

АКТИВНОСТЬ АНТИОКСИДАНТНЫХ ЭНЗИМОВ В ЛИМФОЦИТАХ, ЭРИТРОЦИТАХ И ПЛАЗМЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ СИСТЕМНОЙ КРАСНОЙ ВОЛЧАНКОЙ

Зборовская И.А., Рогаткина Т.Ф., Мякишев М.В., Мартемьянов В.Ф., Стажаров М.Ю., Бедина С.А., Мозговая Е.Э.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной ревматологии» Российской академии медицинских наук, Волгоград, Россия (400138, Волгоград, ул. им. Землячки, 76), e-mail: mstazharov@yandex.ru.

В лизатах лимфоцитов, эритроцитов и плазме крови 66 больных системной красной волчанкой (СКВ) определяли активность супероксиддисмутазы (СОД), глутатионпероксидазы (ГП), глутатионредуктазы (ГР), каталазы (КАТ), изоферменты СОД в эритроцитах и содержание малонового диальдегида (МДА). У больных с I степенью активности патологического процесса, по сравнению со здоровыми, в плазме ниже активность каталазы, СОД, ГП и больше МДА ($p < 0,01-0,001$), в эритроцитах ниже активность СОД, ГП, ГР и больше изоферменты СОД-1 ($p < 0,001$), в лимфоцитах выше активность СОД, ГП и ГР ($p < 0,05-0,01$). Чем выше активность процесса и острее течение болезни, тем в плазме выше активность ГП, ГР и содержание МДА, в эритроцитах выше активность СОД, ГП, ГР, в лимфоцитах ниже активность СОД, ГП и ГР. Между степенями активности процесса и вариантами течения заболевания выявлены статистически значимые энзимные различия. Определение активности СОД, ГП, ГР, каталазы способствует уточнению степени активности, характера течения и объективизации оценки эффективности терапии.

Ключевые слова: системная красная волчанка, супероксиддисмутаза, глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза, каталаза, малоновый диальдегид.

THE ACTIVITIES OF ANTIOXIDANT ENZYMES IN ERYTHROCYTE, LYMPHOCYTE AND BLOOD PLASMA OF SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS PATIENTS

Zborovskaya I.A., Rogatkina T.F., Myakishev M.V., Martemyanov V.F., Stazharov M.Y., Bedina S.A., Mozgovaya E.E.

Federal State Budgetary Institution « Research Institute of Clinical and Experimental Rheumatology» under the Russian Academy of Medical Sciences (400138, Volgograd, street Zemlyachki, 76), e-mail: mstazharov@yandex.ru.

Superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GP), glutathione reductase (GR), catalase (CAT) activities were determined in erythrocyte lysate, lymphocyte lysate and blood plasma of 66 systemic lupus erythematosus (SLE) patients. SOD isozymes in erythrocytes and the level of malondialdehyde (MDA) in blood plasma of these patients were determined in addition. CAT, SOD, GP activities in blood plasma, SOD, GP, GR activities in erythrocyte lysate were lower; SOD, GP, GR activities in lymphocyte lysate, MDA level were higher and SOD-1 isoenzyme fraction was more in patients with the 1st degree of the pathological process activity in comparison with healthy people. The increase of the pathological process activity as well as the acute course of the SLE was accompanied by the increase of GP, GR activities in blood plasma, SOD, GP, GR activities in erythrocyte lysate, MDA level and the decrease of SOD, GP, GR activities in lymphocyte lysate. The essential enzyme differences were revealed between all activity degrees and variants of the disease. The definition of SOD, GP, GR, CAT activities helps to diagnose the degree of the pathological process activity, character of the course and also helps monitor the effectiveness of SLE therapy.

Keywords: systemic lupus erythematosus, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, glutathione reductase, catalase, malondialdehyde.

