

© Коллектив авторов, 2016 г.
УДК [611.013.395:616-018.2]-092.19

Л. А. Александрова,
Н. А. Филиппова, Т. Ф. Субботина,
Е. С. Алексеевская, А. А. Жлоба,
В. И. Трофимов

ОЦЕНКА ПРОЯВЛЕНИЙ ОКИСЛИТЕЛЬНО-НИТРОЗИЛЬНОГО СТРЕССА ПРИ СИСТЕМНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ

Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова

Концепция патогенеза системных заболеваний соединительной ткани с поражением суставов (СЗСТПС) включает участие окислительного стресса (ОС) в повреждении клеток, обусловленном иммунным нарушением и воспалением. Особое внимание уделяется вопросам патогенетической роли активных форм кислорода (АФК) в развитии воспалительно-деструктивных процессов у больных ревматоидным артритом (РА) [9] и анкилозирующим спондилитом АС [11]. АФК, генерируемые моноцитами, полиморфноядерными нейтрофилами, синовиальными макрофагами, в биологических средах организма в условиях недостаточности эндогенной антиоксидантной системы (АОС) вызывают нарушения в соединительной ткани [8, 12]. Адгезия активированных нейтрофилов на поверхности эндотелиальных клеток, где происходит дегрануляция, может запускать процесс эндотелиальной дисфункции [8].

Важнейшим внутриклеточным регуляторным пептидом является восстановленный глутатион (GSH). Он входит в систему антиоксидантной защиты, предупреждения и ограничения ОС, а также играет ключевую роль в аутоиммунных процессах [1, 16]. Гомеостаз GSH в клетке поддерживается

согласованным действием глутатионпероксидазы (ГПО) и глутатионредуктазы (ГР). ГПО использует GSH в качестве косубстрата для восстановления гидроперекиси и липопероксидов. Основная функция ГР состоит в восстановлении окисленного глутатиона до сульфгидрильной формы GSH. Наряду с супероксиддисмутазой (СОД), инактивирующей избыточные супероксидные радикалы, ГПО и ГР входят в систему ферментативной АОС.

Внутриклеточный GSH является основным акцептором молекул оксида азота (NO) и, депонируя их в клетке в виде S-нитрозоглутатиона [3], поддерживает его внутриклеточный пул. В качестве межклеточного и внутриклеточного мессенджера NO вовлечен в регуляцию метаболических реакций, обеспечивающих жизнеспособность и функциональную активность клеток и всего организма в целом, но при определенных условиях участвует в протекании патологических процессов [3, 12]. Отмечено его влияние на развитие иммунного воспаления при РА путем селективной стимуляции пролиферации Th1-клеток и индукцию костной резорбции [14].

Некоторые полиморфные варианты (4a/4b) гена эндотелиальной NOS рассматривают как факторы риска иммунологических сдвигов при РА [4]. Прогрессирование воспалительного процесса в ответ на гипоксию в синовиальных клетках связывают с индукцией NOS НАДФН-оксидазой [6].

В литературе роль показателей ОС в качестве маркеров развития СЗСТПС оценена неоднозначно [17, 18], а взаимосвязь ОС с нитрозильным стрессом (НС) мало изучена. Вовлечение АФК в патогенез РА и АС делает важным поиск маркеров свободно-радикального окисления и особенно состояния АОС при этих заболеваниях. **Целью** исследования являлось изучение взаимосвязи метаболизма глутатиона эритроцитов с метаболизмом NO в плазме крови при СЗСТПС.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Были обследованы 64 пациента с СЗСТПС (табл. 1), получавших стационарное лечение в клинике госпитальной терапии ПСПбГМУ им. акад. И. П. Павлова с сентября 2013 по май 2015 г. Группу сравнения составили 45 здоровых лиц. Для определения активности процесса рассчитывали индексы DAS28 для больных РА и BASDAI для больных АС. Ревматоидный фактор, определяемый нефелометрическим методом на приборе Immage, выявлен у 63 % больных РА. Определение СОЭ проводили методом Панченкова. Концентрацию С-реактивного белка определяли высокочув-

