

КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 577.15: 616.33. - 002.44

© Коллектив авторов

СИСТЕМА ГЛУТАТИОНА ЭРИТРОЦИТОВ И ПЛАЗМЫ ПРИ ЯЗВЕННОЙ БОЛЕЗНИ

В.И. Кулинский^{1}, А.В. Щербатых², А.А. Большешапов², В.И. Бахтаирова¹,
О.А. Булавинцева¹, И.Э. Егорова¹, А.И. Сулова¹, М.В. Ясько¹,
О.В. Колбасеева³, Л.К. Носкова³*

Кафедры биохимии ¹ и факультетской хирургии ² и ЦНИЛ ³ Иркутского государственного медицинского университета, 664047, Иркутск, а/я 85; тел.: (395)224-4261; эл. почта: kulinsky@pp.irkutsk.ru

Впервые проведено комплексное исследование системы глутатиона крови при язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки. При осложненной язвенной болезни и постгастрорезекционных синдромах в эритроцитах и плазме на фоне увеличения концентрации диеновых конъюгатов (во второй группе – и антиокислительной активности) основным изменением было резкое и одинаковое снижение активности глутатионпероксидазы. При неосложненной язвенной болезни резко возрастала активность глутатионредуктазы в эритроцитах и плазме и концентрация GSH в плазме. У оперированных, но практически здоровых пациентов, сохранялась сниженная активность глутатионпероксидазы в плазме, но концентрация GSH в плазме была резко повышена. Очевидно, при осложненном течении язвенной болезни функции системы глутатиона снижены. Активация этой системы и уменьшение или исчезновение оксидативного стресса сочетаются с благоприятным течением заболевания, особенно при неосложненной язвенной болезни.

Выявленные изменения значительно отличаются от функциональных сдвигов при вирусных гепатитах, заболеваниях желчевыводящей системы и инсультах.

Ключевые слова: система глутатиона, оксидативный стресс, язвенная болезнь.

ВВЕДЕНИЕ. Признано, что перекисное окисление липидов (ПОЛ) является важным фактором в развитии язвенной болезни [1-6]. Глутатион и ферменты его метаболизма выполняют важные и широкие антиоксидативные функции. Но изменения в системе глутатиона изучены меньше, чем другие антиоксиданты и ПОЛ, особенно в эритроцитах и плазме крови. Концентрация глутатиона (2-3 мкмоль/г) [7] и активность глутатионпероксидазы (ГПО) в слизистой двенадцатиперстной кишки и желудка довольно высоки и играют важную роль в поддержании целостности слизистой оболочки [8]. У больных гастритом [6] и язвенной болезнью уровень GSH [2, 4, 9] и активность ГПО [3, 6] в слизистой оболочке снижаются. Эти результаты воспроизведены в ряде различных экспериментальных моделей. Только в одной работе отмечено снижение как концентрации GSH в крови [10], так и активности ГПО в эритроцитах [1]. К сожалению, во всех работах были исследованы не более одного-двух показателей.

Цель нашей работы – комплексное исследование системы глутатиона эритроцитов и плазмы крови при язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки с одновременным определением восьми показателей в крови и частично в слизистой оболочке гастродуоденальной зоны.

МЕТОДИКА. Обследование пациентов включало сбор жалоб, анамнез, фиброэзофагогастродуоденоскопию, двухчасовую рН-метрию, рентгеновское и гистологическое исследования. Были выделены 4 группы больных: 1) осложнённая язвенная болезнь – 30 человек; 2) неосложненная язвенная болезнь – 10; 3) постгастрорезекционные синдромы – 37; 4) ранее оперированные, но практически