Введение. Системная красная волчанка (СКВ) характеризуется разнообразными поражениями внутренних органов и различных систем организма, неуклонно прогрессирующим течением, значительно ухудшающим качество жизни и сокращающим его продолжительность. Недостаточная эффективность лечения больных СКВ во многом обусловлена неясностью этиологии и патогенеза. Ведущее место в патогенезе СКВ отводится иммунным нарушениям, но, вероятно, что не только они полностью обуславливают патогенез, так как

одни иммунотропные препараты не достигают отличного эффекта в лечении. Исследованиями последних лет показано, что в повреждении соединительно-тканых структур различных органов и систем в ходе развития и прогрессирования «волчаночного» процесса принимают участие и реакции свободнорадикального и перекисного окисления, продукты которых могут менять антигенные структуры клеток тканей и инициировать иммунные процессы. Препятствуют интенсификации свободнорадикального окисления две системы антиоксидантной защиты – ферментативная (витамины А и К, токоферолы, глутатион, аскорбиновая кислоты и другие вещества) и ферментативная, в которую входят супероксиддисмутаза (СОД), глутатионпероксидаза (ГП), глутатионредуктазы (ГР), каталаза (КАТ) и другие. Изучению указанных антиоксидантных ферментов в крови больных СКВ посвящена данная работа.

Цель исследования. Повышение качества диагностики активности патологического процесса и характера течения у больных СКВ с использованием показателей активности СОД, ГП, ГР, КАТ в лимфоцитах, эритроцитах и плазме крови, объективизации контроля эффективности лечения больных.

Материал и методы исследований. Под наблюдением в условиях стационара находились 66 больных СКВ. Диагностика СКВ проводилась на основании критериев Американской коллегии ревматологов [7]. Контингент больных был представлен 60 (90,9 %) женщинами и 6 (9,1 %) мужчинами. Средний возраст больных ($M \pm m$) – $38,4 \pm 1,8$ лет, продолжительность болезни – $6,2 \pm 1,5$ лет. В соответствии с общепринятыми классификационными критериями СКВ [5] первая степень активности патологического процесса определялась у 19 (28,8 %) больных, II степень – у 43 (65,2 %), III степень – у 4 (6,1 %) больных. В связи с малочисленностью больных с III степенью, они были объединены с больными с II степенью. Хроническое течение установлено у 22 (33,3 %), подострое у 44 (66,7 %) больных. Суставной синдром определялся в 75,8 % случаев, кожные поражения в 62,1 %, поражения почек – в 65,2 %, сердца – в 56,1 %, легких – в 25,8 % случаев. LE-клетки обнаружены в 59,1 %, антинуклеарный фактор – в 87,9 % случаев. В лечении больных использовали нестероидные противовоспалительные препараты, глюкокортикоиды, метотрексат, циклофосфамид, азатиоприн. Дозы препаратов зависели от активности процесса, характера течения, висцеральных поражений. Контрольную группу составили 30 практически здоровых людей.

Выделение лимфоцитов и эритроцитов из венозной крови проводили по методике, предложенной А.Воуит [6]. Активность СОД и изоферментов СОД в лизатах эритроцитов определяли по методике Е.Дубининой и соавт. [1], глутатионпероксидазы – по методу Paglia V., Valentine V. [9] в модификации Ланкина В.З. и соавт. [2], глутатионредуктазы – по методике Hosoda et al. [8], каталазы – по методике Королюк М.А. и соавт. [4], содержание малонового диальдегида – по методике Коробейниковой Э.Н. [3]. Активность СОД выражали в

условных единицах на 1 мл, изоферменты СОД – в процентах, активность ГП – в мкм восстановленного глутатиона за 1 час в 1 мл, ГР – в мкм окисленного глутатиона за 1 час в 1 мл, каталазы – в мКАТ на 1 литр, содержание МДА – в нмоль/мл, результаты исследований обрабатывались с использованием программных пакетов STATISTICA 6.0.

Результаты исследований и их обсуждение. Анализ энзимных показателей в крови здоровых людей не выявил статистически значимых энзимных различий в зависимости от пола и возраста, что позволило в дальнейших исследованиях эти факторы не учитывать. У больных СКВ с I степенью активности, по сравнению со здоровыми, в плазме (табл. 1) ниже активность КАТ ($p < 0,01$), СОД, ГП и больше МДА (все $p < 0,001$), в эритроцитах ниже активность СОД, ГП, ГР и больше изоэнзимы СОД-1 (все $p < 0,001$), в лимфоцитах выше активность СОД ($p < 0,01$), ГП и ГР ($p < 0,05$).

