

© Коллектив авторов, 2012  
УДК 616.728.3-007.248-008.9

## ИССЛЕДОВАНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА В КРОВИ БОЛЬНЫХ ОСТЕОАРТРОЗОМ КОЛЕННОГО СУСТАВА

Я.Г. Трилис<sup>1</sup>, М.Г. Мещерякова<sup>1</sup>, Н.В. Кириллова<sup>1</sup>, Т.Ф. Алтамова<sup>1</sup>,  
И.А. Мухин<sup>2</sup>, А.А. Кожевин<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия,  
г. Санкт-Петербург

<sup>2</sup> Городская гериатрическая больница (ортопедическая), г. Санкт-Петербург

**В работе проведено комплексное лабораторное обследование больных разных стадий остеоартроза коленного сустава. Выявлены закономерности метаболических расстройств у больных остеоартрозом в виде активации прооксидантной системы и угнетения ферментативного звена антиоксидантной защиты. Показано, что степень окислительного стресса четко коррелирует с тяжестью клинических проявлений остеоартроза. Выявлены наиболее клинически значимые для лабораторной диагностики данной патологии показатели крови, такие как алифатические альдегидные группы окисленных белков и активность параоксаназы.**

**Ключевые слова:** остеоартроз, прооксидантная система, антиоксидантная система, окислительная модификация белков, свободнорадикальное окисление липидов, супероксиддисмутаза, каталаза, миелопероксидаза, параоксаназа.

Важность изучения патогенеза остеоартроза (ОА) обусловлена распространенностью заболевания – эпидемиологические исследования показывают, что им болеет 10-12% населения всех возрастов, в том числе 50% лиц старше 60 лет. По прогнозам ВОЗ, ОА в ближайшие 10-15 лет станет четвертой основной причиной инвалидности у женщин и восьмой у мужчин [1]. Считается, что универсальным механизмом патогенеза ОА является нарушение равновесия между процессами синтеза и деградации компонентов хряща. Ключевая роль при этом отводится, во-первых, нарушению функционирования хондроцитов, которые начинают продуцировать «неполноценные» низкомолекулярные белки матрикса, и, во-вторых, биохимическим нарушениям, изменениям активности ферментов в суставной ткани. Механизм формирования и развития данных ведущих звеньев патогенеза ОА является до сих пор до конца невыясненным. При этом специфические процессы ОА

изучены гораздо лучше, чем неспецифические реакции, а ведь именно последние несут, прежде всего, защитный, сформированный эволюцией характер. В основе развития ОА лежат такие типичные патологические процессы, как дегенерация тканей, воспаление и стресс, системный ответ организма на которые включает в себя активацию свободнорадикальной дестабилизации клеток, как в зоне локального поражения, так и далеко за ее пределами. При этом сбалансированность прооксидантной (ПОС) и антиоксидантной (АОС) систем является обязательным условием здоровья, показателем адапционных и защитных возможностей организма. Исходя из этих предпосылок, целью нашего исследования явилось изучение корреляции между активностями ПОС и АОС систем у больных ОА, установление их патогенетической взаимосвязи с тяжестью клинических проявлений ОА коленного сустава, выявление новых

объективных критериев оценки тяжести данной патологии.

