УДК 616.24:577.121.7

ИЗМЕНЕНИЕ УРОВНЯ КАРБОНИЛИРОВАННЫХ БЕЛКОВ В ПЛАЗМЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ С ИНТЕРСТИЦИАЛЬНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ЛЕГКИХ

[1]Муравлёва Л.Е., [1]Молотов-Лучанский В.Б., [2]Бакенова Р.А., [1]Клюев Д.А., [1]Колебаева Г.Т.

[1]Государственный медицинский университет, Караганда, e-mail: muravlev@inbox.ru, vilen53@mail.ru, mythrandir79@mail.ru);
[2]Медицинский центр Управления делами Президента Республики Казахстан, Астана, e-mail: roza.bakenova@mail.ru

Проведено исследование карбонилированных производных белков в плазме крови больных с идиопатическим фиброзом легких (ИФЛ) и с идиопатической интерстициальной пневмонией (ИИП). В реакции с 2,4 динитрофенилгидразином определяли альдегиддинитрофенилгидразоны (АДНФГ) и кетондинитрофенилгидразоны (КДНФГ) нейтрального и основного характера. Полученные данные показали различную направленность изменения карбонилированных производных белков в плазме крови больных обеих групп. В плазме крови больных с ИФЛ зафиксировано статистически значимое увеличение АДНФГ и КДНФГ основного характера. В плазме крови больных ИИП наблюдалось достоверное снижение АДНФГ и КДНФГ основного и нейтрального характера. Высказано предположение о роли карбонилированных производных в развитии и прогрессировании легочного фиброза.

Ключевые слова: идиопатический фиброз легких, идиопатическая интерстициальная пневмония, плазма, карбонилированных производных белков

THE CHANGING OF CARBONYLATED PROTEINS LEVEL IN PLASMA OF PATIENTS WITH INTERSTITIAL LUNG DISEASE

[1]Muravluyova L.E., [1]Molotov-Luchanskiy V.B., [2]Bakenova R.B., [1]Kluyev D.A., [1]Kolebaeva G.T.

State Medical University, Karaganda, e-mail: muravlev@inbox.ru, vilen53@mail.ru, mythrandir79@mail.ru;
Medical Center of the Presidential Administration of the Republic of Kazakhstan, Astana, e-mail: roza.bakenova@mail.ru

The investigation of protein carbonyl derivates in plasma of patients with idiopathic lung fibrosis (ILF) and idiopathic interstitial pneumonia (IIP) was made. Aldehydedinitrophenylhydrazones (ADNPH) and ketonedinitrophenylhydrazones (KDNPH) of neutral and main types were measured using 2,4-dinitrophenylhydrazine. The results obtained demonstrated different tendency in protein carbonyl derivates alteration in plasma of patients of both groups. In patients plasma at ILF statistically significant increasing of ADNPH and KDNPH of main type observed. In plasma of patients with IIP statistically significant decreasing of ADNPH and KDNPH of neutral and main types were observed. It was supposed the role of protein carbonyl derivates in development and progression of fibrogenesis.

Keywords: Idiopathic lung fibrosis, Idiopathic interstitial pneumonia, plasma, protein carbonyl derivates

В настоящее время высказано предположение об участии окисленных белков в механизмах развития интерстициальных заболеваний легких [4]. Обнаружена аккумуляция окисленных белков (преимущественно гликированых) в альвеолярных макрофагах больных с диффузными болезнями легких и идиопатическим легочным фиброзом [6]. Установлено 2-4 кратное увеличение содержания окисленных белков в бронхоальвеолярном лаваже больных с идиопатическим легочным фиброзом [5]. Также в бронхоальвеолярном лаваже больных с идиопатическим легочным фиброзом обнаружено увеличение низкомолекулярных белков, чувствительных к карбонилированию [8].

В этой связи большой интерес приобретает сравнительное изучение карбонилированных производных белков в плазме крови больных с интерстициальными пневмониями и идиопатическим легочным фиброзом.

Было сформировано 2 группы больных: 15 пациентов с идиопатическим фиброзом легких (ИЛФ), 12 больных с идиопатической интерстициальной пневмонией (ИИП). Контролем служили 15 практически здоровых лиц. На проведение данного исследования получено разрешение Этического комитета Карагандинского государственного медицинского университета. Все обследуемые лица дали информированное согласие на участие в исследовании.

У больных с интерстициальными поражениями легких ведущим клиническим синдромом была одышка. 20% больных отметили постепенное нарастание одышки, у 39% больных отмечено острое начало, сопровождавшееся кашлем, более 6 лет назад.

