

УДК 616.5-002.525.2:577.1

©Коллектив авторов

ДИСРЕГУЛЯЦИЯ ОКСИДАТИВНЫХ И АУТОИММУННЫХ ПРОЦЕССОВ У БОЛЬНЫХ СИСТЕМНОЙ КРАСНОЙ ВОЛЧАНКОЙ И РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ

В.Г. Подопригорова¹, А.А. Бобылев¹, С.М. Иванова², А.И. Сперанский²

¹ Медицинская Академия, ПНИЛ клинической биофизики и антиоксидантной терапии
214019 г. Смоленск, ул. Крупской, д.28; тел./факс. (0812)64-59-64,
эл. почта: pnll@keytown.com; тел.: 114-44-63, 114-09-33

² ГУ Институт ревматологии РАМН, г.Москва, Каширское шоссе, д.34 А.

Методом хемилюминесценции и ЭПР-спектроскопии изучены особенности иммунопатологических сдвигов и нарушения показателей оксидативного и антиоксидантного гомеостаза у 50 больных системной красной волчанкой и 66 больных ревматоидным артритом, 235 доноров. Установлено, что оксидативный и антиокислительный дисбаланс значительно выражен у больных ревматоидным артритом, в то время как у больных системной красной волчанкой обнаружено содружественное отсутствие оксидативной реакции, а также активности антиоксидантов как первой линии защиты, так и уровня суммарного антиоксидантного ответа. Выявлены также различия в иммунных ответах при этих заболеваниях, что предполагает включение в комплексную терапию корректоров перекисного гомеостаза.

Ключевые слова: ЭПР-спектроскопия, хемилюминесценция, ревматоидный артрит, системная красная волчанка, окислительный стресс.

ВВЕДЕНИЕ. Различные и многочисленные патогены вызывают увеличение прооксидантных влияний на иммунную реактивность, что увеличивает риск возникновения аутоиммунных процессов [1]. Известно, что ревматоидный артрит (РА) является системным аутоиммунным заболеванием, характеризующимся хроническим воспалением суставов с инфильтрацией макрофагами и активированными Т-лимфоцитами. Существует доказательство, что продукция свободных радикалов в местах воспаления участвует в патогенезе этого заболевания [2-4]. Т-клетки, выделенные из синовиальной жидкости у пациентов с РА, характеризуются снижением внутриклеточного уровня глутатиона [5]. Миграция лимфоцитов и моноцитов в синовиальную оболочку суставов обусловлена нарушенной экспрессией некоторых молекул адгезии, включающих ELAM-1, VCAM-1, ICAM-1 и ICAM-2 [6-8], что может объясняться нарушенной деятельностью редокс-чувствительных сигнальных путей. Кроме того, оксидативные состояния синовиальной ткани также ассоциируются с высоким уровнем мутации гена p53 [3]. Существует гипотеза, что трансформированные клетки синовиальной оболочки у больных РА могут вызывать прогрессирование деструкции суставов.

Если РА активно исследовался с позиции оксидативных биорадикальных нарушений, то изучение системной красной волчанки (СКВ) с точки зрения

нарушения биорадикального статуса не проводилось. Не использовались также прямые методы контроля этих нарушений в клинике РА и СКВ в сопоставлении с иммунопатологическими показателями.

МЕТОДИКА. Активированную родамином Ж хемилюминесценцию в присутствии ионов двухвалентного железа [9,10] регистрировали на хемилюминометре ИРА-03. Определяли амплитуду быстрой вспышки, которая прямо пропорциональна уровню первичных продуктов свободнорадикального окисления липидов (СРОЛ) – гидроперекисей липидов (ГПЛ), связанных с образованием супероксидных радикалов, и амплитуду медленной вспышки, обратно пропорциональную уровню суммарной антиокислительной активности (АОА) – интегральному показателю антиоксидантного потенциала организма.