Таблица 1. Активность ферментов в крови больных СКВ при поступлении на лечение

Контингент	Кол-во б-ых	Стат. пок-ли	СОД	ГП	ГР	СОД-1	КАТ	МДА
плазма								
Здоровые	30	M m	5,4 0,19	1,1 0,04	1,6 0,05	–	24,8 1,6	3,4 0,09
Больные СКВ I степень	19	M m	0,82 0,08	0,81 0,05	1,5 0,1	–	19,0 1,5	6,4 0,3
Больные СКВ II степень	47	M m	1,3 0,09	1,6 0,07	1,9 0,1	–	18,2 0,09	7,6 0,2
Хроническое течение	22	M m	0,72 0,05	0,85 0,05	1,4 0,06	–	20,1 1,2	6,5 0,4
Подострое течение	44	M m	1,7 0,1	1,7 0,07	2,2 0,1	–	18,3 1,0	7,4 0,3
эритроциты								
Здоровые	30	M m	40,0 2,6	235,4 9,9	115,3 3,87	26,6 1,1	–	–
Больные СКВ I степень	19	M m	21,9 3,8	133,8 8,9	64,8 7,5	49,7 1,9	–	–
Больные СКВ II степень	47	M m	62,8 3,5	264,8 9,7	136,8 3,6	42,0 2,3	–	–
Хроническое течение	22	M m	18,8 2,5	131,2 6,8	70,2 5,8	53,6 1,7	–	–
Подострое течение	44	M m	65,9 3,1	267,3 7,9	135,0 3,8	39,0 2,1	–	–
лимфоциты								
Здоровые	30	M m	3,8 0,1	295,1 14,4	195,2 13,1	–	–	–
Больные СКВ I степень	19	M m	4,31 0,18	364,7 28,8	244,2 18,9	–	–	–
Больные СКВ II степень	47	M m	2,68 0,06	66,9 16,2	117,9 9,68	–	–	–
Хроническое течение	22	M	4,0	330,0	219,6	–	–	–

		m	0,12	18,9	12,2			
Подострое течение	44	M m	3,15 0,12	205,7 20,5	143,2 13,1	–	–	–

Через 10–12 дней лечения, по сравнению с поступлением, в плазме повысилась активность ГП ($p < 0,01$), в эритроцитах уменьшились изоэнзимы СОД-1 ($p < 0,05$); в лимфоцитах только наметилась тенденция к нормализации активности СОД, ГП и ГР ($p > 0,05$).

По окончании курса лечения (табл. 2) в плазме существенно повысилась активность СОД ($p < 0,001$), ГП ($p < 0,01$), уменьшилось содержание МДА ($p < 0,001$); в эритроцитах повысилась активность СОД ($p < 0,05$), ГП ($p < 0,001$), ГР ($p < 0,01$), уменьшились изоферменты СОД-1 ($p < 0,001$); в лимфоцитах снизилась активность ГП и ГР ($p > 0,05$).

Таблица 2. Активность ферментов в крови больных СКВ по окончании лечения

Контингент	Кол-во б-ых	Стат. пок-ли	СОД	ГП	ГР	СОД-1	КАТ	МДА
плазма								
Здоровые	30	M m	5,4 0,19	1,1 0,04	1,6 0,05	–	24,8 1,6	3,4 0,09
Больные СКВ I степень	19	M m	3,4 0,3	1,04 0,06	1,4 0,1	–	22,9 1,2	4,2 0,4
Больные СКВ II степень	47	M m	4,1 0,3	1,3 0,07	1,5 0,06	–	21,6 1,4	5,2 0,4
Хроническое течение	22	M m	2,6 0,2	0,95 0,05	1,5 0,05	–	22,8 0,9	4,0 0,5
Подострое течение	44	M m	5,7 0,4	1,3 0,02	1,7 0,07	–	21,7 1,1	5,0 0,4
эритроциты								
Здоровые	30	M m	40,0 2,6	235,4 9,9	115,3 3,87	26,6 1,1	–	–
Больные СКВ I степень	19	M m	36,9 3,8	187,6 10,3	95,6 5,2	32,8 1,7	–	–
Больные СКВ II степень	47	M m	47,9 2,8	212,3 7,8	113,4 5,8	31,3 1,3	–	–
Хроническое течение	22	M m	31,0 2,8	192,5 10,6	91,1 5,9	35,9 1,6	–	–
Подострое течение	44	M m	50,5 3,9	221,3 6,8	115,1 3,9	28,9 1,1	–	–
лимфоциты								
Здоровые	30	M m	3,8 0,1	295,1 14,4	195,2 13,1	–	–	–
Больные СКВ I степень	19	M m	3,96 0,05	301,4 12,1	202,0 6,92	–	–	–
Больные СКВ II степень	47	M m	3,54 0,04	246,3 12,5	176,4 4,9	–	–	–
Хроническое течение	22	M m	3,86 0,03	289,4 9,75	196,7 5,0	–	–	–
Подострое течение	44	M m	3,61 0,04	265,3 9,39	180,1 5,41	–	–	–