* - адресат для переписки

СИСТЕМА ГЛУТАТИОНА ЭРИТРОЦИТОВ И ПЛАЗМЫ ПРИ ЯЗВЕННОЙ БОЛЕЗНИ

здоровые пациенты – 15 человек. В группу контроля были включены практически здоровые с близким распределением по полу и возрасту, нормальными показателями ПОЛ и системы глутатиона. В сыворотке крови определяли продукты ПОЛ: диеновые конъюгаты (ДК) – по поглощению липидным экстрактом монохроматического излучения при 233 нм [11]; реактивные вещества теста с тиобарбитуровой кислотой (РВТБК (TBARS) – в реакции с тиобарбитуратом при 532 нм [12]. Антиоксидативную активность (АОА) определяли по торможению накопления тиобарбитурата в суспензии сыворотки крови с липопротеином желтка куриных яиц [13]. Для исследования системы глутатиона 4 мл крови брали утром натощак в пробирку с 50 мкл гепарина, эритроциты и плазму разделяли центрифугированием при 6000 об/мин на ЦПР в течение 15 мин. Эритроциты дважды промывали холодным 0,9% NaCl 1: 2 с центрифугированием при 8000 об/мин в течение 10 мин и лизировали ледяной дистиллированной водой 1: 3 (вес: объем) в течение 10 мин и центрифугировали 10 мин. при 8000 об/мин. Слизистую оболочку гастродуоденальной зоны сушили, взвешивали, гомогенизировали 1 : 4 в среде выделения (0,25 М сахараза, 0,01 М трис-HCl, 1 мМ ЭДТА, рН 7,5). Все процедуры проводили на холоду. В лизатах и плазме крови стандартными спектрофотометрическими методами, как описано ранее [14], определяли активность глутатионтрансферазы (ГТ) – по конъюгации GSH с 2,4-динитрохлорбензолом при 345 нм, глутатионредуктазы (ГР) – по убыли NADPH при восстановлении GSSG, 340 нм), ГПО – по убыли NADPH при 340 нм в сопряженной системе с ГР при восстановлении t-бутилгидропероксида, GSH – после осаждения белков 5% сульфосалициловой кислотой по реакции с 5,5'-дитиобис-(2-нитробензоатом) при 412 нм. Так как наиболее чувствительный тест Шапиро-Вилка [15] выявил значимые отклонения от нормального распределения, для статистического анализа количественных данных использовали непараметрический критерий U Манна-Уитни; проводили корреляционный анализ [16].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. При осложненной язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки резко увеличивалась концентрация диеновых конъюгатов в сыворотке (на 129%), при неосложненной изменений не было (табл. 1). Диеновые конъюгаты немного увеличивались (+35%) и в гомогенате слизистой оболочки гастродуоденальной зоны. В отличие от данных литературы, для этой зоны, в эритроцитах и плазме РВТБК и антиоксидативная активность не изменялись. При постгастрорезекционных синдромах значительно увеличивались диеновые конъюгаты (+77%) и антиоксидативная активность (+78%), а при сравнении с ранее оперированными, но практически здоровыми пациентами – концентрация РВТБК в гомогенате слизистой оболочки (+89%). Эти данные свидетельствуют об активации ПОЛ. Увеличивалась и антиоксидативная активность (+78%).

Таблица 1. Перекисное окисление липидов и антиоксидативная активность в крови при язвенной болезни до и после хирургического лечения.

Группы сравнения		ДК, мкмоль/мл	РВТБК, мкмоль/мл	АОА, услед
Контроль n = 15	Me	9,00	2,81	0,129
	Q ₂₅₋₇₅	(7,40-11,4)	(2,46-3,06)	(0,052-0,169)
ОЯБ n = 30	Me	20,58 ^a	2,63	0,179
	Q ₂₅₋₇₅	(16,6-23,3)	(2,09-3,05)	(0,122-0,263)
НЯБ n = 10	Me	8,72	3,26	0,206
	Q ₂₅₋₇₅	(4,91-14,9)	(2,77-3,67)	(0,087-0,277)
ПГРС n = 30	Me	15,9 ^b	2,88	0,230 ^a
	Q ₂₅₋₇₅	(12,00-17,7)	(2,47-3,50)	(0,088-0,451)
ОЗП n = 12	Me	9,49	2,30	0,184
	Q ₂₅₋₇₅	(8,72-11,8)	(2,11-2,90)	(0,129-0,284)

Обозначения: Здесь и в табл. 2 - ОЯБ - осложнённая язвенная болезнь, НЯБ - неосложнённая язвенная болезнь, ПГРС - постгастрорезекционные синдромы, ОЗП - ранее оперированные, но практически здоровые пациенты: а - p<0,05, б - p<0,01, в - p<0,001 - при сравнении с контролем.