Магнитную радиоспектроскопию (электронный парамагнитный резонанс, ЭПР) проводили на радиоспектрометре РЭ-1306 при температуре жидкого азота [11]. Определяли уровень церулоплазмينا (Цп; сывороточный антиоксидант “первой линии защиты”, обладающий способностью блокировать ионы двухвалентного железа и супероксидный радикал в реакциях инициации СРОЛ); уровень трансферрина (Тр; сывороточный антиоксидант “первой линии защиты”, обеспечивающий транспорт сывороточного железа, захватывая ионы Fe^{2+} , необходимые для иницирования СРОЛ). В процессе исследования определяли уровень активности антиоксидантной системы Цп/ТрАОС_{Цп/Тр} по отношению ЭПР-сигнала Цп к ЭПР-сигналу Тр, что является интегральным показателем активности антиоксидантов первой линии защиты в ответ на инициацию СРОЛ [12-15].

Контрольные показатели (нормы) оксидативного гомеостаза определяли у 200 доноров (методом хемилюминесценции) и 35 доноров (методом ЭПР-спектроскопии). В исследование не включали доноров, сдававших кровь > 2 раз в год, поскольку увеличение количества кровосдач существенно снижает антиоксидантные параметры сыворотки крови [16]. Данные показатели в исследуемый период не имели отличия в зависимости от возраста и пола. Для выявления выраженности дисбаланса оксидативного и антиоксидантного гомеостазов показания у больных приведены в % к таковым у доноров (в % от нормы)

Обследовано 50 больных достоверной СКВ, 66 - достоверным РА (соответственно критерии АРА 1987 и 1982гг) [17].

В таблице 1 представлена клинико-лабораторная характеристика больных СКВ. Выделены 2 подгруппы больных: “АНФ+” и “АНФ-” (антинуклеарный фактор). “АНФ+” подгруппа характеризовалась достоверно большей активностью (SLEDAI) болезни, частотой поражения кожи по типу “бабочки”, почек, центральной нервной системы, анти-ДНК, Sm, антикардиолипидовых аутоантител, анемии, лейкопении, тромбоцитопении. В “АНФ-” подгруппе чаще встречались дискоидная волчанка, анти-Ro аутоантитела.

Таблица 1: Клинико-лабораторная характеристика больных СКВ.

	АНФ (%)	
	“+”, n=30	“-”, n=20
SLEDAI	17,8±8,8	5,2±1,4
АНФ +	100	0
a-ДНК+	93,3	20
a-Sm+	33,3	10
a-RNP+	13,3	10
a-Ro+	26,7	50
Эритема-бабочка+	41	0
ДКВ+	0	25
Фотосенсибилизация+	93,3	80
Язвы полости рта+	33,3	20
Артрит/ артралгии+	86,7	85
Серозит+	33,3	50
Поражение почек+	40	10
Поражение ЦНС+	26,6	10
Анемия +	20,7	10
Лейкопения +	46,4	10
Тромбоцитопения +	20,7	5

В таблице 2 представлена клинико-иммунологическая характеристика обследованных больных РА. Около 70 % были серопозитивны по ревматоидному фактору (РФ), у 55% определялись 3-4 рентгенологические стадии, у 73% активность болезни достигала 2-3-ей степени.

Таблица 2: Клинико-лабораторная характеристика больных РА.

Параметры	Количество больных	% от общего числа пациентов
Женщины	48	72,7
Мужчины	18	27,3
Возраст (годы)	45,06±14,02	
До 20 лет	4	6
20-40 лет	18	27,3
41-60 лет	34	51,5
старше 60 лет	10	15,2
Длительность РА, мес.		
Менее 1 года	8	12,12
1-3 года	30	45,5
4-6 лет	8	12,12
7-10 лет	6	9,1
более 10 лет	14	21,2
Серопозитивные по РФ	46	69,7
Активность:		
I степень	18	27,3
II степень	40	60,6
III степень	8	12,1
Рентгенологические стадии		
I	0	0
II	30	45,5
III	20	30,3
IV	16	24,2

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. В таблице 3 представлены показатели оксидативного гомеостаза у больных РА и СКВ.