При этом дебют расценивался ретроспективно как острый бронхит или острая очаговая пневмония с верификацией рентгенологической картиной заболевания. В дальнейшем у этих пациентов кашель уступал место одышке с медленным её прогрессированием по интенсивности и снижению толерантности к физической нагрузке. 12% пациентов, страдающих идиопатическим легочным фиброзом, отмечали нарастание одышки в течение трех последних лет. 29% больных отметили начало болезни с непродуктивного кашля, повышения температуры тела, болей в грудной клетки на фоне интенсивного кашля, отсутствие эффекта от лечения амброксолом, другими бронхолитическими и муколитическими средствами. В группе больных ИЛФ одышка носила доминантный и постоянный характер. В ряде случаев, по нашим наблюдениям, у пациентов более молодого возраста, она возникала внезапно и прогрессировала быстрее с нарастанием интенсивности. Частота дыхательных движений достигала 30–35 в одну минуту в период активизации процесса.

Клиническая картина ИЛФ характеризовалась кашлем у 100% больных, болями в грудной клетке, изменениями формы дистальных фаланг пальцев рук и ногтей по типу «барабанных палочек» и «часовых стекол».

В группе больных с идиопатической интерстициальной пневмонией наблюдалось персистирующее течение заболевания с периодами обострений и ремиссии. В противоположность группе ИЛФ средний возраст больных ИИП был меньше и составил 41,9 ± 14,4 лет. К моменту начала исследования курящих в группе ИИП не было. Но ранее 20,3% пациентов выкуривали от 3 до 25 сигарет в день. Стаж курения составлял от 6 месяцев до 15 лет. Перерыв в курении длился от 10 до 12 месяцев к моменту начала исследования.

Рентгенологическое исследование позволяло выявить пациентов с идиопатической интерстициальной пневмонией, поскольку использовался в качестве патогномоничного признака феномен «матового стекла», обнаруживаемого в нижних и средних зонах легкого. Диагноз идиопатического легочного фиброза был верифицирован морфологически (15% от общего числа пациентов): выявлено чередование зон нормального легкого, интерстициального воспаления, фиброза, пролиферации фибробластов, сотового легкого.

Лечение больных осуществлялось в соответствии со стадией заболевания, выраженностью дыхательной недостаточности. Пациентам с интерстициальными поражениями легких проводилась неспецифическая терапия антибиотиками и иммуносупрессивная терапия системными кортикостероидами. Пациенты выписаны из стационаров с различной степенью улучшения (37%) или стабилизации (51%) процесса. 12% больных отметили ухудшение или отсутствие положительного эффекта лечения.

Кровь отбирали из локтевой вены (3 мл) и стабилизировали гепарином. Плазму крови получали после центрифугирования при 3 тыс. об/мин. Карбонилированные производные определяли, используя метод Е. Дубининой и соавт. с 2,4-динитрофенилгидразином [1]. Образование стабильных аддуктов регистрировали при 4 длинах волн на спектрофотометре PD – 303 UV APEL (Япония). При 370 и 530 нм регистрировали альдегиддинитрофенилгидразоны (АДНФГ) нейтрального и основного характера. При 356 и 430 нм регистрировали кетондинитрофенилгидразоны (КДНФГ) нейтрального и основного характера. Результаты выражали в условных единицах/мл плазмы. Сравнение результатов исследования проводилось пациентами и управления проводилось с использованием критерия Mann-Whitney U-тест (для независимых переменных).

Результаты проведенного исследования приведены в таблице. У больных ИЛФ в плазме крови зафиксировано статистически значимое увеличение АДНФГ и КДНФГ основного характера (на 67% и в 2,4 раза соответственно) по сравнению с таковыми контроля. В тоже время не зафиксировано достоверных изменений аддуктов динитрофенилгидразонов нейтрального характера.

Аддукты динитрофенилгидразонов в плазме крови больных интерстициальными поражениями легких (на высоте клинических проявлений), X ± м

Группы	КДНФГ нейтрального характера, усл. ед/мл	АДНФГ нейтрального характера, усл. ед/мл	КДНФГ основного характера, усл. ед/мл	КДНФГ основного характера, усл. ед/мл
Контроль, *n* = 15	2,0 + 0,09	2,1 + 0,088	1,0 + 0,04	0,26 + 0,04
ИЛФ, *n* = 15	2,12 + 0,58	2,41 + 0,64	1,67 + 0,41*	0,64 + 0,025*
ИИП, *n* n = 12	0,61 + 0,11*#	0,66 + 0,13*#	0,4 + 0,14*#	0,12 + 0,05*#

Примечания * достоверность различий по сравнению с контролем, $p < 0,05$ и ниже; # достоверность различий по сравнению с ИЛФ, $p < 0,05$ и ниже.

