Status of antioxidant and oxidant systems in rheumatic fever and hereditary collagen dysplasias

X. H. Azizova, *T. A. Askerova, B. M. Mamedova

Department of Biochemistry, Azerbaijan Medical University, Baku, Azerbaijan

*Corresponding author: tahira.askarova@mail.ru. Manuscript received September 20, 2013; accepted December 05, 2013

Abstract

Recently, the interest in research on the role of free radical-induced lipid peroxidation reactions in pathogenesis of rheumatic fever and hereditary collagen dysplasias has considerably grown. The study tested blood plasma of 60 children: 18 carriers of hereditary collagen dysplasias and 42 children with rheumatic fever. Twenty healthy individuals have constituted control group. All patients have undergone complex clinical and laboratory examinations to evaluate process activity and disease stage, their familial and genealogical histories have been taken. Presence of rheumatoid factor was determined by latex agglutination test. Other rheumatic fever markers were tested by common methods. Status of the lipid peroxidation process was assessed by malondialdehyde content, using reaction with thiobarbituric acid and subsequent spectrophotometric measurement. Catalase activity was measured spectrophotometrically. To diagnosticate hereditary collagen dysplasias, hydroxyproline levels in blood and urine were assayed. Content of glycosaminoglycans was determined by electrophoresis, and levels of amino acids were measured chromatographically. In the majority of patients, the tests detected an increased daily urinary excretion of hydroxyproline and glycosaminoglycans what reflects the process of collagen metabolism disorders. The authors detected elevated levels of malondialdehyde, increased activity of superoxide dismutase and decreased activity of glutathione peroxidase and catalase. These three markers are sufficiently sensitive to assess affection of immunocompetent cells in rheumatic fever and hereditary collagen dysplasias.

Key words: antioxidant system, rheumatic fever, hereditary collagen dysplasias, malondialdehyde, superoxide dismutase, catalase.

Состояние антиоксидантной и оксидантной системы у больных ревматизмом и наследственными коллагенопатиями

Введение

В последнее время значительно возрос интерес к исследованию роли реакций свободно-радикального окисления липидов в развитии патологического процесса при ревматизме и наследственных коллагенопатиях. Образующиеся при этих заболеваниях иммунные комплексы являются стимулом для хемотаксиса нейтрофилов и начала реакций фагоцитоза. Процесс фагоцитоза, сопровождающийся высвобождением большого числа активных радикалов кислорода, приводит к повреждению самих нейтрофилов, высвобождению лизосомальных ферментов деградации коллагена, гиалуроновой кислоты и к повреждению соединительной ткани [12].

Обнаружено повышение уровня маркеров перекисного окисления липидов в крови больных ревматизмом. Установлено также изменение активности каталазы у этой группы больных. Показано, что содержание продуктов перекисного окисления липидов в крови коррелирует с клиническими и лабораторными показателями активности заболевания. Более того, оказалось, что соединительная ткань сравнительно плохо обеспечена окислительными ферментами. Исследование оксидантной и антиоксидантной системы необходимо также в связи с оценкой эффективности применения антиоксидантных препаратов [13].

Как известно, малоновый диальдегид (МДА) – один из продуктов перекисного окисления липидов. По мнению некоторых авторов, увеличение содержания МДА в сыворотке крови больных ревматизмом является результатом действия перекиси водорода и других активных форм кислорода. Как известно, перекись водорода не является свободным радикалом, однако, ей присущи выраженные окислительные свойства *per se,* например, в фагоцитах под влиянием миелопероксидазы формируется гипохлорит-анион, а в ходе реакции Фентона – самый агрессивный гидроксильный радикал. При увеличении активности ксантиноксидазы в эритроцитах больных ревматизмом синтезируется большое количество реактивного супероксидного аниона. Этот радикал обезвреживается супероксиддисмутазой (СОД). Результаты изучения изменений СОД при ревматизме неоднозначны: одни авторы нашли увеличение, другие – снижение ее активности.

Общеизвестно, что под воздействием СОД образовавшаяся перекись водорода инактивируется каталазой или глутатионпероксидазой (ГПО). Данные об изменениях СОД и ГПО у больных ревматическими заболеваниями также неоднозначны. Так, по данным одних авторов, при ревматизме активность каталазы увеличивается, а ГПО – снижается, тогда как по другим данным, активность обоих ферментов не изменяется.

