

УДК 577.15:616.72.002

© Коллектив авторов

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ДЛЯ ОЦЕНКИ КАЧЕСТВА И ЭФФЕКТИВНОСТИ ЛЕЧЕБНЫХ МЕРОПРИЯТИЙ У БОЛЬНЫХ ОСТЕОАРТРОЗОМ КОЛЕННОГО СУСТАВА

М.Г. Мещерякова^{1}, Я.Г. Трилис¹, Н.В. Кириллова¹, Т.Ф. Алпатова¹,
И.А. Мухин², А.А. Кожевин²*

¹Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования “Санкт-Петербургская Государственная химико-фармацевтическая академия Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию РФ” (ГОУ СПХФА Росздрава), 197376, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 14; тел.: (812)234-90-33; факс: 234-60-44; эл. почта: rector@pharm.runnet.ru

²Городская гериатрическая больница (ортопедическая), Санкт-Петербург

Протекание ОА коленного сустава сопровождается активацией прооксидантных систем организма и интенсификацией свободно-радикального окисления белков и липидов в синовиальной жидкости, что свидетельствует об истощении резервно-адаптационных возможностей организма. Проведение специфического медикаментозного лечения приводит к значительному снижению, а в ряде случаев позволяет нормализовать, такие биохимические параметры, как концентрация карбонильных групп, содержание малонового диальдегида и общего белка в синовии. Наилучшая динамика была выявлена в отношении ранних и поздних маркеров окислительной модификации белков. Полученные результаты позволяют рекомендовать эти показатели для использования в лабораторной диагностике целью исследования глубины дегенеративно-дистрофического процесса в коленном суставе, а также контроля хода и оценки эффективности лечебных мероприятий.

Ключевые слова: окислительный стресс, окислительная модификация белков, перекисное окисление липидов, синовиальная жидкость, карбонильные группы, остеоартроз.

ВВЕДЕНИЕ. Остеоартроз (ОА), хроническое прогрессирующее дегенеративно-дистрофическое заболевание суставов, становится в настоящее время одной из самых распространенных хронических болезней в высокоиндустриальных странах. В связи с длительным и прогрессирующим характером течения ОА является одной из главных причин формирования инвалидности по суставному синдрому. Лечение артрозов сложно и малоэффективно вследствие недостатка знаний о их патогенезе, а также роли синовиальной жидкости (СЖ) или синовия в воспалительных процессах. Как известно, СЖ является пограничным слоем между синовиальной оболочкой, хрящом и субхондральной костью, который непосредственно соприкасается со всеми компонентами сустава и моментально реагирует на все структурные нарушения опорно-двигательного аппарата изменением своих характеристик. Типичные изменения в СЖ нередко появляются до развития определенной клинической картины. В связи с этим она может служить своеобразным индикатором жизнедеятельности суставов и давать наиболее точную информацию об их текущем состоянии.

* - адресат для переписки

При ОА, как и при любом другом воспалительном процессе, происходит активация прооксидантных систем организма (ПОС), сопровождающаяся высвобождением большого количества активных форм кислорода (АФК) и интенсификацией свободно-радикального окисления биосубстратов, к которым относятся, в первую очередь, белки и липиды [1, 2]. Развитие заболевания определяется, в конечном итоге, состоянием “антиоксидантного статуса организма”, характеризующегося степенью сбалансированности ПОС и антиоксидантной системы (АОС). Поскольку изучение биологических жидкостей наиболее информативно отражает состояние патологических изменений в тканях *in situ*, целью работы является исследование влияния специфической фармакотерапии на интенсивность окислительной модификации белка (ОМБ) и свободно-радикального окисления (СРО) липидов в СЖ больных ОА коленного сустава.