Таблица 1

| Клиническая характеристика обследованных лиц | | | |
|--|---------------------|--------------------------|--------|
| Показатель | Ревматоидный артрит | Анкилозирующий спондилит | Доноры |
| N | 48 | 10 | 45 |
| Возраст, лет | 56,0 (47,2–68) | 39,8 (31–43,5) | 48 |
| Мужчин/женщин | 13/35 | 8/2 | 14/31 |
| Длительность заболевания, лет | 8,5 (3,7–24) | 13,9 (5,0–23,0) | |
| СРБ, мг/л | 16,9 (3,4–24,3) | 29,7 (11,8–69,5) | <2,6 |
| СОЭ, мм/ч | 26,0 (15,5–37,0) | 40,1 (28,2–60,0) | <10 |
| Низкая активность РА DAS28 (2,6–3,2) | 2,75 (2,55–2,9) | | <2,6 |
| Средняя активность РА DAS28 (3,2–5,1) | 4,04 (3,79–4,45) | | |
| Высокая активность РА DAS28 (>5,1) | 6,25 (5,6–6,9) | | |
| BASDAI | | 47,3 (34,1–59,5) | <40 |

ствительным иммунотурбидиметрическим методом.

Во всех случаях имелось информированное согласие обследуемых на анонимное использование полученных данных, а протокол исследования был одобрен Этическим комитетом.

Эритроциты образцов крови, стабилизированной цитратом натрия, отмывали дважды холодным физиологическим раствором, замораживали и хранили в морозильной камере при -82°C до проведения анализа. В 10 % гемолизатах проводили [2] определение активности ферментов ГПО, ГР, СОД и содержание GSH. Концентрацию гемоглобина измеряли гемоглобинцианидным методом, используя наборы реагентов фирмы «Синтакон» (Россия). Концентрацию высших окислов азота (NOx) в плазме крови измеряли спектрофотометрическим методом, основанным на реакции Грисса, с использованием рекомбинантной нитратредуктазы в качестве восстановителя нитратов [21].

Статистический анализ полученных данных проводили с помощью программы «SPSS 15.0 for Windows». Результаты представляли в виде медианы и межквартильного размаха М (Q1-Q3). Непараметрический критерий Манна – Уитни для независимых выборок использовали для проверки гипотезы о различии выборок. При $p < 0,05$ различия между выборками считались достоверными. Для оценки корреляционных связей использовали ранговый коэффициент корреляции Спирмена.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Как видно из данных табл. 2, у всех больных с СЗСТПС наблюдались признаки окислительного и нитрозильного стресса, выразившиеся в угнетении метаболизма глутатиона при значительном снижении уровня основного клеточного антиоксиданта GSH и активности антиоксидантных ферментов ГПО, ГР и СОД в эритроцитах на фоне увеличенной концентрации NOx в плазме крови.

Выявленные отрицательные корреляции между NOx в плазме крови и уровнем GSH в эритроцитах при РА ($R = -0,450$; $p = 0,036$); между активностью ГПО и уровнем NOx ($R = -0,900$; $p = 0,037$) при АС, а также между GSH и NOx ($R = -0,524$; $p = 0,002$) в общей группе больных СЗСТ подтверждают данные о взаимосвязи между ОС и НС у больных СЗСТ [15] и суждение о возможной патогенетической роли недостаточности АОС [13]. Оксид азота включен в механизмы неспецифического иммунитета и в комплексный механизм тканевого повреждения

Таблица 2

Содержание GSH, активность ГПО, ГР и СОД в эритроцитах и концентрация NOx в плазме крови у больных с СЗСТПС и здоровых людей

| Диагноз | GSH, мкмоль/г Hb | ГПО, ед/г Hb | ГР, ед/г Hb | СОД, ед/г Hb | NOx, мкмоль/л |
|-----------------------------------|----------------------|---------------------|----------------------|----------------------|---------------------|
| Ревматоидный артрит (N = 48) | 1,98* (1,60–2,47) | 7,7* (5,7–10,9) | 0,9* (0,6–1,2) | 11,9* (6,8–16,7) | 10,8* (6,1–17,9) |
| Анкилозирующий спондилит (N = 10) | 1,59* (1,38–1,66) | 10,8* (6,9–14,8) | 0,61* (0,55–1,19) | 12,72* (5,5–14,5) | 14,1* (5,3–28,0) |
| Доноры (N = 45) | 2,80 (2,30–3,30) | 13,6 (10,6–16,9) | 1,38 (1,18–1,93) | 23,50 (19,2–31,0) | 8,9 (6,3–11,6) |

* – $p < 0,05$ статистическая значимость различий между показателями группы больных с группой доноров.