На этом фоне в системе глутатиона происходило выраженное снижение активности ГПО в эритроцитах и плазме крови при осложненной язвенной болезни (соответственно на 66 и 75%) и постгастрорезекционных синдромах (на 61 и 68%) (табл. 2). Снижение активности ГПО в эритроцитах и плазме тесно коррелирует как при осложненной язве ($r = +0,67$, $p < 0,003$), так и при постгастрорезекционных синдромах ($r = +0,82$, $p < < 0,001$). Механизм избирательного ингибирования или репрессии ГПО неясен. Только два показателя изменялись различно: при постгастрорезекционных синдромах увеличивалась концентрация GSH в эритроцитах (+49%), при осложненной язвенной болезни значительно возрастала активность ГТ в слизистой оболочке гастродуоденальной зоны (+84%; изменения в этой зоне в таблицах и на рисунке не показаны). Очевидно, эта полезная реакция локальна, так как никаких изменений активности ГТ ни в эритроцитах, ни в плазме не было.

Таблица 2. Система глутатиона в крови при язвенной болезни до и после хирургического лечения.

Эритроциты					
Группы сравнения		GSH, мкмоль/мл	ГПО, нмоль/мин на 1 мг белка	ГТ, нмоль/мин на 1 мг белка	ГР, нмоль/мин на 1 мг белка
Контроль n = 15	Me	1,20	20,25	3,68	1,55
	Q ₂₅₋₇₅	(0,70-1,36)	(17,90-23,25)	(3,27-6,47)	(1,06-1,97)
ОЯБ n = 30	Me	1,37	6,91 ^a	3,76	1,55
	Q ₂₅₋₇₅	(1,20-1,71)	(4,07-21,12)	(2,85-4,84)	(1,11-2,86)
НЯБ n = 10	Me	1,34	21,49	3,24	3,06 ^b
	Q ₂₅₋₇₅	(1,17-1,60)	(8,09-33,80)	(2,92-4,07)	(2,09-4,09)
ПГРС n = 30	Me	1,79 ^a	7,94 ^a	3,19	1,61
	Q ₂₅₋₇₅	(1,52-1,97)	(4,07-21,12)	(1,81-4,74)	(1,13-1,87)
ОЭН n = 12	Me	1,43	22,70	3,81	1,94
	Q ₂₅₋₇₅	(1,17-1,60)	(10,0-33,1)	(3,50-6,50)	(1,21-2,34)
Плазма					
Группы сравнения		GSH, нмоль/мл	ГПО, нмоль/мин на 1 мг белка	ГТ, нмоль/мин на 1 мг белка	ГР, нмоль/мин на 1 мг белка
Контроль n = 15	Me	11,0	2,06	0,23	0,24
	Q ₂₅₋₇₅	(5,70-14,0)	(1,07-3,70)	(0,15-0,26)	(0,20-0,33)
ОЯБ n = 30	Me	11,7	0,51 ^b	0,28	0,40
	Q ₂₅₋₇₅	(11,0-17,7)	(0,23-0,84)	(0,18-0,48)	(0,17-0,73)
НЯБ n = 10	Me	20,0 ^a	0,73	0,27	0,45 ^b
	Q ₂₅₋₇₅	(1,10-3,70)	(0,51-2,19)	(0,21-0,89)	(0,41-0,55)
ПГРС n = 30	Me	11,7	0,66 ^b	0,22	0,27
	Q ₂₅₋₇₅	(11,0-22,8)	(0,32-1,95)	(0,11-0,35)	(0,12-0,84)
ОЭН n = 12	Me	23,0 ^a	0,78 ^a	0,18	0,34
	Q ₂₅₋₇₅	(11,0-29,0)	(0,46-1,75)	(0,12-0,27)	(0,24-0,39)

