних и мелких бронхов все же сохраняется.

При оценке показателей оксидантного статуса обнаружено, что после ИНГ прослеживается несущественное повышение в плазме ОПА (рис.1) и неизменный уровень ТБРП (рис.2). Особое внимание заслуживает повышение ОАА (рис.3), причем найдена прямая корреляция между изменением этого показателя - ΔОАА и ОПА до курса ИНГ ($r=0,47361, p=0,0082$) и обратная корреляция между ΔОАА и ОАА до курса ИНГ ($r=-0,40719, p=0,0255$). Также наблюдается статистически значимое возрастание активности основных внутриклеточных антиоксидантных ферментов, что, несомненно, вызвано воздействием интервальной гипоксии на системы биосинтеза антиоксидантных ферментов. Активность СОД увеличилась на 23% (рис. 4), ГП на 30,8% (рис. 5) и КАТ на 9% (рис.6) по сравнению с показателями до начала курса.

Рис.1
Влияние ИНГ на общую прооксидантную активность плазмы.

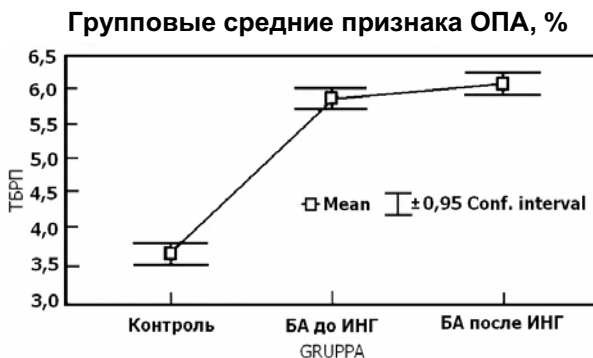


Рис.2
Влияние ИНГ на уровень тиобарбитуратреактивных продуктов плазмы.



Рис.3
Влияние ИНГ на общую антиоксидантную активность эритроцитов.

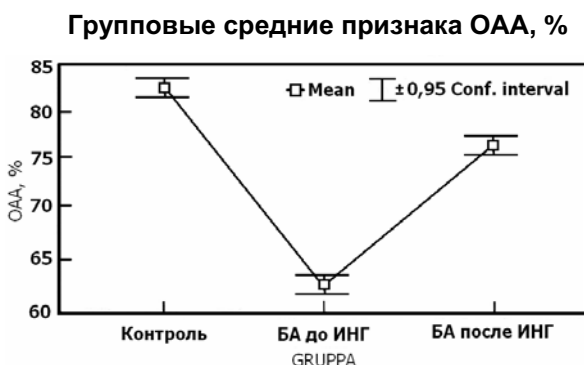


Рис.4
Влияние ИНГ на активность супероксид-дисмутазы эритроцитов.

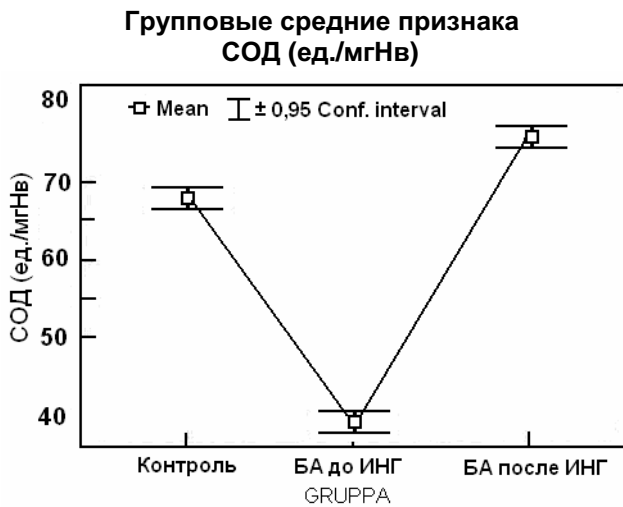


Рис.5
Влияние ИНГ на активность глутатионпероксидазы эритроцитов.

