

*Н.Ю. Достанко*

## **Использование показателя свободнорадикального окисления для повышения информативности оценки состояния мембран лимфоцитов у пациентов с ревматоидным артритом**

*Белорусский государственный медицинский университет*

Обследовано 29 здоровых лиц и 51 пациент с ревматоидным артритом, в лимфоцитах которых определяли активность внутриклеточных ферментов антиоксидантной системы (супероксиддисмутазы и каталазы) и уровень перекисного окисления липидов (по концентрации тиобарбитурат-реагирующих веществ). Предложен способ оценки состояния мембран лимфоцитов путем расчета коэффициента, учитывающего три показателя активности процессов свободнорадикального окисления одновременно (активность супероксиддисмутазы, активность каталазы и содержание тиобарбитурат-реагирующих веществ), который обладает высокой информативностью в отношении оценки состояния мембран лимфоцитов периферической крови у пациентов с ревматоидным артритом. Установлено, что в группе пациентов с ревматоидным артритом преобладают лица со снижением коэффициента свободнорадикального окисления.

Ключевые слова: ревматоидный артрит, лимфоциты, свободнорадикальное окисление

Интенсивность процессов свободнорадикального окисления в лимфоцитах непосредственно влияет на состояние мембранных структур и функциональную активность этих иммунокомпетентных клеток, играющих важную роль в патогенезе ревматоидного артрита (РА) [1,4]. Об интенсивности процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) чаще всего судят по концентрации тиобарбитурат-реагирующих веществ (ТРВ) в клетках и тканях, однако для более полного представления о состоянии процессов свободно-радикального окисления в лимфоцитах необходимо учитывать также активность внутриклеточных ферментов антиоксидантной системы (в частности, супероксиддисмутазы и каталазы) [8].

Цель исследования. Оценить состояние процессов свободнорадикального окисления в лимфоцитах пациентов с ревматоидным артритом и в лимфоцитах здоровых лиц.

Материал и методы. Обследовано 29 здоровых лиц и 51 пациент с РА I и II степени активности, в лимфоцитах которых определяли активность супероксиддисмутазы (СОД), каталазы (КАТ) и содержание ТРВ. Обе группы были сопоставимы по полу (доля женщин 0,66 и 0,84 соответственно,  $p=0,068$ ) и возрасту (критерий U Манна-Уитни,  $p=0,234$ ). Лимфоциты периферической крови обследованных лиц выделяли на градиенте плотности фиколла-верографина. Лимфоконцентрат разводили до  $3 \cdot 10^6$  клеток/мл и из него отбирали пробы клеток, в которых определяли активность СОД и КАТ и оценивали уровень ПОЛ. Активность СОД определяли в реакции окисления кверцетина и выражали в условных единицах оптической плотности на 108 клеток. Активность каталазы определяли по реакции с перекисью водорода и измеряли в мккатал/108 клеток. Уровень ПОЛ определяли по концентрации ТРВ с помощью 0,375% тиобарбитуровой кислоты, концентрацию ТРВ выражали в нмоль/108 клеток. Статистический анализ полученных данных

проводили с помощью пакетов прикладных программ «SPSS 16.0» и «STATISTICA 6.0». Проверку соответствия вида распределения параметров закону нормального распределения проводили с помощью критерия Шапиро-Уилка (W-критерий), для сравнения параметров в двух независимых группах без учета характера их распределения использовали критерий Манна-Уитни (U-критерий) [6].

Результаты и обсуждение. Распределение концентрации ТРВ и активности СОД в лимфоцитах здоровых лиц не отличалось от нормального ( $W=0,941$ ,  $p=0,224$  и  $W=0,981$ ,  $p=0,877$  соответственно), тогда как распределение активности КАТ статистически значимо отличалось от нормального распределения ( $W=0,873$ ,  $p=0,003$ ) (таб. 1).