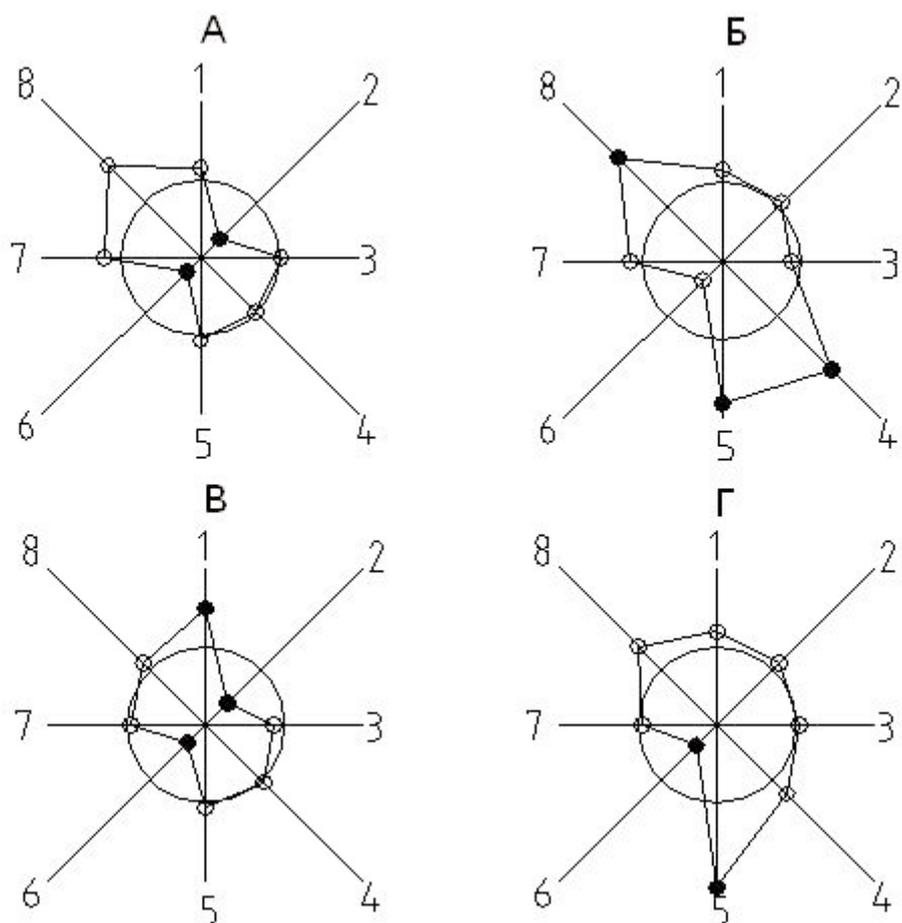


Рисунок.

Сдвиги в системе глутатиона в крови при язвенной болезни до и после хирургического лечения. Значения всех показателей в контроле приняты за 100% и изображены в виде радиуса окружности.

Изменения у больных (выражены в % к контролю) нарушают симметричность диаграммы: увеличение показателей выражается в виде "лучей", выступающих за пределы окружности, снижение показателей - в виде впадин.

Обозначения: А - осложненная язвенная болезнь, Б - неосложненная язвенная болезнь, В - постгастрорезекционные синдромы, Г - ранее оперированные, но практически здоровые пациенты. Пустые кружки - $p > 0,05$, черные - $p < 0,05$, 1-4 - эритроциты, 5-8 - плазма. 1,5- GSH, 2,6 - ГПО, 3,7 - ГТ, 4,8 - ГР.

Принципиально важно, что изменения в системе глутатиона при осложненной язвенной болезни и постгастрорезекционных синдромах очень близки – и не только одинаковым снижением ГПО, но и отсутствием большинства (шести из восьми при осложненной язвенной болезни и пяти при постгастрорезекционных синдромах) других возможных сдвигов в системе глутатиона. В целом биохимические проявления при этих тяжелых заболеваниях в значительной степени однотипны. Это может свидетельствовать о недостаточной эффективности комплексного лечения в группе с постгастрорезекционными синдромами.