В имеющейся литературе отсутствуют сведения о комплексном сравнительном изучении состояния перекисного окисления липидов, антиоксидантной системы сыворотки крови больных ревматизмом и наследственными коллагенопатиями (НК).

Таким образом, целью работы явились оценка состояния перекисного окисления липидов, антиоксидантной системы при ревматизме и наследственных коллагенопатиях, а также выявление взаимосвязи между уровнем перекисного окисления липидов и клиническими особенностями заболевания.

Материал и методы

Исследование плазмы крови было проведено у 60 детей (40 мальчиков и 20 девочек в возрасте от 4 месяцев до 16 лет), а именно: 18 носителей наследственных коллагенопатий и 42 больных ревматизмом. 20 здоровых доноров составили контрольную группу. Все больные прошли комплексное клинико-лабораторное исследование активности процесса и стадии заболевания, а также семейное генеалогическое исследование. Наличие ревматоидного фактора устанавливали путем реакции латекс-агглютинации. Остальные маркеры ревматизма определяли по общепринятой методике.

Состояние процесса перекисного окисления липидов оценивали по содержанию МДА путем реакции с тиобарбитуровой кислотой с последующим спектрофотометрическим измерением [1]. Активность каталазы измеряли спектрофотометрически по методу М. А. Королюк [2]. Для диагностики наследственных коллагенопатий было использовано определение оксипролина в крови и моче по методу С. С. Тетянец (1983) [5] Количество гликозаминогликанов определяли электрофорезом, а уровень аминокислот в крови и моче – хроматографически [3].

Подтверждение наследственности коллагенопатий проводилось с помощью изучения семейно-генеалогического состава родственников больных детей.

Результаты и обсуждение

Состояние обмена соединительной ткани больных было оценено путем определения экскреции гликозаминогликанов (ГАГ) и оксипролина (ОП) в суточной моче.

Среди обследованных было выделено три группы: с уровнем анализируемых показателей в пределах 100% (I группа), 150% (II группа) и более 150% (III группа) относительно должной величины.

Результаты исследования ОП у 60 больных ревматизмом и НК представлены в таблице 1.

Проведенный анализ выявил у большинства обследованных повышение выделения ОП с суточной мочой, которое отражает процесс нарушения катаболизма и синтеза коллагена. Выделение оксипролина с мочой среди больных НК было повышено примерно в 1,2 раза во II группе и 2,3 раза – в III группе. Увеличение выделения

Таблица 1

Экскреция оксипролина в суточной моче у больных ревматизмом и наследственными коллагенопатиями

Группы	Норма, мг/сутки	Больные ревматизмом		Результаты при ревматизме, мг/сутки	Больные НК		Результаты при НК, мг/сутки	p
		n	%		n	%		
I	59,05 ± 2,19	5	11,9	39,1 ± 1,01	5	27,8	42,07 ± 2,01	< 0,001
II	57,54 ± 2,67	7	16,7	59,21 ± 2,11	5	27,8	70,28 ± 3,39	< 0,001
III	62,51 ± 1,35	30	71,4	134 ± 3,61	8	44,4	142,54 ± 5,88	< 0,001
Всего		42	100		18	100		

Таблица 2

Экскреция ГАГ в суточной моче у больных ревматизмом и наследственными коллагенопатиями

Группы	n	%	Норма, мг/сутки	Результаты больных ревматизмом, мг/сутки	Результаты больных НК, мг/сутки	p
I	5	11,9	5,47 ± 0,19	3,27 ± 0,8	4,37 ± 0,19	< 0,001
II	7	16,7	5,45 ± 0,13	5,57 ± 0,7	6,67 ± 0,21	< 0,001
III	30	71,4	5,14 ± 0,13	10,12 ± 0,20	12,24 ± 0,44	< 0,001
Всего	42	100				

оксипролина в суточной моче мы наблюдали также у больных ревматизмом (табл. 1).

У некоторых больных ревматизмом и НК выявлено снижение экскреции ОП, что может свидетельствовать об угнетении резорбции коллагена у этих больных.