МЕТОДИКА. В работе было исследовано 130 пациентов в возрасте от 40 до 60 лет, у которых был диагностирован остеоартроз коленного сустава 1-й степени (40 человек), 2-й степени (45 человек) и 3-й степени (45 человек). Все пациенты были информированы и дали согласие на участие в эксперименте. Забор СЖ осуществляли натошак. В качестве стабилизирующей среды использовали физраствор и гепарин, в качестве анестезирующего средства - лидокаин. Для контроля извлекали посмертную СЖ людей (возраст 30-50 лет), умерших в результате травм, не связанных с повреждением коленных суставов. Забор материала для исследования производился в Санкт-Петербургской Городской гериатрической больнице в соответствии с приказом Минздрава № 694 от 21 июля 1978 г. п. 2.24 "Инструкция о производстве судебно-медицинской экспертизы в СССР". ОМБ оценивали по количеству входящих в их состав карбонильных групп [3]. Поздние маркеры окислительной деструкции белков регистрировали при длине волны 370 нм. Алифатические альдегиды основных аминокислот, ранние маркеры ОМБ, определяли в тех же пробах при длине волны 280 нм, а степень модификации белков выражали в единицах оптической плотности, отнесённых на мг белка [4]. Содержание карбонильных групп в циркулирующих и тканевых белках считается чувствительным и достаточно стабильным маркером их свободнорадикального повреждения. Для оценки интенсивности СРО липидов измеряли уровень продуктов, реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК-РП) [5]. Содержание общего белка в СЖ определяли по методу Лоури. Методика лекарственной инъекционной терапии заключалась в введении согласно разработанной схеме внутрисуставно раствора алфлутопа и параартикулярно суспензии дипроспана.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы Statistica 5,0 Windows.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Как известно, в состоянии окислительного стресса в первую очередь атаке АФК подвергаются белки, модифицированная форма которых служит в дальнейшем, по мнению ряда авторов, потенциальным стимулятором ПОЛ [6]. В связи с этим, окислительная деструкция белков является наиболее ранним индикатором повреждения ткани, что и обосновывает изучение динамики образования продуктов ОМБ при различных патологических состояниях организма. В результате исследования свободно-радикального окисления белков в СЖ больных ОА коленного сустава было установлено значительное повышение количества карбонильных групп по сравнению с нормой у обследованных пациентов (табл. 1). Исключение составляли группы больных первой и третьей стадией заболевания. Следует отметить, что среди обследованных с третьей стадией ОА было выявлено 8,3% больных, у которых содержание карбонильных групп в синовии, регистрируемых при длине волны 370 нм, превышало норму более, чем в 16 раз, и в то же время 25% из них имели оба показателя ОМБ, эквивалентные физиологическому значению.

Таблица 1. Окислительная модификация белков СЖ больных ОА до лечения.

Индексы	Содержание карбонильных групп, нмоль/мг	% больных	Содержание алифатических альдегидных групп, D ₂₀ /мг	% больных
Здоровые	2,86±0,24	-	0,07±0,01	-
1-ая стадия	2,62±0,26	20,0	0,25±0,02*	70,0
	5,43±0,33*	60,0	0,55±0,01*	30,0
	8,68±0,23*	20,0		
2-ая стадия	3,94±0,12*	54,5	0,27±0,03*	50,0
	8,83±0,62*	45,5	0,62±0,06*	50,0
3-я стадия	2,16±0,15	25,0	0,07±0,01 0,53±0,04*	25,0 75,0
	6,81±0,71*	25,0		
	12,96±1,23*	41,7		
	45,98±2,12*	8,3		

Примечание: Здесь и в таблицах 2-4 * - различия статистически достоверны (p<0,05).

В таблице 2 представлены данные по ОМБ в СЖ после проведения специфической фармакотерапии. Как видно из полученных результатов, у пациентов с каждой тяжестью заболевания отчетливо прослеживается тенденция к снижению показателей, характеризующих интенсивность свободно-радикального окисления белков синовию. Так, у больных с 1-й стадией ОА содержание карбонильных групп на уровне нормы было зарегистрировано уже у 60% обследованных, по сравнению с 20%, установленными ранее. Среди пациентов со второй стадией заболевания впервые появляется группа, включающая 63% больных, имеющих данную характеристику на уровне контрольного значения. У оставшихся пролеченных отчетливо наблюдается тенденция как к снижению содержания алифатических альдегидных групп, так и карбонильных групп в синовию. Среди пациентов с 3-й стадией ОА количество больных, с содержанием карбонильных групп, соответствующих физиологическому значению, после лечения остается на прежнем уровне - 25%. Однако, как видно из таблицы 2, проведение специфической терапии позволило полностью исключить из числа обследованных четвертую группу, у которой было установлено ранее катастрофическое нарастание окислительной деструкции белков в синовию. Кроме того, среди пролеченных с данной стадией заболевания отмечено как уменьшение числа больных, входящих в третью группу (превышение нормы по содержанию карбонильных групп в 4,5 раза) с 41,7 до 25%, так и увеличения числа больных с 25 до 42,7%, чьи показатели по регистрации алифатических альдегидов пришли к относительной норме.