Таблица 3: Показатели оксидативного гомеостаза у больных СКВ и РА.

	СКВ АНФ+	СКВ АНФ-	РА РФ+	РА РФ-
ГПШ N=76±1,24	83±8,14	99,11±6,3***	104,08±6,77***	113,43±14,9**
АОА N=31,69±0,99	19,5±5,68**	28,15±2,96	14,22±3,98***	18,51±4,27***
ЦП N=57,08±2,15	45,6±5,49*	57,28±3,93	71,59±3,83***	68,58±6,11*
ТР N=80,84±4,32	49,0±5,66**	63,11±7,74*	47,42±6,37***	48,56±7,97***
АОС ЦП/ТР N=0,76±0,05	0,75±0,05	1,1±0,16*	1,83±0,27***	1,8±0,32***

Примечание. Значимость различий по сравнению с нормой: *** - p<0,001; ** - p<0,01; * - p<0,05.

Как видно из представленных данных, уровень ГПШ у больных с СКВ АНФ+ не отличался от нормы (p>0,05), уровень ЦП был ниже нормы (p<0,001), уровень

активности антиоксидантной системы Цп/Тр также не отличался от нормы на фоне выраженного ($p < 0,05$) снижения суммарной антиокислительной активности сыворотки крови, что свидетельствует о низкой скорости процессов оксидативного перекисления у этой группы больных. У больных СКВ АНФ- отмечалось повышение уровня ГПЛ ($p < 0,01$), что свидетельствует о некотором повышении скорости перекисления на фоне отсутствия реакции со стороны суммарного антиокислительного потенциала ($p > 0,05$), антиоксиданта первой линии защиты Цп ($p > 0,05$) и умеренной активности антиоксидантной системы Цп/Тр ($p < 0,05$), что свидетельствует о некотором повышении образования токсичных продуктов СРОЛ на фоне отсутствия реакции со стороны антиоксидантной системы.

У больных с РА РФ+ отмечена бурная реакция как со стороны уровня образования ГПЛ ($p < 0,01$), так и со стороны гиперпродукции Цп ($p < 0,01$) и повышения активности АОС Цп/Тр ($p < 0,01$) на фоне снижения АОА ($p < 0,01$), что свидетельствует об интенсификации процессов окисления на фоне истощения суммарного антиоксидантного потенциала.

У больных РА РФ- данные показателей оксидативного гомеостаза существенно не отличались от таковых у больных РА РФ+, что также свидетельствует об интенсификации оксидативных процессов.

Полученные результаты демонстрируют различную выраженность дисбаланса оксидативного гомеостаза в исследуемых группах больных, наиболее наглядно представленных по коэффициентам в таблице 4.

Таблица 4: Выраженность дисбалансов оксидативного гомеостаза.

	СКВ		РА	
	АНФ+	АНФ-	РФ+	РФ-
К	2,07	1,51	2,98	2,48
К₁	1,27	1,11	2,74	2,00
К₂	1,57	1,60	5,29	3,59

Примечание: К=ГПЛ в % от N/АОА в % от N, К₁=ЦП в % от N/АОА в % от N, К₂=АОСЦп\Тр в % от N /АОА в % от N. Данные коэффициенты (К-К₂) в норме должны быть равны 1. Коэффициент К отражает выраженность оксидативного и антиокислительного дисбаланса, коэффициенты К₁ и К₂ - только антиокислительного дисбаланса. Значения коэффициентов К-К₂ 1,1 - 2 соответствуют умеренному дисбалансу, 2,1-2,5 среднему дисбалансу, >2,5 - выраженному дисбалансу.

Результаты исследования показали, что при РА имеют место выраженный оксидативный, антиокислительный, антиоксидантный дисбаланс (К₁, К₂), максимальный у больных РФ+. При СКВ данные отражают содружественное отсутствие реакции как антиоксидантов первой линии защиты на стадии инициации их образования, так и на уровне суммарного антиоксидантного ответа.