Данные таблицы 2 показывают, что у большинства обследованных выявлено повышение экскреции ГАГ, что может свидетельствовать об активации катаболизма межклеточного вещества соединительной ткани при изучаемых заболеваниях. У больных НК уровень ГАГ превышал должную величину во II группе в 1,2 раза, в III группе – в 2,4 раза по сравнению с контрольной группой. Среди больных ревматизмом мы также выявили повышение уровня ГАГ во II и III группах, но оно было чуть ниже, чем у больных наследственными коллагенопатиями. Наличие достоверной взаимосвязи между изолированным нарушением экскреции ГАГ в суточной моче и клинической картиной в наших наблюдениях не обнаружено.

У обследованных больных было выявлено уменьшение содержания большинства свободных незаменимых и заменимых аминокислот в сыворотке крови. Установлена взаимосвязь между снижением уровня свободного пролина, свободного лейцина, изолейцина, свободного лизина и длительностью заболевания.

Уровень прооксидантных показателей (МДА, СОД и ГПО) представлен в таблице 3.

Как видно из таблицы, уровень МДА в сыворотке крови у больных ревматизмом и НК был значительно увеличен, в 2 раза по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$).

Установленный нами рост содержания МДА у больных ревматизмом соответствует данным других авторов [7, 11]. По-видимому, увеличение количества МДА является результатом усиления процессов образования свободных радикалов при перекисном окислении мембранных липидов. Как показано в таблице 3, активность СОД в эритроцитах больных ревматизмом и, особенно,

Таблица 3

Изменение показателей прооксидантной системы у больных ревматизмом и наследственными коллагенопатиями

Показатели	Контрольная группа (n = 20)	Больные ревматизмом (n = 42)	Больные НК (n = 18)
МДА, мкмоль/л	5,71 ± 2,55	10,8 ± 0,24*	9,81 ± 0,32*
СОД, усл. ед.	129,28 ± 196,61	1012,43 ± 346,48*	956,25 ± 314,8*
ГПО, усл. ед.	59,55 ± 16,95	34,31 ± 15,03*	40,12 ± 16,48*

Примечание: *$p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой.

наследственными коллагенопатиями была значительно повышена (p < 0,05) по сравнению с контрольной группой: при ревматизме – в 8 раз, при НК – в 7 раз. Учитывая ключевую роль СОД в защите клеток от процессов свободнорадикального окисления, это может повлечь за собой изменение функциональной активности иммунокомпетентных и соединительнотканных клеток, процессов фагоцитоза и проявления бактерицидного эффекта. Данный показатель является очень информативным.

При изучении активности ГПО в крови мы установили отчетливое ее снижение у больных ревматизмом и НК. Активность ГПО была снижена у больных ревматизмом в 1,7 раза, при НК – в 1,4 раза (p < 0,05). Эти данные соответствуют данным других авторов [4, 6, 8, 12]. При изменении уровней СОД и ГПО уменьшается обезвреживание супероксидного аниона и перекиси водорода, в результате чего процессы свободнорадикального окисления становятся более активными.

Каталаза широко распространена в организме человека, причем наибольшие количества фермента обнаружены в эритроцитах. Функцией фермента является предотвращение накопления перекиси водорода, образующейся при дисмутации супероксидного аниона и аэробном окислении восстановленных флавопротеидов. Каталаза относится к ферментам, которые наиболее длительно сохраняют свою высокую активность, почти не требуют энергии активации. Скорость реакции этого фермента лимитирует лишь скорость диффузии субстрата к активному центру [2]. Мы определяли активность каталазы в сыворотке крови больных. По нашим данным, этот показатель был снижен в 2 раза по сравнению с контрольной группой: активность фермента у больных ревматизмом составляла 8,32 ± 0,32 мкат/л, у лиц с НК – 9,9 ± 0,1 мкат/л (норма: 16,8 ± 6,16 мкат/л).

Некоторые исследования, посвященные лишь определению каталазы эритроцитов, показали, что гипоксия сопровождается отчетливым снижением активности каталазы. Подобная динамика активности каталазы обнаружена при хронических легочных заболеваниях, лейкозах, ревматоидном артрите, болезни Шёнлейна-Геноха. Эти заболевания сейчас интерпретируются в свете современных представлений о важной роли каталазы в процессах оксигенации и деоксигенации эритроцитов [2].

