

DOI: 10.26693/jmbs03.06.129

УДК 616.216.1-002.2/3-078:577.152.34.088.6:612.015.11

Онищенко А. И.

ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС И МАТРИКСНАЯ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗА-9 ПРИ ОБОСТРЕНИИ ХРОНИЧЕСКОГО ГНОЙНОГО РИНОСИНУСИТА

Харьковский национальный медицинский университет, Украина

onishchenkoai@ukr.net

В данной работе исследовали уровни маркеров липидной пероксидации, в том числе 8-изопростана, ТБК-активных продуктов, диеновых конъюгатов, а также общую антиоксидантную активность сыворотки крови и концентрацию матриксной металлопротеиназы-9 (ММП-9) у пациентов с обострением хронического гнойного риносинусита. Установлено, что развитие заболевания сопровождается повышением сывороточного содержания маркеров перекисного окисления липидов – 8-изопростана, ТБК-активных продуктов, диеновых конъюгатов на фоне снижения общей антиоксидантной активности сыворотки крови. Подобный дисбаланс указывает на развитие нарушений редокс-состояния больных гнойным риносинуситом в виде окислительного стресса. Окислительный стресс рассматривается в качестве одного из факторов, действие которого привело к повышению содержания ММП-9 в сыворотке крови больных, обнаруженном в ходе проведения исследования. Увеличения содержания ММП-9 указывает на активацию процессов ремоделирования внеклеточного матрикса при хроническом гнойном риносинусите.

Ключевые слова: 8-изопростан, окислительный стресс, хронический гнойный риносинусит, матриксные металлопротеиназы.

Связь работы с научными программами, планами, темами. Результаты, представленные в статье, получены в ходе проведения НИР «Вивчення та моделювання гострих та хронічних патологічних процесів ЛОР-органів для підвищення ефективності їх лікування», № государственной регистрации 0116U004985.

Введение. Хронический риносинусит представляет собой распространенное воспалительное заболевание слизистой оболочки носа и параназальных синусов [1]. В клинической практике выделяют две основные формы хронического риносинусита – гнойная (ХГР) и полипозная (ХПР) [16]. Обе формы характеризуются нарушением локаль-

ных защитных механизмов, бактериальной колонизацией, повреждением эпителиального барьера слизистой оболочки носа и самоподдерживающимся циклическим воспалением, сопровождающимся ремоделированием тканей синоназального тракта [1, 16]. Известно, что критическую роль в процессах ремоделирования внеклеточного матрикса при воспалительных процессах играют цитокины, продукция которых претерпевает значительных изменений при обеих формах хронического риносинусита [14, 19, 21], и протеолитические ферменты – матриксные металлопротеиназы [5, 17]. В то же время известно, что экспрессия матриксных металлопротеиназ тесно коррелирует со степенью выраженности окислительного стресса [11], что обуславливает актуальность изучения особенностей состояния прооксидантно-антиоксидантной системы и активности матриксных металлопротеиназ у больных хроническими риносинуситами.

Целью работы явилась оценка содержания маркеров липидной пероксидации, в том числе 8-изопростана, ТБК-активных продуктов, диеновых конъюгатов, а также общей антиоксидантной активности сыворотки крови, и концентрации матриксной металлопротеиназы-9 (ММП-9) у пациентов с обострением хронического гнойного риносинусита.

Материалы и методы исследования. В исследовании приняли участие 20 больных ХГР в стадии обострения, лечившихся в Харьковской областной клинической больнице. Диагноз был подтвержден с использованием клинических, лабораторных и инструментальных методов в соответствии с критериями ВОЗ. Контрольная группа включала 20 относительно здоровых субъектов с искривлением носовой перегородки (n = 20). Пациенты с острыми или хроническими воспалительными заболеваниями, ожирением, опухолями и эндокринной патологией были исключены из исследования.

Все манипуляции проводились в соответствии с Хельсинской конвенцией и Конвенцией о защите

прав и достоинства человека в связи с применением достижений биологии и медицины (ЕТС 164). Каждый участник исследования подписывал письменное информированное согласие.

Общую антиоксидантную активности крови (АОА), содержание ТБК-активных продуктов и диеновых конъюгатов (ДК) в сыворотке крови определяли спектрофотометрически [4, 6, 8].

Концентрации ММП-9 и 8-изопростана в сыворотке крови пациентов с ХГР и представителей контрольной группы определяли с использованием ИФА-наборов фирмы «eBioscience» (Вена, Австрия) и «IBL-Hamburg GmbH» (Гамбург, Германия). Оптическую плотность растворов измеряли с использованием анализатора «Stat Fax 303 Plus» (США).