При сравнении изученных показателей после проведенного лечения с показателями здоровых лиц оказалось, что показатели активности ГП и ГР не имеют отличий от здоровых в плазме, в эритроцитах – СОД, в лимфоцитах – СОД, ГП и ГР, и только активность плазменной СОД ($p < 0,001$), эритроцитарных ГП и ГР ($p < 0,01$) оказались ниже, чем у здоровых, а активность КАТ ($p < 0,05$), изоферментов СОД-1 ($p < 0,01$), содержание МДА ($p < 0,05$) были выше, чем у здоровых.

У больных СКВ с II–III степенью активности процесса, по сравнению со здоровыми, (табл. 1) в плазме выше активность ГП ($p < 0,001$), ГР ($p < 0,01$), больше изоэнзимы СОД-1 ($p < 0,001$), МДА ($p < 0,001$), ниже активность СОД и КАТ (все $p < 0,001$); в эритроцитах выше активность СОД ($p < 0,001$), ГП ($p < 0,05$), ГР ($p < 0,001$); в лимфоцитах ниже активность СОД ($p < 0,001$), ГП ($p < 0,001$) и ГР ($p < 0,01$).

Через 10–12 дней лечения, по сравнению с поступлением, в плазме наблюдалось снижение активности ГР ($p < 0,05$), в эритроцитах снизилась активность ГР ($p < 0,001$); в лимфоцитах повысилась активность СОД. Динамика других энзимных показателей была статистически малозначимой ($p > 0,05$). По окончании курса лечения (табл. 2), по сравнению с первоначальным этапом, в плазме уменьшились изоэнзимы СОД-1 ($p < 0,01$), содержание МДА ($p < 0,001$), снизилась активность ГП ($p < 0,001$), ГР ($p < 0,01$), повысилась активность СОД ($p < 0,001$) и КАТ ($p < 0,05$); в эритроцитах снизилась активность СОД ($p < 0,01$), ГП и ГР ($p < 0,001$), в лимфоцитах повысилась активность СОД, ГП и ГР (все $p < 0,001$).

После проведенного лечения в стадии начинающейся клинической ремиссии не имели отличий от здоровых ($p > 0,05$) в плазме показатели активности ГП и ГР, в эритроцитах – СОД, в лимфоцитах – ГР, но активность СОД в плазме ($p < 0,05$), каталазы ($p < 0,001$), в лимфоцитах – активность ГП ($p < 0,05$) были ниже, а МДА (все $p < 0,001$) и изоферменты СОД-1 ($p < 0,05$) были больше, чем у здоровых.

Сравнительный анализ показал, что у больных с II–III степенью активности процесса, по сравнению с больными с I степенью, в плазме выше активность СОД ($p < 0,001$), ГП ($p < 0,001$), ГР ($p < 0,05$), больше МДА ($p < 0,01$); в эритроцитах выше активность СОД, ГП, ГР (все $p < 0,001$), меньше изоэнзимы СОД-1 ($p < 0,05$), в лимфоцитах ниже активность СОД, ГП и ГР (все $p < 0,001$).