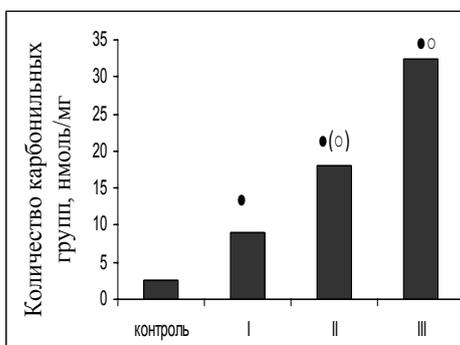
### Материалы и методы

В работе было обследовано 177 пациентов (женщин) в возрасте от 40 до 60 лет, у которых был диагностирован ОА коленного сустава I (51 человек), II (61 человек) и III (65 человек) стадии, согласно клинико-рентгенологической классификации деформирующего остеоартроза по Н.С.Косинской и Д.Г. Рохлину [3]. Контрольную группу составили 45 здоровых женщин. Забор крови осуществляли в утренние часы натощак. В качестве антикоагулянта использовали гепарин. О состоянии активности ПОС судили по окислительной модификации белков и перекисному окислению липидов. Окислительную модификацию белков оценивали по количеству входящих в их состав алифатических альдегидных и карбонильных групп по методу, основанному на спектрофотометрическом определении образовавшихся в процессе анализа динитрофенилгидразонов [7]. Для оценки интенсивности свободнорадикального окисления липидов измеряли уровень малонового диальдегида [8]. Содержание общего белка определяли по методу Лоури. Состояние ферментативного звена АОС оценивали по активности супероксиддисму-

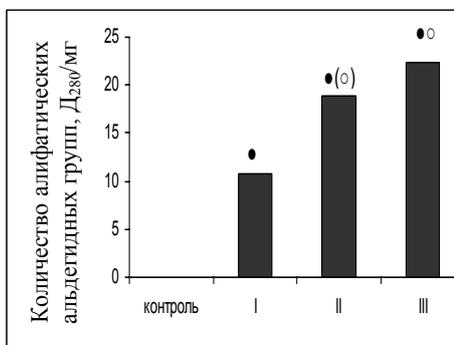
тазы (СОД), каталазы, миелопероксидазы и параоксаназы, оцениваемых спектрофотометрическими методами. Активность СОД определяли методом, основанным на использовании реакции супероксидзависимого окисления кверцетина [5]. Активность каталазы – по скорости разложения перекиси водорода [9]. Для определения активности миелопероксидазы с использованием наборов ЗАО «Алкор Био» в качестве субстрата-восстановителя выступал ортодианизидин [6]. Арилэстеразную активность параоксаназы определяли с использованием в качестве субстрата ацетилтиоэстера [11]. Наряду с определением абсолютных величин исследуемых показателей, был проведен анализ распределения больных по группам внутри каждой степени болезни в зависимости от значения исследуемого показателя. Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы Statistica 5,0 Windows.

### Результаты и их обсуждение

В результате исследования окислительной модификации белков (рис.1,2) в плазме крови больных ОА коленного сустава было выявлено повышение количества карбонильных и алифатических альдегидных групп окисленных белков на всех стадиях болезни.



**Рис. 1.** Уровень карбонильных групп белков плазмы крови на разных стадиях остеоартроза.



**Рис. 2.** Уровень алифатических альдегидных групп белков плазмы крови на разных стадиях остеоартроза.

Примечания: на рисунках 1-6 на оси X обозначены I, II, III стадии остеоартроза. Условные обозначения на рисунках 1-6: ● – достоверность различия по сравнению с донорами ( $p \leq 0,05$ ), ° и (°) – соответственно достоверность ( $p \leq 0,05$ ) и тенденция ( $p \leq 0,1$ ) различия по сравнению с I стадией болезни.

Степень окислительной модификации белков коррелировала с тяжестью заболевания, на III стадии ОА было установлено значительное, более чем в 20 раз нарастание содержания карбонильных групп, уровень же алифатических альдегидных групп оказался катастрофически большим –  $22,8 \pm 3,0$  Д<sub>280</sub>/мг у больных по сравнению со следовыми количествами у здоровых людей.

Повышение уровня карбонильных и алифатических альдегидных групп окисленных белков показано на фоне снижения содержания общего белка в плазме крови у 70% пациентов. По-видимому, снижение уровня общего белка в плазме крови больных может быть связано с использованием окисленных белков в качестве субстрата для протеолитических ферментов.

Уровень малонового диальдегида, обладающего выраженным мембранотоксическим действием, в плазме крови больных ОА был повышен на всех стадиях ОА. Из всей выборки обследованных только у 9,4% пациентов уровень МДА в плазме крови регистрировался в области физиологических значений, у большинства – концентрация малонового диальдегида повышалась в 2,3 – 3,9 раза, у 9,5 % больных – 8,7 раз.