Статистический анализ проводился с использованием программного обеспечения «GraphPad Prism 5». Критерий Манна-Уитни использовался для сравнения двух независимых групп переменных. Численные значения представлены в виде медианы и межквартильного диапазона. Различия между группами считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение.

В ходе проведенного исследования установлено, что для развития ХГР характерно достоверное повышение содержания ТБК-активных продуктов в сыворотке крови. Схожий характер изменений концентрации в сыворотке крови при ХГР в стадии обострения наблюдается и для диеновых конъюгатов (ДК) (таблица). Поскольку ТБК-активные продукты и ДК представляют собой вторичные и конечные продукты перекисного окисления липидов (ПОЛ), которые образуются из нестабильных гидроперекисей, являющихся продуктом взаимодействия активных форм кислорода (АФК) с полиненасыщенными жирными кислотами, входящими в состав липидного бислоя мембран, повышение содержания вышеупомянутых показателей в сыворотке крови свидетельствует об активации процессов липидной перекисидации, повреждении целостности мембран клеток с их последующей гибелью

[7, 9]. Увеличение содержания маркеров липидной перекисидации в сыворотке крови указывает на выраженные нарушения интегрального редокс-состояния у больных ХГР.

Еще одним маркером активации ПОЛ и развития окислительного стресса, который по сравнению с другими подобными соединениями характеризуется высокой химической стабильностью и специфичностью, является 8-изопростан [2, 18, 20]. Вдобавок, содержание 8-изопростана в биологических жидкостях и тканях организма не зависит от количества потребляемых с пищей липидов. Известно, что 8-изопростан является ранним маркером активации перекисного окисления липидов и развития окислительного стресса и его повышение может быть обнаружено даже через несколько часов после воздействия триггера воспаления [3].

Анализ сывороточного уровня 8-изопростана показал, что у больных ХГР данный показатель превышает аналогичный в контрольной группе в 2,2 раза (таблица). Поскольку 8-изопростан образуется *in vivo* в результате неферментативного свободнорадикального окисления полиненасыщенной арахидоновой кислоты [12], повышение его содержания в сыворотке крови больных указывает на активацию свободнорадикальных процессов и ПОЛ.

При комплексном анализе содержания маркеров свободнорадикальных процессов (8-изопростан, ТБК-активные продукты и ДК) в сыворотке крови с целью оценки интегрального редокс-состояния больных ХГР в стадии обострения установлено, что при данном заболевании наблюдается высокая интенсивность процессов ПОЛ и свободнорадикальных процессов.

Известно, что АФК могут генерироваться в результате внеклеточных и внутриклеточных эффектов провоспалительных цитокинов или других медиаторов воспаления [13]. Кроме того, одним из источников генерации АФК при воспалении являются активированные нейтрофилы, продуцирующие АФК путем «окислительного взрыва» для борьбы с патогенными микроорганизмами. По-

Таблица – Параметры перекисного окисления липидов в сыворотке крови больных хроническим гнойным риносинуситом в стадии обострения (Ме [25%; 75%])

Группы	ТБК-активные продукты, мкМ/л	Диеновые конъюгаты, мкМ/л	8-изопростан, нг/мл	Общая антиоксидантная активность, ед/мл
Контрольная группа (n = 20)	3,72 [2,85; 4,27]	1,61 [1,47; 2,02]	2,16 [1,16; 2,78]	0,33 [0,30; 0,41]
Хронический гнойный риносинусит в стадии обострения (n = 20)	7,06 [5,48; 8,07] $p < 0,0001$	3,39 [2,33; 4,01] $p < 0,001$	4,84 [3,89; 6,67] $p < 0,0001$	0,20 [0,17; 0,25] $p < 0,01$

Примечания: n – количество больных; p – достоверность отличий по сравнению с контролем.

скільки ХГР характеризується наявністю нейтрофільного запалення, виявлені нами зміни можуть бути пояснені внеском нейтрофілів в патогенез гнійної форми хронічного риносинусита.

В організмі людини біологічні ефекти вільних радикалів контролюються антиоксидантною системою, яка включає ферментативні та неферментативні компоненти [13]. Ферментативне ланцюг включає супероксиддисмутазу, яка каталізує утворення перекису водню з супероксид-аніонів, яка в подальшому розпадається з утворенням кисню та води під дією каталази або селенозалежної глутатіонпероксидази. До неферментативних антиоксидантів відносять речовини, які мають здатність переривати вільнорадикальні ланцюгові реакції. Такими властивостями володіють вітаміни А, С, Е, глутатіон, урати, поліфеноли рослин, каротиноїди тощо [10, 15]. Для інтегральної та комплексної оцінки стану антиоксидантної системи цілком доцільно використовувати показники, що відображають стан обох компонентів антиоксидантної захисту. Одним з таких показників є загальна антиоксидантна активність крові (ОАО).