Распределение активности СОД в лимфоцитах пациентов с РА не отличалось от нормального ( $W=0,979$ ,  $p=0,562$ , рис. 1), но, по сравнению с группой здоровых лиц, отмечена значимо большая дисперсия значений активности СОД (критерий Левена,  $p=0,001$ ) и значимо более низкий средний уровень активности СОД (модифицированный t-критерий Стьюдента для различных дисперсий  $= -5,77$ ,  $p < 0,001$ ). Дисперсия активности СОД в группе пациентов с РА почти в два раза превышала таковую в группе здоровых лиц, при этом у 65% пациентов с РА активность СОД была ниже нормы ( $\pm 1$  СКО от среднего значения в группе здоровых лиц) и доля таких лиц в группе пациентов с РА была значимо больше ( $p=0,005$ ). Вместе с тем, у пациентов с РА отмечались и очень высокие значения активности СОД, при этом значимо чаще встречались лица с маргинальными значениями активности СОД (72%), то есть со значениями СОД как выше, так и ниже нормы ( $p < 0,001$ ).

Таблица 1. Распределение значений концентрации ТРВ, активности СОД и КАТ в лимфоцитах здоровых лиц

	M $\pm$ m	SD (СКО)	Меди- ана	25%- 75%	95% ДИ
ТРВ, нмоль / 108 кл.	29,01 $\pm$ 1,87	8,57	27,88	25,00- 33,27	25,11- 32,91
СОД, УЕ опт.пл./ 108 кл.	35,78 $\pm$ 1,12	5,91	35,78	32,16- 40,84	33,49- 38,07
КАТ, мккатал/ 108 кл.	625,61 $\pm$ 60,87	322,08	720,01	265,52- 928,72	500,72- 750,50

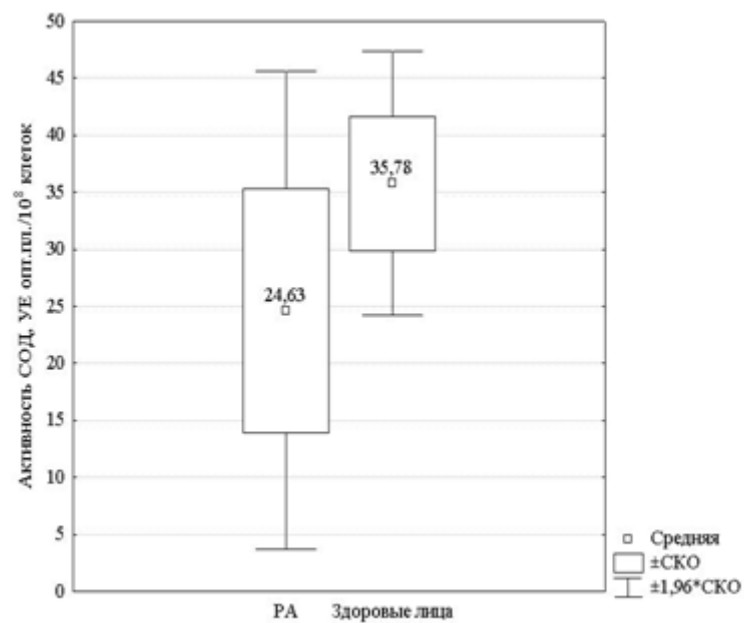


Рисунок 1 - Активность СОД в лимфоцитах здоровых лиц и пациентов с РА

Распределение активности КАТ в лимфоцитах пациентов с РА отличалось от нормального распределения ( $W=0,754$ ,  $p=0,000$ , рис. 2), при этом в группе пациентов с РА активность КАТ была значимо снижена (критерий U,  $p<0,001$ ). Распределение полученных значений содержания ТРВ в лимфоцитах пациентов с РА также значимо отличалось от нормального ( $W=0,899$ ,  $p=0,001$ ), однако при удалении единственного выскакивающего значения, выходящего за пределы 2 СКО, распределение содержания ТРВ носило характер нормального ( $W=0,973$ ,  $p=0,377$ , рис. 3). Среднее содержанию ТРВ в лимфоцитах было значимо выше в группе пациентов с РА по сравнению с группой здоровых лиц ( $t$  критерий Стьюдента =  $-2,8$ ,  $p=0,007$ ).