Необходимо отметить, что возникновение ревматизма и наследственных коллагенопатий зависит от разных причин. Но все эти патологии относятся к заболеваниям соединительной ткани. При изучении оксидантной и антиоксидантной систем таких больных мы не выявили существенных отличий в данных.

Можно было предположить, что параллельно с увеличением интенсивности перекисного окисления липидов будет нарастать и активность антиоксидантной системы, однако, был получен противоположный эффект. Это может быть связано либо с истощением системы антиоксидантной защиты, либо с нарушением координации компонентов антиоксидантной системы между собой.

Суммируя вышеизложенное, можно заключить, что снижение общей активности каталазы и повышение уровня СОД и МДА являются достаточно чувствительными ориентирами поражения иммунокомпетентных клеток при ревматизме и наследственных коллагенопатиях. Кроме того, полученные результаты могут служить предпосылкой к применению антиоксидантной терапии при данных заболеваниях.

References

1. Andreeva LI, Kozhemyakin LA, Kishkun AA. Modifikatsiya metoda opredeleniya perekisey lipidov v teste s tiobarbiturovoy kislotoy [Modification of the thiobarbituric acid method for determination of lipid peroxides]. *Laboratornoe delo [Medical laboratory science*]. 1988;11:41-43.
2. Korolyuk MA, Ivanova LI, Mayrova IG, et al. Metod opredeleniya aktivnosti katalazy [Catalase activity assay]. *Laboratornoe delo [Medical laboratory science]*. 1988;1:16-18.
3. Krasnopolskaya KD, Bochkov NP, Tsukerman GL. Metodicheskie rekomendatsii po vyyavleniyu nasledstvennykh defektov obmena [Guidelines for detection of inherited metabolic disorders]. Moscow, 1985:3-29.
4. Matveykov GP, Kaliya ES, Levin VI, et al. Aktivnost superoksiddismutazy i ee izofermentov v immunokompetentnykh kletkakh perifericheskoy krovi pri sistemnoy krasnoy volchanke i revmatoidnom artrite [Activity of superoxide dismutase and its isozymes in immunocompetent cells of peripheral blood in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis]. *Terapevticheskiy arkhiv [Internal medicine files*]. 1994;4:57-62.
5. Tetyanets SS. Metod opredeleniya svobodnogo oksiprolina v syvorotke krovi [Free serum hydroxyproline assay]. *Laboratornoe delo [Medical laboratory science*]. 1983;3:61-62.
6. Chichasova NV, Nasonova MB, Stepanets OV, et al. Sovremennye podhody k otsenke aktivnosti revmatoidnogo artrita [Current approach to rheumatoid arthritis activity assessment]. *Terapevticheskiy arkhiv [Internal medicine files]*. 2002;5:57-60.
7. Cimen MY, Cimen OB, Kacmaz M. Oxidant/antioxidant status of the erythrocytes from patients of rheumatoid arthritis. *Clin. Pheumatol.* 2000;19(4):275-277.
8. Hassan MG, Hadi RF, Al-Raviz S, et al. The glutatione defense in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *J. Appl. Toxocol*. 2001;85(2):67-84.
9. Nishida R, Doi T, Inone H. The role nitric oxide in arthritic joints: a the apentic target? *Mod. Rheumatol*. 2000;10:63-67.
10. Onur O, Akinci AS, Akbiyik F, et al. Elevated levels of nitrate in rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int*. 2001;20:154-148.
11. Polidori MC, State W, Eichler O, et al. Profiles of antioxidants in human plasma. *Free Radic. Biol. Med.* 2001;30:5:456-462.
12. Taysi S, Polat F, Gul M. Lipid peroxidation some extracellular antioxidants and antioxidant enzymes in serum of patients with rheumanoid arthritis. *Rheumatol. Int*. 2002;21(5):200-204.
13. Zado MP, Oteiza PI. The antioxidant properties of zinc: interactions with iron and antioxidants. *Free Radix. Biol. Med*. 2001;31(2):266-274.