У больных СКВ с хроническим течением при поступлении на лечение, по сравнению со здоровыми (табл. 1), в плазме ниже активность каталазы, ГР Г (все $p < 0,05$), СОД и ГП ($p < 0,001$), выше содержание МДА ($p < 0,001$), в эритроцитах ниже активность СОД, ГП, ГР, больше изоэнзимы СОД-1 (все $p < 0,001$); в лимфоцитах – только намечена тенденция к повышению активности СОД, ГП, ГР ($p > 0,05$).

После проведенного курса лечения в плазме повысилась активность СОД ($p < 0,001$), каталазы ($p < 0,05$), уменьшилось содержание МДА ($p < 0,05$), в эритроцитах повысилась активность СОД ($p < 0,01$), ГП ($p < 0,001$), ГР ($p < 0,05$), уменьшились изоэнзимы СОД-1 ($p < 0,001$), в лимфоцитах существенной динамики энзимных показателей не наблюдалось ($p > 0,05$). В стадии начинающейся клинической ремиссии не имели отличий от здоровых в лимфоцитах показатели активности СОД, ГП и ГР, в плазме – ГР и КАТ, но активность СОД ($p < 0,05$), ГП ($p < 0,01$), ГР ($p < 0,001$) в эритроцитах, активность СОД ($p < 0,001$), ГП ($p < 0,05$) в плазме были ниже, а изоэнзимы СОД-1 ($p < 0,05$) больше, чем у здоровых.

У больных с подострым течением при поступлении на лечение, по сравнению со здоровыми, в плазме ниже активность СОД ($p < 0,001$), КАТ (все $p < 0,01$), выше активность ГП, ГР, содержание МДА (все $p < 0,001$); в эритроцитах выше активность СОД ($p < 0,001$), ГП ($p < 0,05$), ГР ($p < 0,01$), СОД-1 ($p < 0,001$); в лимфоцитах ниже активность СОД, ГП (все $p < 0,001$) и ГР ($p < 0,01$). По окончании курса лечения все энзимные показатели в плазме и лимфоцитах, ГР и ГП в эритроцитах не имели отличий от здоровых ($p > 0,05$), и только активность СОД в эритроцитах ($p < 0,05$), содержание МДА ($p < 0,01$) остались выше, чем у здоровых.

Сравнительный анализ показал, что у больных с подострым течением, в отличие от больных с хроническим течением, в плазме выше активность СОД, ГП и ГР (все $p < 0,001$), в эритроцитах выше активность СОД, ГП и ГР, меньше изоферменты СОД-1 (все $p < 0,001$), в лимфоцитах ниже активности СОД, ГП и ГР (все $p < 0,001$). Чем острее течение заболевания, тем выше активность СОД, ГП, ГР в плазме и эритроцитах и ниже активность этих энзимов в лимфоцитах.

Обсуждение полученных результатов. Результаты проведенных исследований свидетельствуют о существенных изменениях активности изученных антиоксидантных энзимов в трех биологических средах при СКВ – в основном, в сторону снижения активности, и эти изменения во многом зависели от клинических особенностей заболевания. Так, если при I степени активности в плазме и эритроцитах отмечалось снижение активности всех энзимов – в лимфоцитах отмечалось повышение, то при II–III степенях в плазме снижалась активность только СОД, а активности ГП и ГР повышались, в эритроцитах повысилась активность всех ферментов, а в лимфоцитах их активность снизилась. Аналогичные изменения отмечались при хроническом и подостром течении. То есть, можно с определенностью заключить, что активность напрямую связана с интенсивностью воспалительного процесса. Если оценивать степень активности как количественную величину, то, исходя из теории стресса по Г. Селье, можно предположить, что количественный фактор раздражителя (степень активности) имеет

определяющее значение на качество ответа защитных сил организма, составной частью которых является ферментное звено антиоксидантной системы.