Анализируя результаты, можно полагать, что развитие ОА коленного сустава

происходит на фоне интенсификации окислительного стресса у обследованных больных. Маркером, наиболее информативно отражающим степень поражения суставов, очевидно, является уровень алифатических альдегидных групп в окисленных белках крови больного.

Изучение активности СОД (рис. 3) выявило существенное подавление активности этого ключевого фермента АОС в плазме крови и в эритроцитарной взвеси у всех обследованных больных. У пациентов со II и III стадиями ОА степень изменений активности СОД была наиболее выраженной, активность СОД была более чем в 50 раз ниже в эритроцитарной массе и в более чем в 20 раз ниже в плазме крови у больных, по сравнению со здоровыми людьми. Для этих же групп больных отмечено наибольшее количество обследованных со следами активности фермента в крови.

Изучение активности каталазы (рис.4) в эритроцитах больных показало достоверное ингибирование данного фермента-антиоксиданта, однако степень подавления каталазы была на порядок меньше, чем ингибирование СОД. Подавление активности каталазы, а также процент больных с практически полным инактивированием фермента коррелировал с тяжестью заболевания и был максимальным у больных II и III степени.

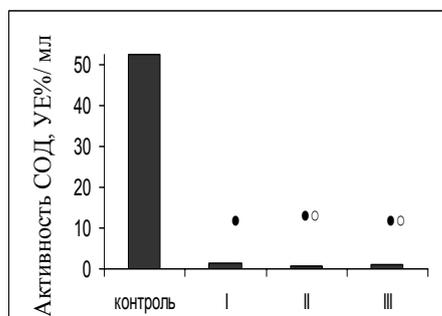


Рис. 3. Активность СОД в эритроцитарной массе на разных стадиях остеоартроза.

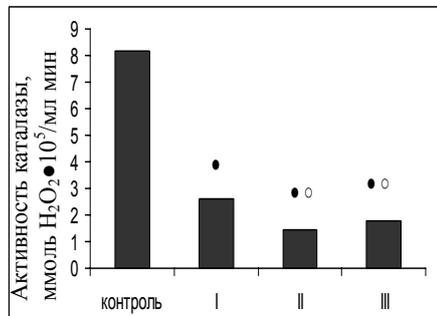


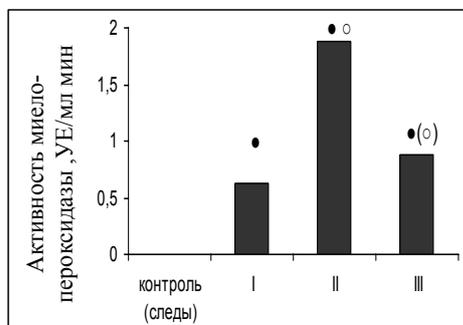
Рис. 4. Активность каталазы в эритроцитарной массе на разных стадиях остеоартроза.

Примечания: на рисунках 1-6 на оси X обозначены I, II, III стадии остеоартроза. Условные обозначения на рисунках 1-6: ● – достоверность различия по сравнению с донорами ( $p \leq 0,05$ ), ° и (°) – соответственно достоверность ( $p \leq 0,05$ ) и тенденция ( $p \leq 0,1$ ) различия по сравнению с I стадией болезни.

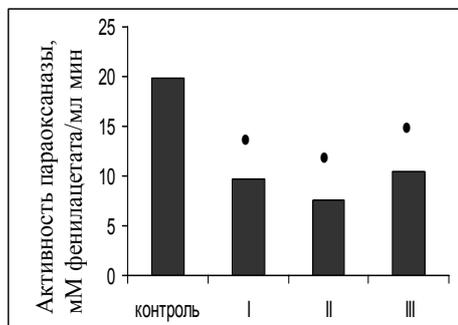
Установленные в нашей работе существенные снижения активности СОД и каталазы могут быть связаны с локальными нарушениями в области активного центра ферментов под влиянием активных форм кислорода. Эти нарушения могут быть связаны с окислительной модификацией аминокислотных остатков (серосодержащих аминокислот, аспарагина, гистидина, тирозина, лизина, пролина, триптофана и серина), изменением валентности и нарушением координационной геометрии металлов для ряда металлзависимых ферментов. Так, возможность модификации СОД и каталазы кислородными радикалами показана в ряде работ [3,10].