Таблица 2. Окислительная модификация белков СЖ больных ОА после лечения.

Индекс	Содержание карбонильных групп, нмоль/мг	% больных	Содержание алифатических альдегидных групп, D ₂₀ /мг	% больных
Здоровые	2,86±0,34	-	0,07±0,01	-
1-ая стадия	2,53±0,07	60,0	0,25±0,02*	70,0
	6,36±0,74*	20,0	0,48±0,03*	30,0
	9,23±0,29*	20,0		
2-ая стадия	2,05±0,24	63,6	0,15±0,01*	58,3
	4,79±0,31*	36,4	0,31±0,02*	41,7
3-я стадия	2,85±0,11	25,0	0,06±0,01	42,7
	7,58±0,81*	50,0	0,27±0,03*	57,3
	12,81±1,94*	25,0		

БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ СИНОВИАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ

Как известно, липидный состав СЖ влияет на её физико-химическое состояние, определяя, в первую очередь, вязкозные и вязкоэластичные свойства. Липиды являются биосубстратами, которые наиболее активно подвергаются атаке как АФК, так и самими окислительно модифицированными белками. Активация ПОЛ в СЖ может вызывать и поддерживать воспалительные и дегенеративные изменения в хряще, способствовать распаду гиалуроновой кислоты, некрозу хондроцитов, приводить к нарушению процессов микроциркуляции и усугублению дегенерации синовиальной ткани. В связи с этим, в литературе уделяется особое внимание изучению содержания в СЖ продуктов ПОЛ, а именно ТБК-РП [7-9].

Из представленных в таблице 3 данных видно, что ОМБ в СЖ больных ОА сопровождалась значительная активация свободно-радикального окисления липидов. Тем не менее, среди пациентов каждой стадии заболевания была выявлена группа, в СЖ которой содержание ТБК-РП соответствовало физиологическому значению. У оставшихся более 70% (из расчёта на общее количество) обследованных концентрация ТБК-РП в синовии существенно превышала норму. Наибольшее превышение уровня контрольного значения ТБК-РП было зарегистрировано у пациентов с 3-й стадией ОА и составило 4,9 раза.

Таблица 3. Содержание продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой.

Индекс	Содержание, мкмоль/л	% больных	Содержание, мкмоль/л	% больных
Здоровые	3,42±0,23 мкмоль/л			
	До лечения		После лечения	
1-ая стадия	3,88±0,17	14,3	4,95±0,31*	28,6
	7,81±0,38*	64,3	7,84±0,42*	42,8
	12,94±0,21*	21,4	11,85±0,67*	28,6
2-ая стадия	3,05±0,41	38,9	3,37±0,38	55,6
	8,14±0,42*	33,3	8,23±0,45*	38,9
	11,58±0,75*	27,8	12,7±0,93*	5,5
3-я стадия	3,45±0,31	33,3	3,99±0,31	38,1
	9,16±0,82*	28,6	8,94±0,88*	23,8
	15,09±1,07*	38,1	15,27±0,71*	38,1

Как видно из таблицы 3, после проведения курса фармакотерапии больные с 1-й, 2-й и 3-й стадией ОА распределились по тем же самым группам относительно среднего значения ТБК-РП, что и до лечения. Исключение составляет только первая группа больных с первой стадией заболевания, в СЖ которых уровень ТБК-РП заметно отклонился от нормы, установленной у них ранее. Для других стадий ОА, после медикаментозного лечения, была обнаружена тенденция к уменьшению численности групп с более высоким показателем ТБК-РП в синовии и увеличению с более низким. Наиболее четко она прослеживается у пациентов со второй стадией ОА, у которых процент больных, имеющих уровень ТБК-РП, эквивалентный норме, возрос до 55,6%, а число больных с показателем ТБК-РП более 11,5 мкмоль/л уменьшилось с 27,8 до 5,5%.

Сопоставляя данные представленные в таблицах, можно сделать вывод о наличии положительной корреляции между уровнем карбонильных групп и содержанием ТБК-РП, что свидетельствует о взаимосвязи между процессом ОМБ и интенсивностью СРО липидов на всех стадиях ОА.

Из литературных источников известно, что ОМБ проходит на фоне достоверного снижения содержания общего белка в тканях почек, эритроцитах животных и сыворотке крови [1, 10]. Ранее нами также было отмечено снижение данного параметра в плазме крови больных ОА коленного сустава [11].

