

## Липидный спектр сыворотки и нейтрофилов крови при ревматических заболеваниях в сочетании с hcv-инфекцией

*Белорусский государственный медицинский университет*

Иммунологические и морфологические изменения при ревматических заболеваниях связаны с многообразными нарушениями в биохимическом статусе организма [95, 274]. Во всех моделях молекулярной организации биомембран жирным кислотам (ЖК) отводится большая роль. Особенности строения углеводородных цепей ЖК могут определять способ и плотность упаковки липидов в мембранах, характер взаимодействия с другими мембранными компонентами. Жирнокислотный состав мембран имеет отношение к контролю клеточного роста, образованию и диффузии поверхностных антигенов [1, 2].

Из исследованных клеток наибольший интерес представляли нейтрофилы крови в связи с их избирательной устойчивостью к инвазии вируса гепатита С (ВГС). Известно, что ферментативная активность клетки во многом зависит от состояния липидов клеточных мембран [3, 5]. Внешние факторы приводят к сдвигам в составе ЖК мембран. Однако количественное соотношение между классами липидов при этом сохраняется постоянным. Преобладание моноеновых и длинноцепочечных ЖК рассматривают как фактор, придающий мембране необходимую структурную стабильность, обусловленную плотной упаковкой углеводородных цепей и их метаболической инертностью и, возможно, устойчивостью к проникновению ВГС [4].

Жирнокислотный спектр нейтрофилов крови больных ревматическими заболеваниями в сочетании с хроническим гепатитом С (ХГС)

В данном разделе представлены результаты исследования жирнокислотного спектра нейтрофилов крови и синовиальной жидкости у 119 пациентов при ревматической патологии. В соответствии с задачами исследования изучены липидные спектры нейтрофилов крови у 41 больного ревматоидным артритом (РА), из которых у 5 был установлен хронический гепатит С, 16 больных системной красной волчанкой (СКВ), 9 – системным склерозом (СС), 12 – остеоартрозом (ОА). Контрольную группу здоровых лиц составили 19 доноров.

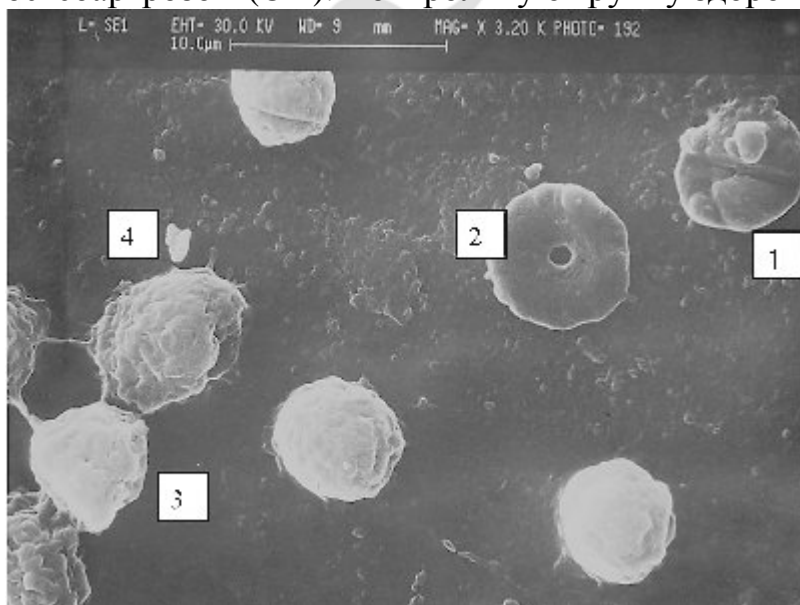


Рис. 1. Электронная микроскопия межклеточных взаимодействий форменных элементов крови, больного Г. с диагнозом РА С. На снимке обозначены: 1-нейтрофил, 2-эритроцит, 3-4 – Т и В лимфоциты соответственно.

Исследование спектров ЖК проведено по следующим направлениям: 1) диагностика и дифференциальная диагностика ревматических заболеваний; 2) определение факторов, оказывающих наибольшее влияние на жирнокислотный спектр, 3) исследование липидного спектра нейтрофилов при наличии ВГС в крови.

Нами установлено, что ЖК спектр нейтрофилов при ревматических заболеваниях неоднороден и имеет достоверные различия с нормой, а также между отдельными нозологиями. Полученные данные представлены в таблице 1.