Исследование активности миелопероксидазы (рис.5), в значительной степе-

ни являющейся функциональным синергистом каталазы, выявило существенную активность фермента в плазме больных ОА, в то время как плазме крови здоровых людей наблюдался лишь следовой уровень активности лейкоцитарного фермента. Такая значительная активность миелопероксидазы в плазме крови больных свидетельствует об усиленной продукции гипогалоидов, способствует избыточной продукции пероксинитрита и свидетельствует о выраженных деструктивных изменениях клеточных мембран и дегрануляции нейтрофильных лейкоцитов. Наиболее значимое увеличение миелопероксидазной активности в плазме крови наблюдалось у больных II стадии ОА.



**Рис. 5.** Активность миелопероксидазы в плазме крови на разных стадиях остеоартроза.



**Рис. 6.** Активность параоксаназы в плазме крови на разных стадиях остеоартроза.

*Примечания:* на рисунках 1-6 на оси X обозначены I, II, III стадии остеоартроза. Условные обозначения на рисунках 1-6: • – достоверность различия по сравнению с донорами ( $p \leq 0,05$ ), ° и (°) – соответственно достоверность ( $p \leq 0,05$ ) и тенденция ( $p \leq 0,1$ ) различия по сравнению с I стадией болезни.

Для этой же стадии заболевания характерно и наименьшее количество больных со следовой активностью фермента. Очевидно, образующиеся гипогалогениты, обладающие более выраженными цитотоксическими свойствами, нежели перекись водорода, способствуют развитию осложнений. Поэтому, в данном случае, активизация фермента является дезадаптационной.

При исследовании в плазме крови активности параоксаназы (рис.6), ассоциированной с липопротеинами высокой плотно-

сти, обладающими антиоксидантной активностью, было показано понижение уровня ее активности на всех стадиях ОА. Отметим, что из всех изученных в работе ферментов АОС активность только параоксаназы у групп пациентов I и II стадий сохранялась на уровне, сопоставимом с контролем. Полная инактивация параоксаназы у некоторых пациентов была выявлена только на III стадии заболевания.

Анализ полученных данных указывает на развитие интенсивного окислительного стресса при ОА коленного сус-

тава. Наиболее вероятным начальным патологическим сдвигом, возникающим при ОА, считают активацию митотического деления клеток хряща, их адгезию с увеличением ими синтеза протеогликанов и коллагена II типа, гипертрофию. Причиной этих явлений может явиться преобладание активности ПОС над АОС, поскольку известно, что активные формы кислорода выполняют роль сигнальных молекул, влияя на процессы роста клеток, их дифференциацию, адгезию, экспрессию генов, антиоксиданты же обладают способностью подавлять клеточную пролиферацию [2,3]. Повышение уровня активных форм кислорода, окислительная деструкция ферментов способны инактивировать СОД и каталазу [3,10]. Кроме того, окисленные белки, как известно, способны выступать в качестве источника свободных радикалов, что может приводить к истощению запасов клеточных антиоксидантов. Низкая активность ферментов АОС усугубляет повышение уровня свободных радикалов, приводя к прогрессированию дегенеративных повреждений суставного хряща. В нашей работе была продемонстрирована зависимость между степенью активации ПОС, подавления АОС и степенью тяжести ОА. Представляется, что на I стадии болезни организм еще способен бороться с активизацией ПОЛ за счет работы АОС, а на II и III стадиях заболевания происходит срыв адаптационных систем организма.

#### Выводы

1. Степень окислительного стресса, сопровождающего остеоартроз коленного сустава, четко коррелирует с тяжестью клинических проявлений данной патологии.
2. В целях объективной оценки состояния больных ОА, прогнозирования течения заболевания целесообразен мониторинг таких показателей крови, как уровень алифатических альдегидных групп в белках и активность параоксаназы.