В наших исследованиях при I степени активности процесса (малый раздражитель) активность СОД, ГП и ГР в лимфоцитах повышалась, а в эритроцитах и плазме снижалась. Вероятно, что для энзимного потенциала в эритроцитах малый раздражитель недостаточен для мобилизации энзимных ресурсов защиты или в нем нет необходимости, и с этим вполне может справиться неферментативное звено. Но уже при более высокой степени активности в эритроцитах происходит полная мобилизация энзимного потенциала, а в лимфоцитах наблюдается его истощение, что приводит к значительному снижению активности СОД, ГП, ГР на фоне увеличенного содержания МДА. Вероятно, что энзимный потенциал антиоксидантной системы в лимфоцитах ниже, чем в эритроцитах, и нарушения функциональных свойств лимфоцитов, включая и иммунные, наступают при СКВ значительно раньше, что может обусловить дискоординацию иммунных процессов. Но при длительном хроническом течении болезни наблюдается и снижение энзимного потенциала и в эритроцитах.

Проведенные исследования показали, что в первые 10–12 дней лечения больных СКВ с I степенью для оценки эффективности лечения целесообразно ориентироваться: в плазме – на динамику активности ГП, в эритроцитах – на изоферменты СОД, при II–III степенях: в плазме – на динамику активности ГР, в эритроцитах – ГР и ГП, в лимфоцитах – на динамику СОД. После проведенного курса лечения больных с I степенью период начинающейся клинической ремиссии характеризуется нормализацией активности ГП и ГР в плазме, СОД – в эритроцитах, СОД, ГП, ГР – в лимфоцитах на фоне сниженной активности СОД в плазме, ГП и ГР в эритроцитах. У больных с II–III степенью активности процесса период начинающейся клинической ремиссии характеризуется нормализацией активности ГП и ГР в плазме, СОД – в эритроцитах, ГР – в лимфоцитах на фоне сниженной активности СОД и каталазы в плазме, СОД и ГП в лимфоцитах.

Выводы

1. У больных СКВ в трех биологических средах (плазме, лимфоцитах, эритроцитах) выявлены существенные изменения активности СОД, ГП, ГР, КАТ, зависящие от степени активности патологического процесса и характера течения заболевания.
2. Чем выше активность процесса и острее течение заболевания, тем в плазме выше активность ГП, ГР, содержание МДА, в эритроцитах выше активность СОД, ГП, ГР, в лимфоцитах ниже активность СОД, ГП, ГР.
3. Выявленные энзимные различия в разных биосферах способствуют уточнению степени активности процесса и характера течения болезни.

4. Показатели активности СОД, ГП, ГР в процессе лечения способствуют объективизации оценки эффективности проводимой терапии и уточнению фазы наступающей клинической ремиссии.

Список литературы

1. Дубинина Е.Е., Сальникова Л.А., Ефимова Л.Ф. Активность и изоферментный спектр супероксидсмутазы эритроцитов и плазмы крови // Лаб. дело. – 1983. – № 10. – С. 30-33.
2. Ланкин В.З., Вандышев Д.Б., Тихадзе А.К. и др. Влияние гипероксии на активность супероксидсмутазы в тканях мышечной ткани // Докл. АН СССР. – 1981. – № 1. – С. 229-231.
3. Коробейникова Э.Н. Модификация определения уровня перекисного окисления липидов в реакции с тиобарбитуровой кислотой // Лаб. дело. – 1989. – № 7. – С. 8-10.
4. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16-19.
5. Насонова В.А., Астапенко М.Г. Клиническая ревматология: Руководство для врачей. – М.: Медицина, 1989. – С. 143-175.
6. Bøyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood // Scand. J. Clin. Lab. Invest. – 1968. – Vol. 21. – P. 77-89.
7. Hochberg M.G. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus [Letter] // Arthritis Rheum. – 1997. – Vol. 40. – P. 1725.
8. Hosoda S., Nakamura W. Role of glutathione in regulation of hexose monophosphate pathway in Erlich ascites tumor cells // Biochim. Biophys. Acta. – 1970. – Vol. 222. – P. 53-64.
9. Paglia B.E., Valentine W.N. Studies of the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase // J. Lab. Clin. Med. – 1967. – Vol. 70. – P. 158-169.

Рецензенты:

Александров А.В., д.м.н., зав. лабораторией функциональных методов исследования, ультразвуковой диагностики и восстановительной терапии ФГБУ «НИИ КиЭР» РАМН, г. Волгоград.

Заводовский Б.В., д.м.н., профессор, зав. лабораторией методов лечения и профилактики заболеваний суставов ФГБУ «НИИ КиЭР» РАМН, г. Волгоград.