В плазме крови больных ИИП обнаружено достоверное снижение АДНФГ и КДНФГ основного и нейтрального характера как по сравнению с таковыми контроля, так и больных с ИЛФ.

Полученные данные демонстрируют различные тенденции изменения карбонилированных производных белков в плазме крови больных с интерстициальными заболеваниями легких. Как уже указывалось, в плазме крови больных с ИЛФ возрастало содержание АДНФГ и КДНФГ основного характера. По нашему мнению, преимущественное образование карбонилированных производных связано с селективной чувствительностью белков к активным формам кислорода. Мы предполагаем, что основными мишенями являются альбумин, фибриноген и альфа-1-антитрипсин. Окислительное повреждение этих белков может индуцировать широкий диапазон метаболических и функциональных изменений. Так, окислительная модификация альфа-1-антитрипсина приводит к снижению его антипротеазной активности, но одновременно способствует приобретению нового свойства активации моноцитов [7]. Окисленная форма фибриногена приобретает аномальную способность индуцировать апоптоз эндотелиальных клеток посредством активации и адгезии тромбоцитов и лейкоцитов [2]. Окисленную форму фибриногена предлагается рассматривать как прокоагулянтный сигнал, участвующий в механизмах повреждения легких и фиброзообразования [3]. Это положение представляется очень важным в свете данных о снижение фибринолитической активности в BAL и легочной ткани больных с ILF [9, 4].

Альбумин является одним из компонентов общего антиоксидантного статуса организма. Альбумин существует в восстановленной и окисленной формах, причем доля окисленной формы белка увеличивается при ряде заболеваний [10].

Окисленные белки демонстрируют повышенную восприимчивость к агрегации и адсорбции на поверхности клеток крови. Эти процессы вызывают изменения метаболизма клеток крови, влияют их поведение в крови и нарушение реологических свойств крови. Мы полагаем, что все эти метаболические и функциональные расстройства также способствуют прогрессированию фиброза легких.

Следовательно, накопление карбонилированных аддуктов белка в плазме крови у пациентов с ИЛФ может быть одним из звеньев развития и прогрессирования заболевания.

В плазме больных с ИИП обнаруженное снижение карбонилированных аддуктов белков. По нашему мнению, это может быть связано с повышением протеолиза. Повышение активности протеаз может быть связано с массивным вовлечением лейкоцитов в патологическое состояние. В любом случае снижение карбонилирования не является хорошим событием, потому что карбонилирование играет важную роль в контроле качества белков.

Полученные результаты позволяют расширить наши представления о метаболических нарушениях при интерстициальных заболеваниях легких и предлагают новые цели для будущих исследований.

Список литературы

1. Дубинина Е.Е., Морозова М.Г., Леонова Н.В., Нуллер Ю.Л. и др. // Вопр. мед. химии. – 2000. – Т. 46, № 4. – С. 398–409.

2. Bombeli T. Adhesion of activated platelets to endothelial cells: evidence for a GPIIbIIIa-dependent bridging mechanism and novel roles for endothelial intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), alphavbeta3 integrin, and GPIbalpha / T. Bombeli, B.R. Scwartz, I.M. Harland // J Exp Med. – 1998. –Vol. 187. – P. 329–339.

3. Chambers R.C. Procoagulant signalling mechanisms in lung inflammation and fibrosis: novel opportunities for pharmacological intervention? // Br. J. Pharmacol. – 2008. – Vol. 153, Suppl 1. – P. 367–378.

4. Kinnula V.L., Fattman C.L., Tan R.J., Oury T.D. // American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. – 2005. – Vol.172. – P. 417–422.

5. Lenza A-G., Hinze-Heyna H., Schneidera A. et. al. // Respiratory Medicine. – 2004. – V. 98, №8. – P. 737–745.

6. Matsuse T., Ohga E., Teramoto S. et al. // *J Clin Pathol.* – 1998. – Vol. 51. – P. 515–519.

7. Moraga F., Janciauskiene S. Activation of primary human monocytes by the oxidized form of alpha1-antitrypsin // J Biol Chem. – 2000. – Vol. 275. – P. 7693–7700.

8. Rottoli P., Magi B., Cianti R. et al. // Cell and Molecular Biology. – 2005. – Vol 5, №10. – P. 2612–2618.

9. Strieter R.M. To Clot or Not to Clot, That Is the Question in Pulmonary Fibrosis // American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. – 2003. – Vol. 167. – P. 1589–1590.

10. Yamada N., Kubota K., Kawakami A., Suzuki E. et al. // Rinsho Byori. – 2008. – Vol. 56, №5. – P. 409–415.