В таблице 4 представлены данные концентрации общего белка в СЖ больных до и после проведения специфической фармакотерапии. Как видно из данной таблицы, в случае СЖ наблюдается обратная зависимость: увеличение содержания карбонильных групп в белках сопровождается повышением количества общего белка в синовии. Полученные нами результаты соответствуют имеющимся в литературе данным, согласно которым в 73% случаев развитие дегенеративно-дистрофических изменений в ранних стадиях ОА сопровождается превышением порогового значения общего белка [12]. Возрастание количества общего белка, и в первую очередь альбуминовых и гамма-глобулиновых фракций, авторы связывают с изменением гемато-синовиального барьера.

Таблица 4. Содержание общего белка в СЖ больных ОА.

Индекс	мг/мл	% больных	мг/мл	% больных
Здоровые	6,1±0,4 мг/мл			
	До лечения		После лечения	
1-ая стадия	5,94±0,43 12,49±0,53* 19,69±1,78*	39,0 41,0 20,0	6,06±0,41 11,15±0,51* 22,01±2,27*	62,5 25,0 12,5
2-ая стадия	6,86±0,51 11,79±0,28* 21,78±2,44*	40,9 45,5 13,6	5,96±0,53 10,83±0,44* 15,4±1,43*	54,5 36,4 9,1
3-ья стадия	6,34±0,58 12,02±0,33* 17,84±0,68*	27,8 33,3 38,9	6,58±0,52 12,13±0,41* 20,20±1,41*	61,1 22,2 16,7

После медикаментозного лечения, как и в случае с ТБК-РП, на всех трёх стадиях ОА отмечено увеличение численности групп, в которых данный показатель в синовии регистрировался на уровне контрольного значения. Из таблицы 4 видно, что количество больных, имеющих содержание общего белка сопоставимое с нормой, составляет более половины пролеченных, независимо от стадии болезни.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ. Одной из актуальных проблем современной диагностики различных заболеваний является поиск маркеров, адекватно отражающих метаболические и биохимические процессы, протекающие в организме больного. Согласно имеющимся в литературе данным, наиболее информативными и клинически значимыми показателями для лабораторной диагностики остеоартрозного процесса в синовиальной жидкости являются показатели уоновых кислот и общего белка [12]. В то же время, существует мнение, что биохимические характеристики вообще не обладают достаточно высокой диагностической специфичностью и не дают возможности дифференцировать стадии ОА [13]. Проведённое нами исследование во много подтвердило последнюю позицию. Так, было обнаружено, что степень тяжести заболевания мало отражается на изменении таких биохимических показателей, как ТБК-РП и общий белок. Однако, определение содержания карбонильных групп в синовии позволило выявить заметную корреляцию между их концентрацией и стадией ОА: 50% обследованных с третьей стадией ОА имели такие высокие показатели данного параметра, которые не были отмечены у больных ни с одной другой стадией заболевания.

Как видно из представленных в таблицах данных, проведение специфического медикаментозного лечения приводит к значительному снижению, а ряде случаев позволяет свести к норме, исследуемые в работе биохимические показатели. Наилучшие результаты в данном направлении были получены в отношении ранних и поздних маркеров ОМБ. Так, в работе было выявлено, что повышение уровня карбонильных групп у больных остеоартрозами в СЖ довольно велико и в ряде случаев превышает норму более чем в 18 раз, а вследствие специфической фармакотерапии прослеживается ясно выраженная тенденция к снижению данного параметра или достижение им уровня физиологического значения. В связи с этим, мы полагаем, что именно этот показатель является наиболее клинически значимым для лабораторной диагностики и может служить тестом не только глубины метаболических нарушений при данной патологии, но и использоваться для контроля хода и оценки эффективности лечебных мероприятий.

Полученные в работе данные по исследованию концентрации карбонильных групп, алифатических альдегидов основных аминокислот, ТБК-РП и белка в СЖ больных ОА коленного сустава до и после проведения медикаментозного лечения позволяют нам сделать следующие выводы. Во-первых, данное заболевание протекает на фоне ярко выраженного окислительного стресса, характеризующегося значительной интенсификацией процессов окислительной деструкции белков синовия и свободнорадикального окисления липидов. Во-вторых, развитие дегенеративно-дистрофического процесса в СЖ поражённого сустава сопровождается увеличением общего белка. В-третьих, проведение специфической фармакотерапии с использованием в качестве лечебных препаратов алфлутопа и дипроспана позволяет в значительной мере снизить активность прооксидантной системы, а в некоторых случаях привести анализируемые биохимические параметры к уровню физиологического значения. В-четвертых, наиболее клинически значимым показателем для лабораторной диагностики остеоартрозного процесса является показатель концентрации карбонильных групп в синовиальной жидкости больных ОА коленного сустава.