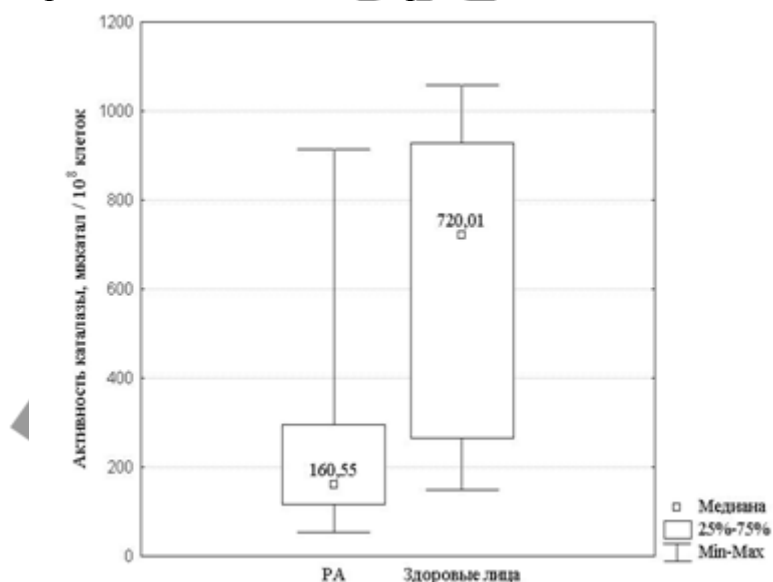


Рисунок 2 - Активность каталазы в лимфоцитах здоровых лиц и пациентов с РА

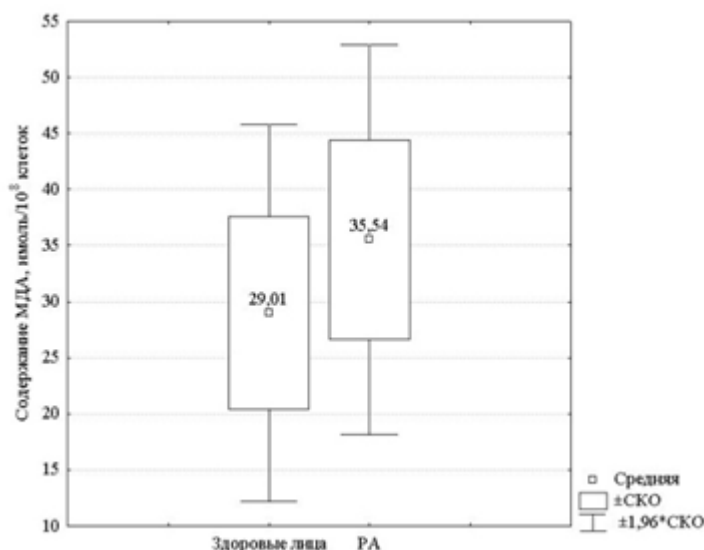


Рисунок 3 – Содержание ТРВ в лимфоцитах здоровых лиц и пациентов с РА

Диапазоном нормы для отдельных показателей, характеризующих состояние процессов свободнорадикального окисления в лимфоцитах можно было считать величины, входящие в интервал « $\pm 1$  СКО» (понятие нормы, принятое для оценки ферментативной активности), « $\pm 1,5$  СКО» или « $\pm 2$  СКО» [2,6,7]. Следует отметить, что использование в качестве критерия нормы для оценки активности КАТ интервалов « $\pm 1,5$  СКО» и « $\pm 2$  СКО» не имело смысла из-за большой дисперсии данного показателя, а использование интервала « $\pm 1$  СКО» было не вполне обосновано, учитывая характер его распределения. Использование в качестве границ нормы для активности СОД и содержания ТРВ интервала « $\pm 1,5$  СКО» приводило к увеличению специфичности данных показателей, но одновременно еще больше снижало их невысокую чувствительность (таб. 2). Отмечено, что у пациентов с РА могло наблюдаться отклонение от нормы только одного или двух показателей, характеризующих процессы свободнорадикального окисления в лимфоцитах, причем в различной степени. Кроме того, наблюдалась выраженная вариабельность активности СОД, КАТ и содержания ТРВ в лимфоцитах пациентов с РА и здоровых лиц, и связанное с этим перекрытие доверительных интервалов изученных показателей в данных группах. Корреляционная зависимость была выявлена только между содержанием ТРВ и активностью КАТ, между которыми отмечена умеренная положительная взаимосвязь (коэффициент корреляции Спирмена  $r=0,31$ ,  $p=0,04$ ).