через модуляцию воспалительного процесса и апоптоза [4, 7, 12]. На ранней фазе воспалительной реакции, при усилении генерации гистамина, брадикинина, простагландинов и лейкотриенов, активируется эндотелиальная NOS, а на поздней фазе воспаления происходит усиление генерации NO, в основном макрофагальной индуцибельной NOS [10]. Нарушение функции эндотелия приводит к недостаточному образованию оксида азота или к его инактивации, в особенности супероксидными радикалами, с образованием токсичного пероксинитрита [13].

Менее отчетливой оказалась связь с выраженностью воспалительного процесса, что соответствует неоднозначным данным, полученным другими исследователями [7, 19, 20]. Так, в исследованиях [7, 20] не выявлены корреляции между уровнем NOx в сыворотке крови и клинико-лабораторными параметрами активности РА. По данным [10], NOx плазмы крови является одним из маркеров эффективности лечения препаратом инфликсимаб, что предполагает участие NO в генезе воспалительного процесса у больных РА.

В нашем исследовании корреляции уровня NOx с активностью процесса по шкале DAS28 и BASDAI не обнаружены, что согласуется с результатами исследования J. W. Choi [7]. Однако уровень NOx в плазме в общей группе больных СЗСТПС коррелировал с показателем СОЭ ($R = 0,373$; $p = 0,025$).

ВЫВОДЫ

1. При СЗСТПС, у больных как с РА, так и АС, выявлен нитрозильный стресс с повышенным уровнем NOx в плазме крови.

2. В организме больных СЗСТПС установлен низкий антиоксидантный статус организма, который является возможным фактором риска развития СЗСТПС.

3. Обнаружена взаимосвязь уровня NOx в плазме крови с метаболизмом глутатиона в эритроцитах, наиболее выраженная у больных АС.

4. Выявленные нарушения метаболизма глутатиона и оксида азота при СЗСТПС, по-видимому, напрямую не связаны со степенью активности процесса и серопозитивностью.