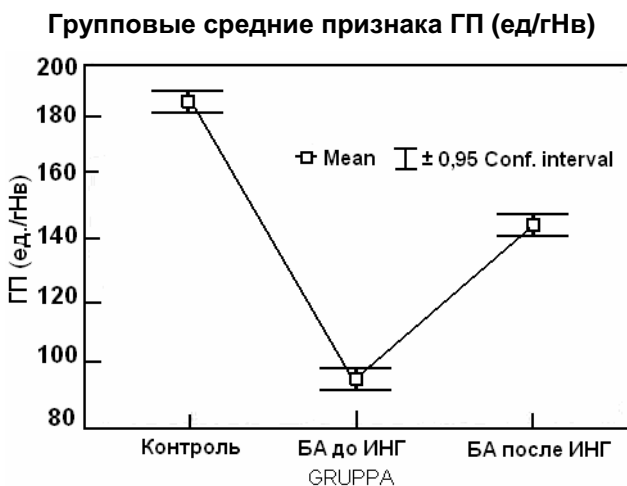
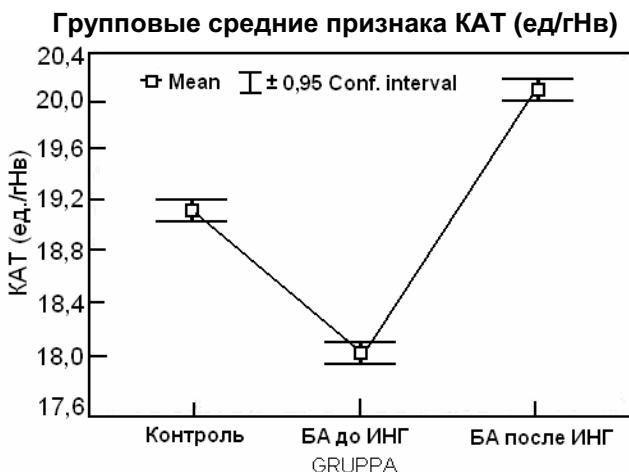


Рис.6
Влияние ИНГ на активность каталазы эритроцитов.



Эти изменения антиоксидантного статуса под воздействием ИНГ показывают, что активность КАТ изменилась в меньшей степени, чем остальные ферменты, однако обращают на себя внимание статистически значимые корреляции Δ КАТ (изменения активности КАТ под воздействием ИНГ) с 4-мя показателями, т.е. степень изменения КАТ после ИНГ зависит от этих 4 показателей: найдена прямая корреляция между Δ КАТ и активностью ГП как до курса ИНГ ($r=0,59975$, $p=0,0005$), так и после курса ИНГ ($r=0,62596$, $p=0,0002$), а также между Δ КАТ и активностью СОД до курса ИНГ ($r=0,43708$, $p=0,0157$) и обратная корреляция между Δ КАТ и СОД ($r=-0,39048$, $p=0,0329$).

Наблюдения за пациентами в течение двух месяцев показали, что в результате воздействия ИНГ у больных БА заметно уменьшилась частота проявлений симптомов астмы как в дневное, так и в ночное время, обострения меньше влияли на активность больного, а также наблюдалось увеличение периода ремиссии.

Таким образом, нами установлено, что ИНГ оказывала существенное влияние на системный оксидантно-антиоксидантный статус у больных БА, вызывая адаптивное повышение активности основных внутриклеточных антиоксидантных ферментов. Полученные данные позволяют заключить, что недостаточность основных внутриклеточных антиоксидантных ферментов СОД, КАТ, ГП может рассматриваться как одно из ключевых звеньев патогенеза БА. Также результаты исследования позволяют рассматривать курс ИНГ как эффективное профилактическое мероприятие, направленное на предупреждение обострения БА.

ЛИТЕРАТУРА

1. McFaden E.R., Gilbert I.A. Medical progress: Astma. N. // Engl. J. Med. 1992; 327: 1928-1937.
2. Гриппи М.А. Патологическая физиология легких. - М.: БИНОМ, 1997.-327 с.
3. Hoigate S.T. Biomarkers of astma // Lancet. 1998;351:9112.
4. Taylor A.J.N. Astma and allergy // BMJ. 1998; 316:997-999.
5. Gourgoulialis K., Iliodromitis Z., Hatziefthimiou A. et al. Epithelium-dependent regulation of airways smooth muscle function // Mediators Inflamm. 1998; 7: 6: 409-11.
6. Janssen Y., Soultanakis R., Steece K. et al. Depletion of nitric oxide causes cell cycle alterations, apoptosis, and oxidative stress in pulmonary cells// Am J Physiol., Lung. 1998; 275:11:1100-1109.
7. Yoshimasa Yoshida, Munecharu Maruyama, Tadashi Fujita et al. Reactive oxygen