Известно, что развитие патологических процессов при РА и СКВ характеризуется выраженными аутоиммунными нарушениями, цитокиновым и апоптотическим дисбалансом [18]. Полученные результаты позволяют дифференцировать оксидативный процесс при аутоиммунном иммунопатологическом процессе, связанном с образованием ревматоидного фактора (РФ), С-реактивного белка (СРБ) и антинуклеарного фактора (АНФ), антител к ДНК и анти-Ро антител. Умеренные, до нормальных значений, изменения имеют место при течении иммунопатологического процесса, характеризующего СКВ: АНФ, анти-ДНК, анти-Sm, анти-Ро аутоантитела, повышенные уровни ИЛ-10, с умеренным увеличением интенсивности апоптоза. Максимальные - при образовании РФ, СРБ, ФНО-альфа, ИЛ-6, а также с максимальной интенсивностью апоптоза [19, 20].

Основным местом образования кислородных радикалов, таких как супероксидный анион, гидроксильный радикал, синглетный кислород являются

митохондрии, нарушение функций которых приводит к изменению их мембранного потенциала, в результате чего продуцируются активные формы кислорода (ROS), происходит освобождение цитохрома *c* [21] и других апоптогенных факторов и протеаз в цитозоль, что в конечном итоге приводит к гибели клетки [22].

Окислительный стресс, также как и УФ-облучение индуцирует экспрессию SS-A Ro-52 кДа аутоантигена на клеточной поверхности кератиноцита. Низкий уровень антиоксидантной системы при СКВ может являться одной из причин, индуцирующих апоптоз и экспрессию ядерных компонентов на клеточной поверхности [23,24]. Это в свою очередь определяет тяжесть системных клинических проявлений и фатальный прогноз при этой патологии (особенно выраженный в случае СКВ АНФ+).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ. Таким образом, представленные результаты показывают определенные различия в показателях оксидативного гомеостаза, складывающиеся в 3 вида “биорадикального портрета”:

1. СКВ АНФ+
2. СКВ АНФ-
3. РА РФ+ и РФ-

Полученные данные (в сопоставлении с иммунологическими показателями), позволяют считать, что наиболее тяжелое клиническое течение аутоиммунного процесса (в частности, при СКВ, АНФ+) сопровождается отсутствием оксидативных реакций на аутоиммунные стимулы, в то время как РА, независимо от позитивности РФ, сопровождается достаточно выраженными критериями активности оксидативного стресса, что характеризуется более выраженными показателями оксидативного и антиоксидантного дисбалансов в организме больного.

Существенное снижение или отсутствие реакции со стороны суммарной АОС предполагает обязательное включение синтетических антиоксидантов в комплексное лечение больных причем не только препаратов, действие которых направлено на обрыв цепи перекисного окисления (в случае РА), но и (в случае СКВ, АНФ+) антиоксидантов первой линии защиты, в частности церулоплазмينا. Антиоксиданты блокируют апоптоз наподобие ингибиторов каспазы. Клетки, находящиеся в аэробном состоянии, противостоят механизмам антиоксидантной защиты, блокирующим действие ROS.

При СКВ с учетом “немного” оксидативно-антиоксидантного портрета в комплексное лечение целесообразно вводить прооксиданты, такие как актовегин, солкосерил параллельно с препаратами, восстанавливающими реологические свойства крови (реополиглюкин, трентал).

ЛИТЕРАТУРА.

