

ИЗВЕСТИЯ  
ВЫСШИХ УЧЕБНЫХ ЗАВЕДЕНИЙ

*Северо-Кавказский  
регион*

---

ЕСТЕСТВЕННЫЕ

НАУКИ

2014

3

УДК 616.728.3

## КОРРЕЛЯЦИОННЫЕ СВЯЗИ МЕЖДУ ПОКАЗАТЕЛЯМИ СИСТЕМЫ ПРООКСИДАНТЫ–АНТИОКСИДАНТЫ КРОВИ И СИНОВИАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ И РЕНТГЕНОЛОГИЧЕСКОЙ СТАДИЕЙ ГОНАРТРОЗА

© 2014 г. С.Б. Панина

Панина Светлана Борисовна – аспирант, кафедра биохимии и микробиологии, факультет биологических наук, Южный федеральный университет, ул. Б. Садовая, 105/42, г. Ростов-на-Дону, 344006, e-mail: tailana@donnetwork.ru.

Panina Svetlana Borisovna – Post-Graduate Student, Department of Biochemistry and Microbiology, Faculty of Biological Science, Southern Federal University, B. Sadovaya St., 105/42, Rostov-on-Don, 344006, Russia, e-mail: tailana@donnetwork.ru.

В результате исследования пациентов с диагнозом гонартроз удалось выявить развитие окислительно-нитрозильного стресса в плазме и мононуклеарной фракции крови, особенно выраженное в синовиальной жидкости. Установлено, что активности прооксидантных ферментов миелопероксидазы и ксантиноксидоредуктазы в мононуклеарах крови, содержание мочевой кислоты в плазме, концентрация малонового диальдегида в плазме и синовиальной жидкости, а также супероксидустраняющая активность коррелируют с рентгенологической стадией заболевания и могут служить информативным тестом в диагностико-предиктивном плане.

**Ключевые слова:** гонартроз, окислительно-нитрозильный стресс, прооксиданты, антиоксиданты, корреляционный анализ, синовиальная жидкость.

The present study revealed the development of oxidative/nitrosative stress in the blood plasma and mononuclear fraction, and especially in the synovial fluid in patients with knee osteoarthritis. It was ascertained that such parameters as pro-oxidant activities of myeloperoxidase and xanthine oxidoreductase in the mononuclear fraction, the content of uric acid in the plasma, the concentration of malondialdehyde in the plasma and synovial fluid, also the superoxide anion-obviating activity correlated with radiographic grade of knee osteoarthritis and might be used as an informative diagnostic and predictive test.

**Keywords:** knee osteoarthritis, oxidative/nitrosative stress, pro-oxidants, antioxidants, correlation analysis, synovial fluid.

Гонартроз (ГА), или остеоартроз (ОА) коленного сустава, – распространенное хроническое дегенеративное заболевание хряща, которое является ведущей причиной нетрудоспособности в среднем и пожилом возрасте. При этом мультифакториальном заболевании наблюдаются деградация суставного хряща, изменения субхондральной кости, формирование остеофитов и выраженное внутрисуставное воспаление (синовит), а также ноцицептивная сенситизация. Большинство людей старше 65 лет имеют радиографические и/или клинические свидетельства развития остеоартроза [1]. Ключевые события патогенеза, происходящие в хряще в течение ОА, включают нарушение баланса анаболических и деградиционных сигналов через цитокиновые каскады, а также продукцию провоспалительных молекул. Роль активированных кислородных метаболитов (АКМ) и окислительного стресса как важнейших участников патогенеза ОА активно обсуждается [2]. Последствия окислительного стресса включают модификации клеточных белков, липидов и ДНК, с другой стороны, АКМ способны активировать множество стресс-сигнальных путей и медиаторов – ERK, JNK, MAPK, NF- $\kappa$ B, p53 и др. [3].

Уровень липопероксидации, активности антиоксидантных ферментов в крови и синовиальной жидкости (СЖ) при ОА значительно изменяются [4], но как эти

изменения коррелируют со стадией развития данной суставной патологии до конца неясно. Так, сообщалось о снижении уровня экстраклеточной супероксиддисмутазы (Э-СОД) в СЖ больных ОА, а также о значимой негативной корреляции между общей антиоксидантной активностью плазмы крови и содержанием малонового диальдегида (МДА) как маркера липопероксидации [4].

Цель настоящей работы – исследование корреляционных взаимосвязей между показателями свободнорадикального окисления (СРО) и антиоксидантного статуса в плазме, эритроцитах, мононуклеарной фракции периферической крови и СЖ больных ГА и рентгенологической стадией развития ГА по шкале Kellgren–Lawrence (K/L).

### Материалы и методы

Критерии включения в изучаемую группу пациентов следующие: диагноз ГА I–IV стадий по шкале Kellgren–Lawrence (рентгенограммы, медицинская история, анкета); боль в коленном суставе (правом, левом или обоих); затрудненные и ограниченные движения. В общую выборку отобраны 116 пациентов, которые классифицированы по характеру проводимой терапии на две группы: 1-я – консервативная терапия (НПВП, массаж, инъекции гиалуроновой ки-

слоты и кортикостероидов); 2-я – хирургическое вмешательство (артроскопия). Группа 1 (ГА 1) включала 49 пациентов, из них 9 мужчин, 40 женщин; средний возраст 58,8 года (ряд 35+78 лет, SD 12,2). Группа 2 (ГА 2) включала 67 пациентов, из них 35 мужчин и 32 женщины; средний возраст – 46 лет (ряд 24+75 лет, SD 15,2). Для контроля отобрана группа здоровых людей в количестве 25 человек (средний возраст – 48 лет), не имеющих ГА, не страдающих от болей и ограниченных движений в суставе. Согласно другой классификации, пациенты распределились по рентгенологической стадии, возрасту ( $M \pm m$ ) и полу следующим образом: I стадия – 11 пациентов, возраст  $24,1 \pm 3,54$  года, 6 мужчин и 5 женщин; II – 49 пациентов, возраст  $42,14 \pm 2,27$  года, 28 мужчин и 21 женщина; III – 41 пациент, возраст  $59,9 \pm 1,74$  года, 5 мужчин и 36 женщин; IV – 15 пациентов, возраст  $64,43 \pm 1,41$  года, все женщины.