#### Литература

1. Основные задачи Международной декады в совершенствовании борьбы с наи-

более распространенными заболеваниями опорно-двигательного аппарата в России / А.И. Вялков [и др.] // Научно-практическая ревматологическая конференция. – 2001. – N 2. – С. 4-13.

2. Гомазков О.А. Окислительный стресс на молекулярном, клеточном и органном уровнях / О.А. Гомазков // Биохимия. – 2003. – Т. 68, вып. 7. – С. 1005-1006.
3. Дубинина Е.Е. Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток / Е.Е. Дубинина. – СПб.: Медицинская пресса, 2006. – 400 с.
4. Косинская Н.С. Рабочая классификация и общая характеристика поражений костно-суставного аппарата / Н.С. Косинская, Д.Г. Рохлин. – Л.: Медгиз, 1961. – 175 с.
5. Костюк В.А. Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кварцетина / В.А. Костюк, А.И. Потапович, Ж.В. Ковалева // Вопр. мед. химии. – 1990. – Т. 36, №2. – С. 88-91.
6. Новые подходы к определению концентрации и пероксидазной активности миелопероксидазы в плазме крови человека / И.В. Горудко [и др.] // Биоорганическая химия. – 2009. – Т. 35, № 5. – С. 629-639.
7. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека. Методы ее определения / Е.Е. Дубинина [и др.] // Вопросы медицинской химии. – 1995. – Т. 41, № 1. – С. 24-26.
8. Справочник по лабораторным методам исследования / под ред. Л.А. Даниловой. – СПб.: Питер, 2003. – С. 396.
9. Beutler E. Red Cell Metabolism A manual biochemical Methods / E. Beutler. – New York: Grune Stratton, 1975. – P. 89-90.
10. Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. / K.J.A Davies [et al.] // J. Biol.Chem. – 1987. – Vol. 262, № 20. – P. 9895-9901.
11. Draganov D.I. Pharmacogenetics of paraoxonases / D.I. Draganov, B.N. La Du // J. Lipid Research. – 2000. – Vol. 41. – P. 1358-1363.

## RESEARCH OF THE INDICATORS OF THE OXIDATIVE STRESS IN THE OSTEOARTHRISIS OF THE BLOOD

*Ya.G. Trilis, M.G. Mescheryakova, N.V. Kirillova, T.F. Alpatova,  
I.A. Muhin, A.A. Kozhevin*

**Complex laboratory examination of patients of the different diseases of the knee joint osteoarthritis was detected the regularity of metabolic disorders in the form of the activation of the prooxidativ system and the inhibition of enzymatic part of the antioxidativ system. The correlation between the degree of the oxidative stress and the severity of clinical manifestations of the osteoarthritis was established. The most relevant clinically indicators of blood for laboratory diagnosis of the osteoarthritis such as the aliphatic aldehyde groups of the oxidated proteins and the activity of the paraoxanase were identified.**

**Key words:** *osteoarthritis, prooxidativ system, antioxidativ system, oxidative modification of proteins, free radical oxidation of lipides, superoxide dismutase, catalase, myeloperoxidase, paraoxanase.*

Трилис Я.Г. – к.б.н., доцент, доцент каф. биохимии Санкт-Петербургской государственной химико-фармацевтической академии,  
г. Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, 14.  
E-mail: yana\_trilis@mail.ru.

Мещерякова М.Г. – к.б.н., доцент, доцент каф. биохимии Санкт-Петербургской государственной химико-фармацевтической академии.  
г. Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, 14.

Кириллова Н.В. – д.б.н., профессор, профессор, зав. каф. биохимии Санкт-Петербургской государственной химико-фармацевтической академии.  
г. Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, 14.

Алпатова Т.Ф. – аспирант каф. биохимии Санкт-Петербургской государственной химико-фармацевтической академии.

г. Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, 14.

Мухин И.А. – к.м.н., зав. отделения реабилитации Городской гериатрической (ортопедической) больницы г. Санкт-Петербурга.

г. Пушкин, Павловское шоссе, 56.

Кожевин А.А. – к.м.н., врач отделения реабилитации Городской гериатрической (ортопедической) больницы г. Санкт-Петербурга.

г. Пушкин, Павловское шоссе, 56.