1. Dröge W. (2002) *Physiol Rev.*, **82**, 47-95.
2. Mapp P.I., Grootveld M.C., Blake D.R. (1995) *Br. Med. Bull.*, **51**, 419-436.
3. Firestain G.S., Echeverri F., Yeo M., Zvaifler N.Y., Green D.R. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 10895-10905.
4. Araujo V., Arnal C., Boronat M., Ruiz E., Dominguez C. (1998) *Biofactors*, **8**, 155-159.
5. Maurice M.M., Nakamura H., van der Voort E., van Viet A.L., Staal F.J.T., Tak P.P., Breedveld F.C., Verwell C.L. (1995) *J. Immunol.*, **158**, 1458-1465.
6. Cunnane G., Hummel K.M., Miller-Zaduer K., Gay S. (1998) *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, **46**, 1-7.
7. Cutolo M., Sulli A., Barone A., Seriola B., Accardo S. (1993) *Clin. Exp. Rheumatol.*, **11**, 331-339.
8. Veale D.J., Maple C. (1996) *Drugs Aging*, **9**, 87-92.
9. Владимиров Ю.А., Шерстнев М.П., Азимбаев Т.К. (1992) *Биофизика*, **6**(37), 1041-1047.
10. Шерстнев М.П. (1990) *Вопр. хемилюминесценции*, **1**(1), 19-20.

11. *Dodd N.J.F.* (1975) *Brit. J. Cancer.*, **32**, 108.
12. *Gutteridge J.* (1985) *Chem. Biol. Interact.*, **56**(1), 113-120.
13. *Gutteridge J.* (1983) *FEBS Lett.*, **157**(1), 37-40.
14. *Gutteridge J., Richmond R., Halliwell B.* (1980) *FEBS Lett.*, **112**, 269-272.
15. *Gutteridge J., Paterson S., Segal A., Halliwell B.* (1981) *Biochem. J.*, **199**, 259-261.
16. *Подопригорова В.Г.* (1998) Роль свободнорадикального окисления липидов и антиоксидантных систем в патогенезе и саногенезе язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки, возможности коррекции антиоксидантами. Дисс. докт. наук, СГМА, Смоленск.
17. *Насонов Е.Л.* (1994) Клиника и иммунопатология ревматических болезней, издательство "Москва".
18. *Al-janadi M., Al-Balla S., Al-Dalaan A., Raziuddin S.* (1993) *Clin Immunol.*, **13**, 58-67.
19. *Иванова С.М., Вейко Н.Н., Рязанцева Т.А., Сперанский А.И.* (2004) *Клин. лаб. диагн.*, **3**, 21-39.
20. *Невская Т.А., Рязанцева Т.А., Иванова С.М.* (1998) *Ревматология*, **4**, 35-42.
21. *Maurice M.M., van der Voort E., van Viet A.L., Tak P.P., Breedveld F.C., Verwell C.L.* (1990) Oxidative stress in cancer, AIDS and neurodegenerative disease.
22. *Krishnaswamy Kannan, Sushil K. Jain* (2002) *Pathophysiology*, **7**(27), 153-163
23. *Devadas S., Hinshaw J.A., Zaritskaya L., Williams M.S.* (2003) *Free Radic. Biol. Med.*, **35** (6), 648-661
24. *Kumagai S., Jikimoto T., Saegusa J.* (2003) *Rinsho Byori*. **51**(2), 126-132

Поступила: 03. 06. 2004

PECULIARITIES OF FREE RADICAL AND ANTIOXIDANT STATUTE IN PATIENTS WITH SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS AND RHEUMATOID ARTHRITIS

V.G. Podoprigorova¹, A.A. Bobilev¹, S.M. Ivanova², A.I. Speransky²

¹Smolenskaya State Medical Academy, Krupskaya str. 28, Smolensk ,214019 Russia; tel./fax. (0812)64-59-64, E-mail: pnul@keytown.com, <http://www.antioxidant.narod.ru>

²Institute of Rheumatology of RAMS, Moscow, Kashirskoe shosse, 34A

The state of lipid peroxidation and antioxidant defence was investigated in sera of 66 patients with rheumatoid arthritis (RA), 50 patients with systemic lupus erythematosus (SLE) and in 235 healthy donors using the method of chemiluminescence and EPR-spectroscopy.

The results indicate involvement of free radical oxidation in pathogenesis of RA and SLE. Peroxide and antioxidant imbalance was more pronounced in RA than in SLE.

Key words: EPR-spectroscopy, chemiluminescence, reumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus, oxidative stress.