При неосложненной язвенной болезни в эритроцитах и плазме резко возросла активность ГР (на 97 и 88%) и концентрация GSH в плазме (на 82%). Ни один из пяти других показателей в крови, включая активность ГПО, значимо не изменялся. В слизистой оболочке гастродуоденальной зоны меньше, но значимо (на 63%) увеличивалась активность ГТ. У ранее оперированных, но практически

здоровых пациентов в плазме сохранялось снижение активности ГПО (на 62%), но резко возростала концентрация GSH (на 109%). Перечисленные в этом абзаце изменения (кроме ГПО) благоприятны, так как ГТ обладает высокой антиоксидантной активностью, ГР восстанавливает окисленный глутатион (GSSG), а восстановленный глутатион (GSH) необходим как для неферментативного, так и особенно для ферментативного восстановления свободных радикалов и пероксидов.

Комплексные и наглядные иллюстрации выявленных сдвигов представлены на рисунке. Они позволяют "с первого взгляда" заметить как сходство, так и различия изменений при разных патологических состояниях. При наиболее тяжелых заболеваниях – осложнённой язвенной болезни и постгастрорезекционных синдромах происходило увеличение ПОЛ и снижение активности ГПО (рис. А и В). Из пяти значимых сдвигов в этих группах четыре неблагоприятны и только увеличение концентрации GSH при постгастрорезекционных синдромах можно считать потенциально компенсаторным изменением, но оно невелико (всего на 49%). В отличие от этого, при неосложненной язвенной болезни и у ранее оперированных, но практически здоровых пациентов (рис. Б и Г) неблагоприятно только одно изменение (снижение ГПО во второй группе), а благоприятных сдвигов четыре: аккумуляция GSH в плазме при неосложненной язве и у ранее оперированных, но практически здоровых пациентов, и активация ГР в эритроцитах и плазме при неосложнённой язве.

Отметим, что увеличение концентрации GSH в эритроцитах происходило только при постгастрорезекционных синдромах, а в плазме – только при двух более легких формах; увеличение активности ГР – только в эритроцитах и плазме при неосложненной язвенной болезни; увеличение активности ГТ наблюдалось только в гастродуоденальной зоне, но не в эритроцитах и плазме крови и только при осложненной или неосложненной язвенной болезни, но не при постгастрорезекционных синдромах. Это свидетельствует в пользу возможных различий реакций системы глутатиона при разных клинических вариантах язвенной болезни.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ. Таким образом, при осложненном течении язвенной болезни и постгастрорезекционных синдромах на фоне возрастания ПОЛ активность системы глутатиона снижена. Эти биохимические сдвиги уменьшают антиоксидантную защиту, что способствует развитию оксидативного стресса. Наоборот, в двух легких группах (особенно при неосложненной язвенной болезни) преобладает активация восстановительной системы глутатиона и нормализация ПОЛ. Это сочетается с благоприятным течением, особенно при неосложненной язве. Меньшее улучшение у ранее оперированных, но практически здоровых пациентов может быть связано с длительным течением заболевания и недостаточно эффективным хирургическим лечением в группе с постгастрорезекционными синдромами. Обнаружение при язвенной болезни выраженных изменений в системе глутатиона не только в гастродуоденальной зоне, но и в эритроцитах и плазме крови свидетельствует о генерализации патологического процесса. Исследование эритроцитов и плазмы – доступный и информативный метод оценки состояния системы глутатиона при язвенной болезни. Целесообразно испытать в комплексном лечении язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки целенаправленные воздействия на систему глутатиона.

Наши данные расширяют понимание биохимического патогенеза язвенной болезни и могут способствовать выявлению характера возникших нарушений, оценке их функционального значения. Обнаруженные нами изменения системы глутатиона при четырех различных заболеваниях (патологии желчевыделяющей системы [17], вирусных гепатитах [18], инсульте [19] и язвенной болезни) значительно отличаются друг от друга.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Manjari V., Das U.N.* (1998) Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids, **59**, 401-406.
2. *Santra A., Chowdhuri A., Chaudhuri S., Das Gupta J., Banerjee P.K., Mazumder D.N.* (2000) Ind. J. Gastroenterol., **19**, 21-23.
3. *Bhattacharjee M., Bhattacharjee S., Gupta A., Banerjee R.K.* (2002) Free Radic. Biol. Med., **32**, 731-743.
4. *Demir S., Yilmaz M., Koseoglu M., Akalin M., Aslan D., Audin A.* (2003) Turk. J. Gastroenterol., **14**, 39-43.
5. *Matthews G.M., Butler R.N.* (2005) Helicobacter, **10**, 298-306.
6. *Augusto A.C., Miguel F., Mendoca S., Pedrazzoli J. Jr., Gurgueira S.A.* (2007) Clin. Biochem., **40**, 615-622.
7. *Кулинский В.И., Колесниченко Л.С.* (1990) Успехи биологической химии, **31**, 157-179.
8. *Altinkaynak K., Suleyman H., Akcay F.* (2003) Pol. J. Pharmacol. **55**, 645-648.
9. *Savoie G., Miralles-Barrachina O., Dechelotte P., Belmonte-Zalar L., Brung-Lefebvre M., Zalar A., Hochain P., Herve S., Colin R., Lerebours E., Ducrotte P.* (2001) Eur. J. Gastroenterol. Hepatol., **13**, 1309-1313.
10. *Ataliev A.E., Mavlianov A.R., Pirnazarov R.A., Kholov Kh.A.* (2001) Lik. Sprava, №5-6, 55-57.
11. *Гаврилов В.Б., Гаврилова А.К., Хмара Р.Ф.* (1988) Лаб. дело, №2, 60-64.
12. *Гаврилов В.Б., Гаврилова А.Р., Мажуль Л.М.* (1987) Вопр. мед. химии, **33**(1), 118-122.
13. *Клебанов Г.И., Теселкин Ю.О., Бабенкова И.В., Любицкий О.Б., Владимиров Ю.А.* (1999) Вестн. РАМН, № 2, 15-22.
14. *Колесниченко Л.С., Кулинский В.И., Сотникова Г.В., Ковтун В.Ю.* (2003) Биохимия, **68**, 656-663.
15. *Реброва О.Ю.* (2002) Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ Statistica. М., Медиа-Сфера.
16. *Закс Л.* (1976) Статистическое оценивание. Статистика, М.
17. *Кулинский В.И., Леонова З.А., Козлова Н.М., Колесниченко Л.С.* (2006) Росс. журн. гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. **16**(3), 40-44.
18. *Кулинский В.И., Леонова З.А., Колесниченко Л.С., Малов Н.В., Данилов Ю.А.* (2007) Биомед. химия, **53**, 91-98.
19. *Колесниченко Л.С., Кулинский В.И., Шпрах В.В., Бардымов С.С., Верлан Н.В., Губина Л.П., Пенсионерова Г.А., Сергеева М.П., Станевич Л.М., Филиппова Г.Т.* (2007) Биомед.химия, **53**, 454-460.

Поступила: 09. 01. 2008.

THE ERYTHROCYTE AND PLASMA GLUTATHIONE SYSTEM UNDER PEPTIC ULCER

*V.I. Kulinsky¹, A.V. Shcherbatykh², A.A. Bolsheshapov², V.I. Bakhtairova¹, O.A. Bulavintseva¹,
I.E. Egorova¹, A.I. Suslova¹, M.V. Yasko¹, O.V. Kolbaseeva³, L.K. Noskova³*

Departments of Biochemistry ¹, Faculty Surgery ² and Central Laboratory, Irkutsk State Medical University ³, P.O. Box 85, Irkutsk, 664047 Russia; e-mail:kulinsky@pp.irkutsk.ru

In erythrocytes and blood plasma of patients with the complicated peptic ulcer and postresectional syndromes there was the increase of conjugated dienes (and in the second group the increase in antioxidant activity). Under these conditions the main change was the sharp and identical decrease in glutathione activity. In patients with uncomplicated peptic ulcer there was sharp increase in erythrocyte and plasma glutathione activity and plasma GSH. In operated but basically healthy patients plasma glutathione peroxidase remained decreased but plasma GSH sharply increased. Evidently complicated peptic ulcer is characterized by decreased functioning of the glutathione system. Activation of this system and the decrease or disappearance of manifestations of oxidative stress are associated with a favorable course of this disease, especially at uncomplicated peptic ulcer.

The revealed changes significantly differ from those observed in viral hepatitis, bile excretory treat diseases and strokes.

Key words: glutathione syste, oxidative stress, peptic ulcer.