Таблица 2. Чувствительность и специфичность использования различных диапазонов нормы для концентрации ТРВ, активности СОД и каталазы при оценке состояния процессов свободнорадикального окисления в лимфоцитах

	Диапазон значений исследованных параметров					
	ТРВ		СОД		КАТ	
	( $\pm 1$ СКО)	( $\pm 1,5$ СКО)	( $\pm 1$ СКО)	( $\pm 1,5$ СКО)	( $\pm 1$ СКО)	( $\pm 1,5$ СКО)

Чувствительность	36%	25%	66%	59%	80%
Специфичность	91%	95%	86%	95%	67%

Учитывая полученные данные, было предложено рассчитывать коэффициент свободнорадикального окисления (СРО), оценивавший состояние всех трех изученных показателей одновременно [5]. Значение коэффициента СРО получали путем перемножения величин активности СОД и КАТ и делением их на величину содержания ТРВ. Такой способ расчета позволил нивелировать влияние корреляционной зависимости между величинами КАТ и ТРВ на предложенный коэффициент. Распределение значений показателя СРО у здоровых лиц и у пациентов с РА отличалось от нормального ( $W=0,894$ ,  $p=0,019$  и  $W=0,814$ ,  $p<0,001$  соответственно, рис. 4). Значения коэффициента СРО в группе пациентов с РА были значимо ниже, чем в группе здоровых лиц (критерий U,  $p<0,001$ ). С целью оценки чувствительности и специфичности данного показателя в отношении определения состояния мембран лимфоцитов у пациентов с РА по сравнению с отдельными изученными показателями были построены соответствующие характеристические кривые (рис. 5). На основании значений площади под кривой и с учетом характера распределения данного коэффициента, в качестве нормы для СРО был принят диапазон, охватывающий 90% верхних значений данного показателя у здоровых лиц [2,3,6]. При этом предложенный коэффициент обладал более высокой чувствительностью (84,1%) и специфичностью (90,5%) в оценке состояния мембран лимфоцитов у пациентов с РА по сравнению с отдельными показателями.