Встановлено, що при ХГР показник ОАО крові на 39,4% нижче порівняно з контрольною групою (таблиця). Подібні зміни ОАО вказують на недостатню активність антиоксидантної системи, яка не може компенсувати гіперпродукцію АФК та інтенсифікацію вільнорадикальних процесів в організмі хворих хронічним риносинуситом.

Таким чином, активація вільнорадикальних процесів на фоні зниження активності антиоксидантної системи у хворих ХГР в стадії обострення вказує на наявність порушень редокс-гомеостазу з розвитком окислювального стресу. Головною наслідком такої ситуації є пошкодження молекул в клітинах, зокрема нуклеїнових кислот, ліпідів та білків, що може мати серйозний вплив на життєздатність клітин або викликати різні клітинні реакції, які можуть призвести до смерті клітин шляхом некрозу або апоптозу.

Аналіз вмісту ММП-9 в сироватці крові хворих ХГР в стадії обострення продемонстрував достовірне ($p < 0,01$) підвищення концентрації досліджуваного показника, що вказує на важливу роль ММП-9 в процесах деградації колагену IV типу та ремоделювання внеклітинного матриксу при ХГР. В підвищення вмісту сировоточного ММП-9 може вносити внесок і окислювальний стрес (рис.).

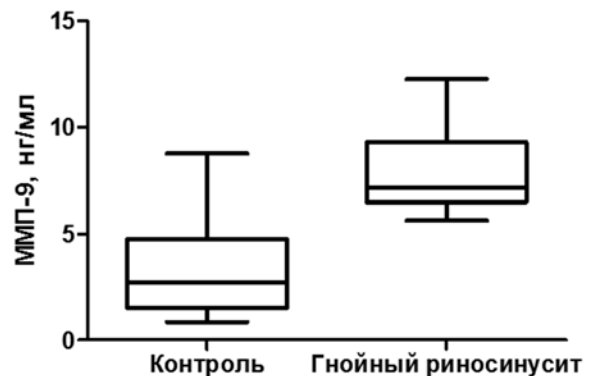


Рис. Вміст ММП-9 в сироватці крові хворих ХГР в стадії обострення

Висновки

1. Хронічний гнійний риносинусит в стадії обострення супроводжується підвищенням вмісту в сироватці крові хворих ТБК-активних продуктів, дієнових кон'югатів, 8-ізопростана на фоні зниження загальної антиоксидантної активності сироватки крові, що вказує на розвиток окислювального стресу.
2. Виявлене в ході дослідження підвищення вмісту ММП-9, обумовлене, зокрема, розвитком окислювального стресу, в сироватці крові пацієнтів з ХГР в стадії обострення вказує на активацію процесів ремоделювання внеклітинного матриксу.

Перспективи подальших досліджень.

Отримані дані обґрунтовують необхідність подальшого вивчення редокс-стану при хронічному гнійному риносинуситі та його впливу на процеси ремоделювання внеклітинного матриксу.

References

1. Böske R, Vlado E, Könecke M, Hüsing B, Linke R, Pries R, et al. Wnt Signaling in Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 2017; 56(5): 575-84. PMID: 28059551. PMID: PMC5449486. doi:10.1165/rcmb.2016-0024OC
2. Czerska M, Zieliński M, Gromadzińska J. Isoprostanes - A novel major group of oxidative stress markers. *Int J Occup Med Environ Health*. 2016; 29(2): 179-90. PMID: 26670350. doi: 10.13075/ijomh.1896.00596
3. Elfmark L, Ågren L, Akfur C, Buchta A, Jonasson S. 8-Isoprostane is an early biomarker for oxidative stress in chlorine-induced acute lung injury. *Toxicol Lett*. 2018; 282: 1-7. PMID: 29017959. doi: 10.1016/j.toxlet.2017.10.007