ЛИТЕРАТУРА

1. Александрова Л. А., Жлоба А. А., Алексеевская Е. С. Окислительный стресс при активации внутрисосудистого свертывания и фибринолиза // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. — 2014. — Т. 13. — № 1. — С. 79–82.
2. Александрова Л. А., Миронова Ж. А., Агафонова Ю. И. и др. Состояние системы глутатиона в эритроцитах у пациентов с пароксизмальной ночной гемоглобинурией // Региональное кровообращение и микроциркуляция. — 2015. — № 4 (56). — С. 60–65.
3. Каминская Л. Ю., Жлоба А. А., Александрова Л. А. и др. Влияние донатора NO нитрозогиола глутатиона на уровень окислов азота и малонового диальдегида в крови крыс // Артериальная гипертензия. — 2005. — Т. 11. — № 1. — С. 5–9.
4. AlFadhli S. Influence of endothelial nitric oxide synthase gene intron-4 27bp repeat polymorphism on its expression in autoimmune diseases // Dis Markers. — 2013. — Vol. 34. — №5. — P. 349–356.
5. Ben Mansour R., Lassoued S., Gargouri B. et al. Increased levels of autoantibodies against catalase and superoxide dismutase associated with oxidative stress in patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus // Scandinavian Journal of Rheumatology. — 2008. — Vol. 37. — № 2. — P. 103–108.
6. Chenevier-Gobeaux C., Simonneau C., Therond P. et al. Implication of cytosolic phospholipase A2 (cPLA2) in the regulation of human synovial NADPH oxidase (Nox2) activity // Life Sci. — 2007. — Vol. 81. — № 13. — P. 1050–1058.
7. Choi J. W. Nitric oxide production is increased in patients with rheumatoid arthritis but does not correlate with laboratory parameters of disease activity // Clin Chim. Acta. — 2003. — Vol. 336. — P. 83–87.
8. Falk R. J., Terrell R. S., Charles L. A., Jennette J. C. Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies induce neutrophils to degranulate and produce oxygen radicals *in vitro* // Proc. Natl. Acad. Sci USA. — 1990. — Vol. 87. — P. 4115–4119.
9. Garacia-Gonzalez A., Gaxiola-Robles R., Zenteno-Savin T. Oxidative stress in patients with rheumatoid arthritis // Rev. Invest. Clin. — 2015. — Vol. 67. — P. 46–53.
10. Gonzalez-Gay M. A., Garcia-Unzueta M. T., Berja A. et al. Short-term effect of anti-TNF-alpha therapy on nitric oxide production in patients with severe rheumatoid arthritis // Clin. Exp. Rheumatol. — 2009. — Vol. 27. — № 3. — P. 452–458.
11. Karakoc M., Altindag O., Keles H. et al. Serum oxidative-antioxidative status in patients with ankylosing spondylitis // Rheumatol. Int. — 2007. — Vol. 27. — P. 1131–1134.
12. Martinon F. Signaling by ROS drives inflammasome activation // Eur. J. Immunol. — 2010. — Vol. 40. — P. 616–619.
13. McInnes I. B., Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis // N. Engl. J. Med. — 2011. — Vol. 365. — P. 2205–2219.
14. Nagy G., Koncz A., Telarico T. et al. Central role of nitric oxide in the pathogenesis of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus // Arthritis. Res. Ther. — 2010. — Vol. 12. — №3. — P. 210–216.
15. Ozgocmen S., Sogut S., Ardicoglu O. Serum nitric oxide, catalase, superoxide dismutase, and malondialdehyde status in patients with ankylosing spondylitis // Rheumatol. Int. — 2004. — Vol. 24. — P. 80–83. Doi 10.1007/s00296-003-0335-y.
16. Perricone C., Carolis C. D., Perricone R. Glutathione: A key player in autoimmunity // Autoimmunity Reviews. — 2009. — Vol. 8. — P. 697–701.
17. Stanek A., Cholewka A., Wielkoszynski T. et al. Increase in oxidative stress in patients with ankylosing spondylitis // Eur. J. Clin. Invest. — 2013. — Vol. 43 (SI). — P. 87.
18. Taysi S., Polat F., Gul M. et al. Lipid peroxidation, some extracellular antioxidants, and antioxidant enzymes in serum of patients with rheumatoid arthritis // Rheumatol. Int. — 2002. — № 21. — P. 200–204.
19. Veselinovic M., Barudic N., Vuletic M. et al. Oxidative stress in rheumatoid arthritis patients: relationship to diseases activity // Mol. Cell. Biochem. — 2014. — Vol. 391. — № 1. — 2. — P. 225–232.
20. Weinberg J. B., Lang T., Wilkinson W. E. et al. Serum, urinary, and salivary nitric oxide in rheumatoid arthritis: complexities of interpreting nitric oxide measures // Arthritis. Res. Ther. — 2006. — Vol. 8. — №5. — P. 140–145.
21. Zhloba A. A., Subbotina T. F., Alekseevskaya E. S. et al. The level of circulating PGC16 in cardiovascular diseases // Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry. — 2015. — Vol. 9. — № 2. — P. 143–150.

РЕЗЮМЕ

Л. А. Александрова, Н. А. Филиппова, Т. Ф. Субботина, Е. С. Алексеевская, А. А. Жлоба, В. И. Трофимов

Оценка проявлений окислительно-нитрозильного стресса при системных заболеваниях соединительной ткани

У больных системными заболеваниями соединительной ткани с поражением суставов (ревматическим артритом и анкилозирующим спондилитом) выявлен сниженный антиоксидантный статус с низкой активностью супероксиддисмутазы, глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы эритроцитов при низком уровне восстановленной формы глутатиона на фоне повышенного уровня NOx в плазме крови. Выявленные нарушения не коррелировали с активностью процесса и серопозитивностью.

Ключевые слова: ревматоидный артрит, анкилозирующий спондилит, глутатион, оксид азота, антиоксидантный статус.

SUMMARY

L. A. Alexandrova, N. A. Filippova, T. F. Subbotina, E. S. Alekseevskaya, A. A. Zhloba, V. I. Trofimov

Evaluation of the oxidation-nitrosyl stress manifestations at systematic connective tissue diseases

Reduction in antioxidant status with low activity of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and glutathione reductase red blood cells at a low level of reduced glutathione in the background and increased NOx levels in blood plasma was detected in patients with systematic connective tissue and joint diseases: rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis. Detected violations are not correlated with the activity of the process, and seropositivity.

Keywords: rheumatoid arthritis, ankylosing spondylitis, glutathione, nitric oxide, antioxidant status.