ЛИТЕРАТУРА

1. Губский Ю.И., Беленичев И.Ф., Левицкий Е.Л., Коваленко С.И., Павлов С.В., Ганчева О.В., Марченко А.Н. (2005) Совр. пробл. токсикол., **3**, 54-65.
2. Дубинина Е.Е., Морозова М.Г., Гавровская С.В., Кузмичь Е.В., Леонова Н.В. (2002) Биохимия, **7**(3), 413-421.
3. Smith C.D., Carney J.M., Starke-Reed P.E., Oliver C.N., Stadtman E.R., Floyd R.A., Markesbery W.R. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **88**, 10540-10543.
4. Дубинина Е.Е., Морозова М.Г., Леонова Н.В., Гампер Н.Л., Солитернова И.Б., Нуллер Ю.Л., Бутома Г.Б., Ковругина С.В. (2000) Вопр. мед. химии, **46**, 24-29.
5. Тугушева Ф.А., Куликова А.И., Зубина И.М. (1993) Вопр. мед. химии, **39**, 18-21.
6. Арцукевич А.Н., Мальцев А.Н., Зинчук В.В. (2000) Биохимические аспекты жизнедеятельности биологических систем. Сбор. науч. трудов съезда биохимиков Беларуси, Гродно, с. 19-23.
7. Овсиенко О.В. (2008) Укр. ревматол. ж., **32**(2), 30-37.
8. Поливода А.Н., Вишневский В.А. (2009) Одесский мед. ж., **113**(3), 38-40.
9. Алексеева Л.И. (2003) Научно-практическая ревматология, **5**, 20-24.
10. Альдебель М.М. (2000) Биохимические показатели крови, почек крыс с экспериментальным хроническим гломерулонефритом. Дисс. докт. наук, Спб.
11. Мещерякова М.Г., Алпатова Т.Ф., Трилис Я.Г., Мухин И.А., Кириллова Н.В. (2009) Сборник научных трудов: Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции, Вып. 64.- Пятигорск, с. 468-471.

12. *Матвеева Е.Л.* (2007) Биохимические изменения в синовиальной жидкости при развитии дегенеративно-дистрофических процессов в коленном суставе. Дисс. докт. наук, Российский научный центр "Восстановительная травматология и ортопедия" им. Акад. Г.А. Илизарова Росздрава, Тюмень.
13. *Корж Л.А., Черных В.П., Филиппенко В.А.* (1997) Диагностика и консервативное лечение заболеваний и повреждений опорно-двигательной системы: Справ.: В 8 кн. Кн. 2. Остеоартроз, Основа, Харьков.

Поступила: 30. 09. 2010.

SOME BIOCHEMICAL PARAMETERS OF THE SYNOVIAL LIQUID FOR ESTIMATION OF EFFECTIVENESS OF THE TREATMENT OF THE KNEE JOINT OSTEOARTHRISIS

M.G. Meshcheryakova¹, Ya.G. Trilis¹, N.V. Kirillova¹, A.T. Alpatova¹, I.A. Muhin², A.A. Kozhevnikov²

¹Saint-Petersburg State Chemical-Pharmaceutical Academy, Federal Agency for Public Health and Social Development, Russian Federation, ul. Prof. Popova, 14, St.-Petersburg, 197376 Russia; tel.: (8-812)234-90-33; fax: (8-812)234-60-44; e-mail: rector@spcra.ru

²Heriatric ortopedical hospital, St.-Petersburg, Russia

The knee joint osteoarthritis is accompanied by activation of the oxidative stress in the synovial liquid. Specific treatment decreased or even normalized such biochemical parameters of the synovial liquid as the carbonyl groups, thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and total protein content. The most demonstrative changes were found for early and late markers of the oxidative modification of proteins. These parameters may be used in laboratory diagnostics of the depth of the degenerative-dystrophic process in the knee joint and for the estimation of the effectiveness of the treatment.

Key words: oxidative stress, oxidative proteins modification, lipid peroxidation, carbonyl groups, synovial liquid, osteoarthritis.