4. Fedorova TC, Korshunova TS, Larskaya ET. Reaction with TBA for the determination of MDA in blood by Fluorimetry. *Lab Aff.* 1983; 3: 25-8. [Russian]
5. Freitas-Rodríguez S, Folgueras AR, López-Otín C. The role of matrix metalloproteinases in aging: Tissue remodeling and beyond. *Biochim Biophys Acta.* 2017; 1864(11 Pt A): 2015-25. PMID: 28499917. doi: 10.1016/j.bbamcr. 2017.05.007.
6. Gavrillov BV, Mishkorudnaya MI. SF-metric determination of GPL in blood plasma. *Lab Aff.* 1983; 3: 33-6. [Russian]
7. Ignatenko VA, Lysenkova AV, Kalinin AL, Kazushchik AL. TBARS of lipid peroxidation in RBCs in US-field in the presence of ethanol. *Problems of Health and Ecology.* 2012; 4(34): 117-22. [Russian]
8. Klebanov GI, Teselkin YuO, Babenkova IV, Lyubitsky OB, Vladimirov Yu.A. Blood serum antioxidant activity. *Bulletin of RAMS.* 1999; 99(2): 15–22. [Russian]
9. Kolesnikova LI, Vlasov BJ, Kravtsova OB, Dolgikh MI, Natyaganova LV. The state of lipid peroxidation and antioxidant defense in female teenagers of various health groups. *Bulletin of RAMS.* 2014; 69(3-4): 50-4. [Russian]
10. Kurutas EB. The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state. *Nutrition Journal.* 2016; 15: 71. PMID: 27456681. PMCID: PMC4960740. doi:10.1186/s12937-016-0186-5
11. Lu Y, Wahl LM. Oxidative stress augments the production of matrix metalloproteinase-1, cyclooxygenase-2, and prostaglandin E2 through enhancement of NF-kappa B activity in lipopolysaccharide-activated human primary monocytes. *J Immunol.* 2005; 175(8): 5423-9. PMID: 16210649
12. Milatovic D, Montine TJ, Aschner M. Measurement of Isoprostanes as Markers of Oxidative Stress. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.).* 2011; 758: 195-204. PMID: 21815067. PMCID: PMC3277600. doi:10.1007/978-1-61779-170-3_13
13. Mrowicka M, Zielinska-Blizniewska H, Milonski J, Olszewski J, Majsterek I. Evaluation of oxidative DNA damage and antioxidant defense in patients with nasal polyps. *Redox Rep.* 2015; 20(4): 177-83. PMID: 25584923. doi:10.1179/1351000215Y.0000000001
14. Nakonechna O, Onishchenko A, Tkachenko A. Melatonin and some parameters of cell-mediated immune response in patients with chronic rhinosinusitis Without nasal polyps. *Inter Collegas.* 2017; 4(4): 183–7.
15. Nimse SB, Palb D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Adv.* 201; 5: 27986-28006. DOI: 10.1039/C4RA13315C
16. Oakley GM, Harvey RJ, Lund VJ. The Role of Macrolides in Chronic Rhinosinusitis (CRSsNP and CRSwNP). *Curr Allergy Asthma Rep.* 2017; 17(5): 30. PMID: 28429305. doi: 10.1007/s11882-017-0696-z
17. Onischenko AI, Nakonechna OA, Tkachenko AS, Kalashnik YuM. The content of MCP-1 and MMP-9 in blood serum of patients with chronic polypoid rhinosinusitis. *The Journal of VN Karazin Kharkiv National University. Series "Medicine".* 2017; 33: 23-6.
18. Psathakis K, Papatheodorou G, Plataki M, Panagou P, Loukides S, Siafakas NM, et al. 8-Isoprostane, a marker of oxidative stress, is increased in the expired breath condensate of patients with pulmonary sarcoidosis. *Chest.* 2004; 125(3): 1005-11. PMID: 15006961
19. Rai G, Ansari MA, Dar SA, Datt S, Gupta N, Sharma S, et al. Serum Cytokine Profile in Patients with Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyposis Infected by *Aspergillus flavus*. *Annals of Laboratory Medicine.* 2018; 38(2): 125-31. PMID: 29214756. PMCID: PMC5736671. doi:10.3343/alm.2018.38.2.125
20. Van't Erve TJ, Kadiiska MB, London SJ, Mason RP. Classifying oxidative stress by F2-isoprostane levels across human diseases: A meta-analysis. *Redox Biology.* 2017; 12: 582-99. doi:10.1016/j.redox.2017.03.024
21. Wang X, Zhang N, Bo M, Holtappels G, Zheng M, Lou H, et al. Diversity of TH cytokine profiles in patients with chronic rhinosinusitis: A multicenter study in Europe, Asia, and Oceania. *J Allergy Clin Immunol.* 2016; 138(5): 1344-53. PMID: 27544740. doi: 10.1016/j.jaci.2016.05.041

УДК 616.216.1-002.2/.3-078:577.152.34.088.6:612.015.11

ОКСИДАТИВНИЙ СТРЕС ТА МАТРИКСНА МЕТАЛЛОПРОТЕІНАЗА-9 ПРИ ЗАГОСТРЕННІ ХРОНІЧНОГО ГНІЙНОГО РИНОСИНУСИТУ

Онiщенко А. І.