Кровь собирали утром натощак из локтевой вены. В качестве антикоагулянта использовали К2-ЭДТА в концентрации 1,2+2,0 мг сухой ЭДТА на 1 мл крови. Мононуклеарную фракцию (лимфоциты, моноциты) выделяли из цельной крови в градиенте плотности фиколл-верографина ( $\rho = 1,077$ ). После трехкратного промывания физиологическим раствором к полученной суспензии лимфоцитов добавляли неионный детергент «Тритон X-100» в конечной концентрации 0,1 % для получения лизата, оставляли на 20 мин при температуре +37 °С, затем приступали к биохимическому анализу. Синовиальную жидкость, полученную путем артроцентеза коленного сустава, а также цельную кровь центрифугировали в течение 10 мин при 3000 об/мин для получения, соответственно, супернатанта и плазмы крови, которые использовали для биохимического анализа. Осадок эритроцитов промывали физиологическим раствором и готовили 1-, 2- и 10-процентный гемолизаты.

Интенсивность процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) определяли по содержанию ТБК-положительных продуктов в пересчете на МДА [5]. Определение уровня нитритов/нитратов ( $\text{NO}_x^-$ ) в плазме крови проводили при помощи реактива Грисса после предварительного восстановления нитрата в нитрит гранулированным кадмием по методу [6]. Активность супероксиддисмутазы (СОД) / супероксид-устраняющую активность (СУА) оценивали по ингибированию восстановления нитросинеготетразолия супероксидом, генерируемым при аутоокислении адреналина [7]. Активность каталазы/скорость утилизации гидропероксида, определяли по интенсивности взаимодействия перекиси водорода с молибдатом аммония [8]. Активность глутатионпероксидазы (ГПО) определяли по скорости окисления восстановленного глутатиона (GSH) в присутствии гидроперекиси третичного бутила [9]. Содержание GSH оценивали по цветной реакции с 5,5-дитиобис-(2-нитробензойной) кислотой с образованием соединения, которое обладает максимумом поглощения при 412 нм. Активность

глутатион-S-трансферазы (GST) оценивалась по скорости реакции ферментативного образования GS-2,4-динитробензола в реакции восстановленного глутатиона с 1-хлор-2,4-динитробензолом [10]. Активность ксантиноксидоредуктазы (КОР) оценивалась по приросту мочевой кислоты (МК) при длине волны 295 нм. Содержание МК в СЖ определяли с помощью коммерческого набора «Витал-02» (Россия). Активность миелопероксидазы (МПО) определяли спектрофотометрическим методом [11], активность НАДФН-оксидазы оценивали по восстановлению 2,6-дихлорфенилиндофенола (ДХФДФ) в присутствии НАДФН [12].

Содержание гемоглобина (Hb) определяли гемиглобинцианидным методом с помощью стандартного набора «Эколаб» (Россия), концентрацию белка в плазме крови и СЖ – биуретовым методом с помощью коммерческого набора «Абрис-плюс» (Россия), концентрацию белка в мононуклеарной фракции – методом Lowry.

Статистическая обработка данных проводилась в пакете программ Statisticafor Windows 6.1. Данные представлялись как медиана и 25-й, 75-й процентиля: медиана (25+75 %). Для сравнения показателей групп использовали непараметрический U-тест Манна-Уитни. Ранговые корреляции между значениями показателей рассчитывались с помощью непараметрического коэффициента Спирмена (R). Различия считали значимыми при  $p < 0,05$ ; при  $0,05 < p < 0,1$  говорили о существующей тенденции к достоверности.

### Результаты исследования и обсуждение

Сравнение показателей системы прооксиданты↔антиоксиданты между группами здоровых доноров, пациентов группы ГА 1 (консервативная терапия) и ГА 2 (артроскопия) показало развитие окислительно-нитрозильного стресса у пациентов в плазме крови и СЖ. Это состояние стресса и напряжённость компонентов антиоксидантной системы были более выраженными у пациентов после оперативного вмешательства (группа ГА 2) по сравнению с ГА 1; в СЖ – по сравнению с мононуклеарной фракцией крови. Так, у пациентов ГА 2 концентрация  $\text{NO}_x^-$  в СЖ на 18 % выше относительно пациентов ГА 1, в плазме – на 28 % относительно контроля (табл. 1). Это свидетельствует о повышенной продукции активных форм азота, которые, взаимодействуя с другими АКМ, способны продуцировать цитотоксические интермедиаты (пероксинитрит, гидроксильный радикал), которые могут приводить к усилению апоптоза клеток и углублению патологического процесса. В СЖ больных ГА 2 содержание МДА как вторичного продукта и маркера липопероксидации повышено на 101 % относительно ГА 1, а в плазме – на 32 % относительно контроля. Известно, что ПОЛ и аддукты МДА с белками и нуклеиновыми кислотами вносят определенный вклад в развитие возраст-ассоциированных патологий, к которым относится и ОА [13].