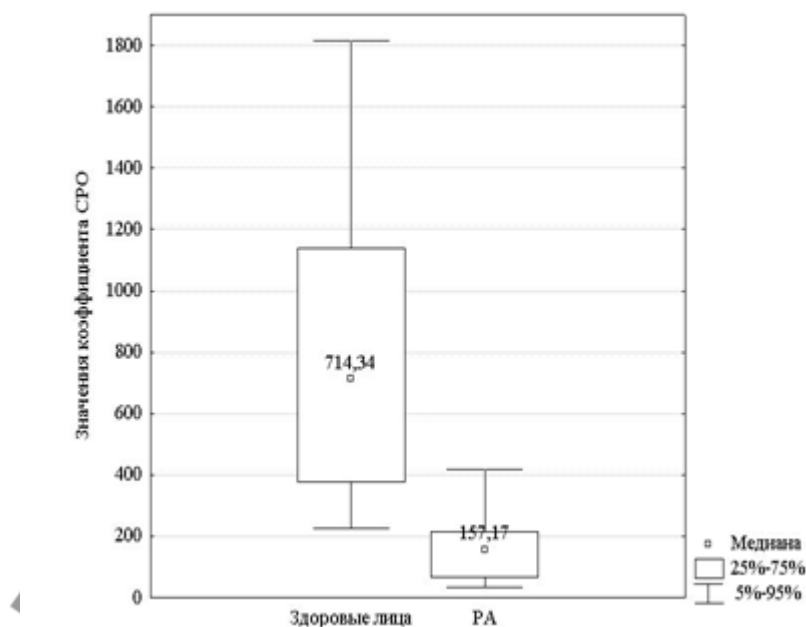


Рисунок 4. - Распределение показателя СРО у здоровых лиц и у пациентов с РА

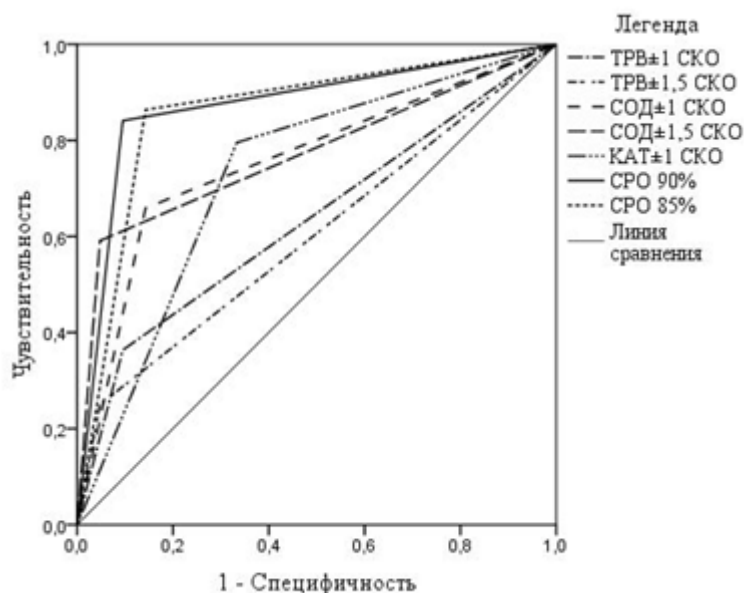


Рисунок 5 – Характеристические кривые для изученных показателей

Вывод. Предложенный способ комплексной оценки состояния мембран лимфоцитов путем расчета коэффициента, учитывающего три показателя активности процессов свободнорадикального окисления одновременно, обладает более высокой чувствительностью и специфичностью в отношении определения состояния мембран лимфоцитов у пациентов с ревматоидным артритом по сравнению с оценкой отдельных показателей, доступен в условиях обычной клинической лаборатории и не требует применения дорогостоящих реактивов, специальной аппаратуры или значительных временных затрат.

### Литература

1. Афонина, Г. Б. Роль свободно-радикального окисления мембранных липидов лимфоцитов в развитии иммунологической недостаточности и ее коррекция  $\alpha$ -токоферолом / Г. Б. Афонина, В. Г. Бордонос // Иммунология. 1990. № 5. С. 33–35.
2. Ланг, Т. Двадцать ошибок статистического анализа, которые вы сами можете обнаружить в биомедицинских статьях / Т. Ланг // Межд. журн. мед. практики. 2005. № 1. С. 21–31.
3. Мусатов, М. И. Норма и патология: учеб. пособие для студентов высших учебных заведений / М. И. Мусатов. Новосибирск: НГУ, 2001. 15 с.
4. Носков, С. М. Свободно-радикальные реакции при ревматоидном артрите / С. М. Носков, Г. С. Козлов, Л. Ю. Широкова // Ревматология. 1988. № 4. С. 72–76.
5. Перекисное окисление липидов и активность антиоксидантных ферментов в лимфоцитах больных системной красной волчанкой и ревматоидным артритом / Е. С. Калия [и др.] // Юбил. конференция, посв. 70-летию ассоц. ревматологов России и 40-летию ин-та ревматологии РАМН: тезисы докладов, Москва, 17–20 ноября 1998 г. М., 1998. С. 27.

6. Реброва, О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. [Применение пакета прикладных программ STATISTICA](#) / О. Ю.Реброва. [М.: МедиаСфера, 2002. 312 с.](#)

7. Ростовцев, В. Н. Концептуальные основы нормы и диагноза / В. Н. Ростовцев // *Здравоохранение Беларуси*. 1984. № 1. С. 8–10.

8. Чевари, С. Определение антиоксидантных параметров крови и их диагностическое значение в пожилом возрасте / С. Чевари, Т. Андял, Я. Штрэнгер // *Лабораторное дело*. 1991. № 10. С. 9–13.

РЕПОЗИТОРИЙ БГМУ