- intermediates stimulate interleukin-6 production in human bronchial epithelial cells // *Am J Physiol., Lung.* 1999; 276: 6: 900-908.
8. Folkerts G., Nijkamp F. Airway epithelium: more than just a barrier! // *Trends Pharmacol Sci.* 1998; 19:8: 334-41.
9. Howarth P. Pathogenic mechanisms: a rational basis for treatment allergies // *BMJ* 1998; 316: 758-61.
10. Franco A.A., Odom R.S., Rando T.A. Regulation of antioxidant enzyme gene expression in response to oxidative stress and during differentiation of mouse skeletal muscle // *Free Radic. Biol. Med.* 1999; 27: 9-10: 1122-1132.
11. Зенков Н.К., Ланкин Е.Б., Меньшикова Е.Б. Окислительный стресс: Биохимический и патофизиологический аспекты. - М.: МАИК, 2001.-343 с.
12. Кореняк Н.А. Роль антиоксидантных энзимов в патогенезе бронхиальной астмы: Автореф. дис. ... канд. мед. наук: 16.12.99 / НИИ региональной патологии и патоморфологии. - Н-ск, 1999.- 19 с.
13. Rahman I., Morrison D., Donaldson K. et al. Systemic oxidative stress in asthma, COPD and smokers. // *J. Respir. Crit. Care Med.* 1996; 154: 1055-1060.
14. Fenech A.G., Ellul-Micallef R. Selenium, glutathione peroxidase and superoxide dismutase in maltese asthmatic patients: effect of glucocorticoid administration. // *Pulm. Pharmacol. Ther.* 1998; 11: 4: 301-308.
15. Watkins D., Garlepp M., Thompson P. Regulation of the inducible cyclooxygenase pathway in human cultured airway epithelial (A549) cells by nitric oxide. // *Br. J. Pharmacol.* 1997; 121:1482-1488.
16. Soloperto M., Mattoso V., Fasoli A. et al. A bronchial epithelial cell-derived factor in asthma that promotes eosinophil activation and survival as GM-CSf. // *Am J. Physiol.* 1991;260:530-538.
17. Barnes P., Chung K., Page C. Inflammatory Mediators of Asthma: An-Update. // *Pharm. Rev.* 1998;50:4:515-596.
18. Галактионова Л.П., Ельчанинова С.А., Варшавский Б.Я. Состояние перекисного окисления у больных с язвенной болезнью желудка и двенадцатиперстной кишки // *Клин. лаб. диаг.* 1998; 6:10-14.
19. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. - М.: Наука, 1972.
20. Благородов С. В., Шелепов А.П., Дмитриева Н.А. и др. Метод определения антиоксидантной активности и синтетические антиоксиданты в ряду производных оксазина и непредельных хлоркетонс // *Тезисы II* Всесоюзной конференции "Биоантиоксидант". - Черногоровка, 1986. - С.28-29.
21. Чевари С., Андял Т., Штрэнгер Я. Определение антиоксидантных параметров и их диагностическое значение в пожилом возрасте // *Лаб.дело.* 1991; 10: 11-13.
22. Моин В.М. Простой и специфический метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах. *Лаб.дело.* 1986; 12: 724-727.
23. Болевич С. И., Даниляк И.Г., Коган А.Х. и др. Роль свободнорадикальных процессов в патогенезе бронхиальной астмы // *Пульм.* 1995; 1:18-23.
24. Кокосов А.Н., Гольденберг Ю.М., Мищенко В.П. Перекисное окисление липидов и гемостаза на этапах формирования хронического бронхита и бронхиальной астмы // *Пульм.* 1995; 1:38-42.

INFLUENCE OF INTERVAL HYPOXIA ON THE OXIDANT-ANTIOXIDANT STATUS OF BRONCHIAL ASTHMA PATIENTS

L.P. Galaktionova, B.Ja. Varshavski, Ju.V. Korenovski

SUMMARY

The influence of an interval normobaric hypoxia (INH) on antioxidant enzymes activity was investigated in 30 patients with asthma. The patients in remission of disease were administered a 20-days course INH (12% O₂ hypoxic mixture breathing was followed by breathing with atmospheric air for 60 min per day). Before INH the patients showed increased total oxidant activity (TOA), concentration of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in blood plasma, and reduced activity of a superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) in erythrocytes versus corresponding parameters in the control group (20 volunteers without clinical symptoms of the pathology). After hypoxic training the enzymes activity increased (SOD to 23%; CAT-9 %; GPx-30,8 %). Monitoring of patients in following three months showed that INH resulted in the significant decrease of asthmatic attacks' frequency and increase of remission periods duration became possible. The findings of investigation showed that INH has significant influence on the systemic oxidant-antioxidant status of the patients with asthma and causes the adaptive activation of basic intracellular antioxidant enzymes.