Резюме. У даній роботі досліджували рівні маркерів ліпідної пероксидації, зокрема 8-ізопростан, ТБК-активні продукти, дієнові кон'югати, а також загальну антиоксидантну активність сироватки крові та концентрації ММП-9 у пацієнтів з загостренням хронічного гнійного риносинуситу. Встановлено, що розвиток захворювання супроводжується підвищенням сироваткового вмісту маркерів ліпідної пероксидації – 8-ізопростана, ТБК-активних продуктів, дієновими кон'югатів на фоні зниження загальної антиоксидантної активності сироватки крові. Подібний дисбаланс вказує на розвиток порушень редокс-стану хворих на гнійний риносинусит у вигляді окислювального стресу. Оксидативний стрес розглядається як один з факторів, дія якого призводить до підвищення вмісту ММП-9 у сироватці крові пацієнтів, що було виявлено у ході проведення дослідження. Збільшення вмісту ММП-9 вказує на активацію процесів ремоделювання позаклітинного матрикса при хронічному гнійному риносинуситі.

Ключові слова: 8-ізопростан, окислювальний стрес, хронічний гнійний риносинусит, матриксні металопротеїнази.

UDC 616.216.1-002.2/.3-078:577.152.34.088.6:612.015.11

Oxidative Stress and Matrix Metalloproteinase-9 in Exacerbation of Chronic Rhinosinusitis without Nasal Polyps**Onishchenko A. I.**

Abstract. Chronic rhinosinusitis is a persistent inflammation of the sinonasal mucosa, which morphologically can be subdivided depending on the presence or absence of polyps into two types: chronic rhinosinusitis with nasal polyps (CRSwNP) and chronic rhinosinusitis without nasal polyps (CRSSNP). Features of its pathogenesis are not yet fully elucidated.

The purpose of the research was to assess the blood serum levels of lipid peroxidation markers such as 8-isoprostane, thiobarbituric acid reactive substances (TBARs), conjugated dienes, blood serum total antioxidant status (TAS) and concentrations of MMP-9 in patients with CRSSNP.

Material and methods. Twenty individuals with CRSSNP treated at Kharkiv Regional Clinical Hospital were enrolled in our research. Diagnosis was verified using clinical, laboratory and instrumental methods in accordance with criteria provided by the WHO expert committee. Control group included twenty relatively healthy subjects with deviated nasal septum ($n = 20$). Patients with any sign of acute or chronic inflammatory diseases, obesity, tumors, and endocrine pathology were excluded.

All manipulations were carried out in accordance with *The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki)* and *Convention for the Protection of Human Rights and Dignity of the Human Being with regard to the Application of Biology and Medicine (ETC 164)*. Each patient and control subject signed a written informed consent.

Serum TAS and levels of TBA-reactive substances, conjugated dienes were determined by spectrophotometric method.

Concentrations of MMP-9 and 8-isoprostane in blood serum of both patients with CRSSNP and control individuals were determined using ELISA kits. Optical density of solutions was measured using *The Awareness Technology Stat Fax 303 Plus Microstrip Reader (USA)*.

Statistical analysis was carried out using *GraphPad Prism 5* software. Mann-Whitney U test was used to compare two independent groups of variables. Numerical values are represented as median and interquartile range. Difference between groups was considered statistically significant at $p < 0.05$.

Results and discussion. It was found that the development of the disease was accompanied by an increase in serum lipid peroxidation markers: 8-isoprostane, TBA-reactive substances, conjugated dienes on the background of a decrease in the serum total antioxidant status. Such imbalance indicates the development of disorders of the redox state of patients with CRSSNP in the form of oxidative stress. Oxidative stress is considered to be one of the factors that might lead to an increase in the serum level of MMP-9 in patients. Elevation of MMP-9 concentration indicates the activation of extracellular matrix remodeling processes in CRSSNP.

Conclusions. Exacerbation of CRSSNP is accompanied by the increase in serum levels of TBARs, conjugated dienes, 8-isoprostane on the background of the total blood serum antioxidant activity decrease. This indicates the development of oxidative stress. An increase in the content of MMP-9 in blood serum of patients with CRSSNP found in this study may be partially attributed to the development of oxidative stress and indicates the activation of extracellular matrix remodeling processes.

Keywords: 8-isoprostane, oxidative stress, chronic rhinosinusitis without nasal polyps, matrix metalloproteinases.

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of coauthors of the article.

Стаття надійшла 20.06.2018 р.

Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування