

УДК 616.98:578.828.6-07:616.15-008.93
©Коллектив авторов

ИЗУЧЕНИЕ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ КРОВИ ПРИ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ

В.В. Костюшов^{1}, И.И. Бокал², С.А. Петров²*

¹Военно-медицинский клинический центр Южного региона, клиника лабораторной диагностики, Одесса, ул. Пироговская 2, 65044, Украина, ВМКЦ; тел.: 810380972467022; 810380487345183; эл. почта: Kostushov@mail.ru

²Одесский Национальный университет им. И. И. Мечникова

Установлено, что при ВИЧ-инфекции, наряду с активацией ПОЛ, происходят окислительная модификация липопротеиновых комплексов и подавление активности ферментов антиоксидантной системы сыворотки крови: супероксиддисмутазы (СОД), каталазы и глутатионпероксидазы (ГП). В этих условиях функцию антиоксидантной защиты принимает на себя глутатионредуктаза (ГР), активность которой была существенно повышена. Указанные выше нарушения наблюдаются на ранних стадиях заболевания – в периоде бессимптомного носительства ВИЧ, но были более выражены при манифестных формах СПИДа.

Ключевые слова: прооксиданты, антиоксиданты, оксидативный стресс, ВИЧ-инфекция, СПИД.

ВВЕДЕНИЕ. В последние годы в научной литературе стали появляться сообщения о нарушении окислительно-восстановительного гомеостаза у ВИЧ-инфицированных пациентов [1-3]. Отдельные авторы указывают, что при всех заболеваниях, определяющихся как синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД), имеет место один объединяющий фактор группы риска – оксидативный стресс (ОС) [1]. Установлено, что иммунное взаимодействие антиген-антитело, в том числе антигена ВИЧ с антителами ВИЧ *in vitro* сопровождается нарушением окислительно-восстановительного равновесия в белковой и небелковой тиолдисульфидной системе сыворотки крови [4-7].

* - адресат для переписки

АНТИОКСИДАНТНЫЕ ФЕРМЕНТЫ КРОВИ ПРИ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ

Причины таких нарушений в настоящее время не известны. Очевидно, механизмы этих изменений следует искать на уровне ферментов, участвующих в развитии оксидативного стресса, а также отвечающих за уровень сульфгидрильных и дисульфидных групп в клетке. Их анализ при ВИЧ-инфекции позволит уточнить характер антирадикальной защиты, особенности метаболизирования перекиси водорода, состояние систем детоксикации органических гидропероксидов и защиты мембранных структур клеток [8-10]. В клиническом аспекте такой анализ особенно актуален у пациентов с бессимптомным носительством ВИЧ и манифестными формами СПИД.

МЕТОДИКА. Исследовали сыворотки крови 30 больных ВИЧ-инфекцией в возрасте от 19 до 62 лет (из них мужчин – 22, женщин – 8). Обследованы две группы пациентов. В первую включены 10 человек с бессимптомным инфекционным статусом, вызванным ВИЧ (МКБ-10: класс болезней I, рубрика Z21). Эти пациенты не предъявляли жалобы на состояние здоровья, и носительство антител ВИЧ выявлено при плановом диспансерном обследовании. Во вторую группу вошли 20 пациентов с наличием СПИД-ассоциированного симптомокомплекса, вызванного ВИЧ и проявляющегося в виде инфекционных и паразитарных болезней (МКБ-10: класс болезней I, рубрика B20). Контрольную группу составили 16 практически здоровых доноров, сопоставимых с ВИЧ-инфицированными пациентами по возрасту.

Лабораторные исследования проводили в образцах сыворотки крови ВИЧ-инфицированных пациентов и доноров, полученной из венозной крови стандартными методами. В сыворотке крови осуществляли спектрофотометрическое исследование активности общих антиоксидантов (АО) и антиоксидантных ферментов: ГР, ГП, СОД и каталазы. Определение активности ГР, ГП, СОД, АО выполняли с использованием наборов фирмы “Randox”, согласно инструкции производителя.

Температура инкубационных сред при определении активности ГР, ГП, СОД и АО составила $37,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$.

Содержание общего белка определяли по методу Лоури. Об интенсивности ПОЛ судили по содержанию малонового диальдегида (МДА) в сыворотке крови, который определяли в реакции с тиобарбитуровой кислотой по концентрации ТБК-активных продуктов [12]. Об окислительной модификации липопротеиновых комплексов судили по изменению прочности связи липид-белок в липопротеиновых комплексах (ЛПК) сыворотки крови. Для этого определяли устойчивость ЛПК (УЛПК) как описано в работе [14].

Все измерения величин экстинкций растворов при проведении биохимических исследований проводили на биохимическом анализаторе Cobas Mira Plus (Австрия) и программируемом спектрофотометре RT-1904C (Китай).

Проверка полученных выборок на принадлежность к закону распределения Гаусса была осуществлена вычислением асимметрии и эксцесса (A_s и E_s). Вследствие соответствия выборок нормальному распределению, достоверность отличий между значениями показателей разных групп определяли по t-критерию Стьюдента. За уровень статистической значимости было принято $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. У практически здоровых лиц (доноров) за контрольные приняты следующие значения показателей: общие антиоксиданты – $1,59 \pm 0,23$ ммоль/л, активность ферментов противooksидательной защиты: СОД – $22,67 \pm 3,56$ у.е./г белка, каталазы – $27,22 \pm 5,85$ мкмоль/мин·г белка, ГП – $6,87 \pm 0,91$ мкмоль/мин·г белка, ГР – $19,25 \pm 2,08$ мкмоль/мин·г белка; количество общего белка – $83,73 \pm 1,31$ г/л, уровень МДА – $4,89 \pm 0,56$ мкмоль/л, устойчивость ЛПК – $61,75 \pm 10,65$ ДИ (таблица).

У пациентов с бессимптомным носительством ВИЧ и манифестными формами СПИД по сравнению с контролем обнаружены повышение уровня МДА, снижение содержания общего белка и устойчивости ЛПК (таблица).

Таблица. Показатели активности ферментов АОС, содержания белка, прочности липопротеиновых связей и содержания МДА в сыворотке крови при ВИЧ-инфекции.

Показатели	Доноры, n=16	Бессимптомное носительство ВИЧ, n=10	Манифестные формы СПИДа, n=20
Общий белок (г/л)	83,73±1,31	81,06±1,76	70,12±2,87
		$p_1 > 0,05; p_2 < 0,05$	$p_1 < 0,05$
УЛПК (ДИ)*	61,75±10,65	142,00±6,75	253,95±23,48
		$p_1 < 0,05; p_2 < 0,05$	$p_1 < 0,05$
МДА (мкмоль/л)	4,89±0,56	10,51±1,19	27,52±3,07
		$p_1 < 0,05; p_2 < 0,05$	$p_1 < 0,05$
Антиоксиданты общие (ммоль/л)	1,59±0,23	1,60±0,16	0,67±0,09
		$p_1 > 0,05; p_2 < 0,05$	$p_1 < 0,05$
СОД, у.е./г белка	22,67±3,56	18,95±2,48	10,02±3,14
		$p_1 > 0,05; p_2 < 0,05$	$p_1 < 0,05$
ГП, мкмоль/мин·г белка	6,87±0,91	4,77±0,67	1,53±0,29
		$p_1 < 0,05; p_2 < 0,05$	$p_1 < 0,05$
ГР, мкмоль/мин·г белка	19,25±2,08	23,25±1,90	42,48±6,01
		$p_1 > 0,05; p_2 < 0,05$	$p_1 < 0,05$
Каталаза мкат/л	27,22±5,85	26,37±3,03	10,41±2,31
		$p_1 > 0,05; p_2 < 0,05$	$p_1 < 0,05$

Примечание. Приведены средние арифметические и ошибка средней. p_1 - достоверность различий по сравнению с контрольной группой; p_2 - достоверность различий по сравнению с группой пациентов с манифестными формами СПИД; * - выражали в условных единицах оптической плотности - ДИ, причём, чем выше величина ДИ, тем более выражена дестабилизация прочности связи липид-белок в ЛПК.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что при ВИЧ-инфекции имеют место активация ПОЛ и накопление МДА – одного из токсичных продуктов пероксидного каскада. Обнаруженное при этом снижение содержания сывороточного белка и ослабление прочности липопротеиновых связей могут опосредоваться конформационными перестройками белковых макромолекул при их окислительной модификации и их разрушением. Такие процессы сопровождаются нарушением реакционной способности –SH групп апопротеина, играющих важную роль в механизме конъюгирования липидов с белками, что может приводить к ослаблению прочности липопротеиновых связей [15].

Нельзя также исключить, что ослабление прочности липопротеиновых связей может быть обусловлена окислительной модификацией не только белковой, но и липидной части комплексов, на что указывает резкое повышение в крови больных уровня МДА.

Следует заметить, что наиболее чувствительными к продуктам ПОЛ являются ферменты, принимающие участие в противooksидательной защите [16]. Хотя уровень общих антиоксидантов у пациентов с бессимптомным носительством ВИЧ не отличался от контроля, а у пациентов с манифестными формами СПИД, наоборот, существенно снижен (на 58%). Тем не менее, как при бессимптомном

АНТИОКСИДАНТНЫЕ ФЕРМЕНТЫ КРОВИ ПРИ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ

носителем ВИЧ, так и при манифестных формах СПИДа по сравнению с контрольной группой здоровых лиц обнаружена общая тенденция нарушения активности ферментов, принимающих участие в противоокислительной защите: снижение активности СОД, каталазы, ГП, и повышение активности ГР.

Судя по полученным нами данным, преобладание проокислительных реакций, а также лабораторные признаки окислительной модификации липопротеиновых комплексов наблюдаются уже на самых ранних стадиях заболевания – в периоде бессимптомного носительства ВИЧ. При манифестных формах СПИДа указанные нарушения были более выражены.

Нетрудно заметить, что ферменты противоокислительной защиты являются особым объектом повреждения при ВИЧ-инфекции, так как нарушение их активности косвенно свидетельствует о существенной перестройке режимов жизнедеятельности клеток, интенсивности метаболизма, активации и инактивации целого ряда биологически активных веществ, и тем самым оказывает влияние на те биохимические и физиологические процессы, которые зависят от этих преобразований [16]. К ним, в первую очередь, следует отнести повреждение клеток, обусловленное нарушением структурных и функциональных свойств биологических мембран, повышение их лабильности и проницаемости, разбалансирование мембранолокализованных тиолсодержащих ферментных систем и их экспорт в периферическую кровь, нарушение электротранспортных цепей митохондрий, разъединение окислительного фосфорилирования в митохондриях, ионный дисбаланс клетки, активация лизосомальных ферментов [17, 18]. Хорошо известно, что все эти процессы являются ведущими в патогенезе почти всех токсических эффектов, в том числе и их отдаленных последствий.

Немаловажная роль как в активации СРО и ПОЛ, так и в патогенезе нарушения активности ферментов противоокислительной защиты принадлежит самому вирусу иммунодефицита человека. Так, в предыдущих работах [5, 19] мы установили, что высоко специфическое иммунное взаимодействие антиген-антитело, в том числе и антигена ВИЧ с антителами ВИЧ *in vitro* сопровождается существенным нарушением тиол-дисульфидной окислительно-восстановительной системы. В процессе этих реакций обнаружено восстановление низкомолекулярных дисульфидов, как симметричных, так и смешанных, в результате чего происходит высвобождение низкомолекулярных тиолов (R-SH форм) [5].

С этими процессами могут быть связаны как активация СРО и ПОЛ, так и нарушение активности ферментов противоокислительной защиты при ВИЧ-инфекции. Во-первых, в основе пероксидных процессов лежат также и неферментативные окислительно-восстановительные реакции с участием восстановленных форм низкомолекулярных тиолов [20]. Следует иметь в виду, что низкомолекулярные тиолы осуществляют регуляцию свободнорадикальных процессов благодаря “парадоксальной” способности в зависимости от условий функционировать как про- и антиоксиданты [21]. Во-вторых, ферменты противоокислительной защиты, либо относятся к числу собственно тиоловых энзимов, либо нуждаются в присутствии тиолов для проявления каталитической активности (супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза и др.) [16, 17, 22-25]. В ходе катализируемых реакций эти ферменты активно используют свободные SH-группы глутатиона. Причём глутатион дополнительно расходуется в ходе окислительно-восстановительных реакций как поставщик SH-групп, которые защищают клетку от ОН-радикала и других АФК [17, 26].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Таким образом, установлено, что нарушение активности ферментов антиоксидантной системы крови играют важную роль в формировании оксидативного стресса при ВИЧ-инфекции. Активация ПОЛ при ВИЧ-инфекции сопровождается не только повышением концентрации одного из токсичных

продуктов перекисного каскада — МДА, но и окислительной модификацией липопротеиновых комплексов, а также подавлением активности ферментов антиоксидантной системы сыворотки крови (супероксиддисмутаза, каталаза и глутатионпероксидаза). В этих условиях функцию антиоксидантной защиты принимает на себя глутатионредуктаза, активность которой была существенно повышена.

Важно отметить, что повышение уровня МДА, наряду с окислительной модификацией липопротеиновых комплексов и нарушением активности ферментов антиоксидантной системы, наблюдаются на ранних стадиях заболевания – в периоде бессимптомного носительства ВИЧ, но были более выражены при манифестных формах СПИДа. Наличие указанных выше нарушений свидетельствует о молекулярном дисбалансе систем прооксиданты/антиоксиданты сыворотки крови, что следует учитывать при уточнении клинической стадии заболевания и в процессе выработки стратегии назначения антиоксидантов в их комплексном профилактическом и терапевтическом применении при ВИЧ-инфекции.

ВЫВОДЫ:

1. Установлено, что при ВИЧ-инфекции, наряду с повышением концентрации токсичного продукта перекисного каскада — МДА, происходит окислительная модификация липопротеиновых комплексов и подавление активности ферментов антиоксидантной системы: супероксиддисмутаза, каталаза и глутатионпероксидаза сыворотки крови.

2. Указанные нарушения появляются на ранних стадиях заболевания – в периоде бессимптомного носительства ВИЧ, но были более выражены при манифестных формах СПИДа, поэтому их следует учитывать при уточнении клинической стадии заболевания и обосновании назначения антиоксидантов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Huw C.* (1999) Index on Censorship, **28**(3), 73-78.
2. *Нагоев Б.С., Сабанчиева Ж.Х.* (2008) Клин. лабор. диагностика, №2, 52–53.
3. *Stewart G.* (1999) Index on Censorship, **28**(3), 68-72.
4. *Костюшов В.В.* (2002) Ж. акад мед. наук Украины, **8**(3), 472-486.
5. *Костюшов В.В., Тымчишин О.Л., Кутковец С.Л.* (2002) Укр. биохим. ж., **74**(1), 62-70.
6. *Костюшов В.В.* (2002) Клин. лабор. диагностика, №5, 48-51.
7. *Костюшов В.В.* (2003) Иммунология, **4**, 254-256 .
8. *Жаворонок Т.В., Степовая Е.А., Рязанцева Н.В., Петина Г.В., Соколов Е.Г., Стариков Ю.В., Дума М.А., Иванов В.В., Горемыкин К.В., Чудакова О.М.* (2006) Клин. лабор. диагностика, №12, 10–14.
9. *Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньшикова Е.Б.* (2001) Окислительный стресс: Биохимический и патофизиологический аспекты. – М.
10. *Alonso de Vega J.M., Diaz J., Serrano E., Carbonell L.F.* (2002) Crit. Care Med., **30**(8), 1782-1788.
11. *Перслегина И.А.* (1989) Лаб. дело, №11, 20-23.
12. *Аймазян Э.К., Костюшов Е.В., Джанашия М.М., Омелянюк Е.В.* (2001) Антиоксиданты в физиологических и патологических процессах жизнедеятельности организма. – СПб.: "Петрополис", 62 с.
13. *Гурин С.В.* (1999) Лаб. диагностика, №4, 45-46.
14. *Мандриевська Н.М.* (1997) Одеський медичний журнал, №1, 21-22.
15. *Соколовский В.В., Атянина Т.Ф., Сорокин А.И.* (1973) Докл. АН СССР, **209**(3), 738-740.
16. *Соколовский В.В.* (1996) Тиолдисульфидное соотношение крови как показатель состояния неспецифической резистентности организма. – СПб.: Медицинская академия последипломного образования, 30 с.

АНТИОКСИДАНТНЫЕ ФЕРМЕНТЫ КРОВИ ПРИ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ

17. Кулинский В.И., Колесниченко Л.С. (1990) Усп. биол. химии, **31**, 157-178.
18. Гончарук Е.Г., Коршун М.М. (2004) Журн. АМН України, **10**(1), 131-150.
19. Юрлова Л.В., Костюшова Н.В., Бокал І.І. (2006) Досягнення біології та медицини, **1**, 66-70.
20. Шевченко О.П., Олефиренко Г.А., Червякова Н.В. (2002), Гомоцистеин. – М.: Реафарм, 48 с.
21. Кения М.В., Лукаш А.И., Гуськов Е.П. (1993) Усп. совр. биологии, **113**(4), 456-470.
22. Кулинский В.И., Колесниченко Л.С. (1990) Усп. совр. биологии, **110**, 20-32.
23. Кулинский В.И., Колесниченко Л.С. (1993) Усп. совр. биологии, **113**(1), 107-121.
24. Кулинский В.И., Колесниченко Л.С. (2009) Биомед. химия, **55**, 255-277.
25. Кулинский В.И., Колесниченко Л.С. (2009) Биомед. химия, **55**, 365-379.
26. Костюшов В.В., Бокал И.И. (2010) Биомед. химия, **56**, 290-298.

Поступила: 11. 01. 2009.

STUDY OF ACTIVITY OF ENZYMES OF ANTIOXIDANT SYSTEM OF BLOOD AT HIV INFECTION

V.V. Kostyushov¹, I.I. Bokal², S.A. Petrov²

¹Military medical clinical center of South region, Military medical clinical center of South region, Clinic of laboratory diagnostics, Pirogovskaya street, 2, Odessa-44, 65044 Ukraine; tel.: 810380972467022; 810380487345183; e-mail: Kostushov@mail.ru

²Mechnikov Odessa National University

HIV infection is accompanied by activation of lipid peroxidation, oxidative modification of lipoprotein complexes, and a decrease in activity of antioxidant enzymes (superoxide dismutase (SOD), catalase and glutathione peroxidase (GP)) in blood serum. A significant increase of glutathione reductase observed under these conditions is considered as a function of the antioxidant defence. These changes were already seen at early (symptomless) stages of this disease, however, at manifested forms they were more pronounced.

Key words: pro- and antioxidants, oxidative stress, HIV, AIDS.