Таблица 1

Средние значения уровней ЖК в мкмоль/мл при различных ревматических заболеваниях

Дз	ЖК	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	20:4
СКВ		33,80	5,89	10,23	19,88	3,74	1,38
	n=16	6,76	1,69	2,38	4,11	1,23	0,46
СС		30,18	8,18	8,94	15,85	1,80	0,41
	n=9	10,95	5,55	3,06	6,12	0,58	0,17
ОА		31,56	6,50	10,29	22,82	9,17	1,13
	n=12	8,52	1,43	2,96	6,56	3,73	0,59
Зд		30,35	6,75	8,48	16,73	4,48	0,50
	n=19	8,28	2,60	1,89	5,98	1,96	0,23
РА		40,65	5,41	10,04	26,09	12,05	1,62
	n=36	6,37	0,76	1,23	3,83	2,39	0,33
СКВ-СС		0,28	0,39	0,33	0,55	1,43	1,98*
СКВ-РА		0,74	0,26	0,07	1,11	3,10**	0,43
СС-ОА		0,10	0,29	0,32	0,78	1,96*	1,17
СС-РА		0,83	0,49	0,33	1,42	4,18**	3,25**
Зд-РА		0,99	0,50	0,69	1,32	2,45*	2,79*

где – \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,02$

Для более наглядного представления различий в ЖК спектре при ревматических заболеваниях абсолютные значения уровней жирных кислот рассчитаны по отношению к донорской группе, принятой за 100% и представлены на рисунке 2.

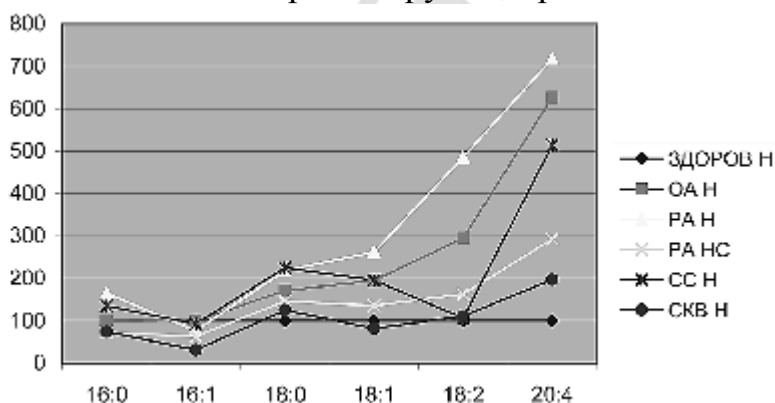


Рис. 2. Жирнокислотные спектры нейтрофилов по отношению к норме (100%)

Как видно из рисунка 2, в спектре жирных кислот нейтрофилов при ревматических заболеваниях обнаружено снижение уровня 18:2 (линолевой) между 18:1 (олеиновой) и 20:4 (арахидоновой) кислотами – феномен «провала» кривой спектра ЖК. Согласно полученным результатам исследования при иммунной патологии (СКВ и РА) растет доля ненасыщенных жирных кислот

(олеиновой и арахидоновой) в нейтрофилах крови. Данные ЖК являются предшественниками простагландинов и лейкотриенов, которые, в свою очередь, активно расходуются в ходе иммунного воспаления.

Кроме этого полиеновые кислоты чаще других подвергаются воздействию пероксидного радикала при перекисном окислении липидов (ПОЛ), а активация ПОЛ характерна для системных болезней соединительной ткани. Так, согласно полученным нами ранее данным, содержание витамина Е в плазме составляло при СКВ  $12,5 \pm 1,55$  мкг/мл, что достоверно ниже, чем в норме ( $19,5 \pm 0,91$  мкг/мл) ( $p < 0,01$ ) и свидетельствует о снижении активности антиоксидантной системы при СКВ. Уровень малонового диальдегида, как конечного продукта ПОЛ увеличивался ( $0,31 \pm 0,05$  ммоль/г липидов) в среднем в 2,2 раза по сравнению с нормой  $0,14 \pm 0,02$  ммоль/г липидов ( $p < 0,02$ ).

При исследовании ЖК спектров нейтрофилов крови достоверные различия наблюдаются в уровне 18:2, 20:4 между здоровыми лицами и больными РА. Для СС установлен минимальный уровень линолевой кислоты (18:2)  $1,80 \pm 0,58$  мкмоль/мл, что достоверно отличается от других ревматических заболеваний, например, при РА данный показатель составил  $12,5 \pm 2,3$  мкмоль/мл ( $p < 0,02$ ). Следует отметить, что при ОА отсутствовали достоверные различия по спектру жирных кислот нейтрофилов в сравнении с нормой, что может указывать на невоспалительный генез поражения суставов при остеоартрозе.

Среди ревматических заболеваний спектры жирных кислот достоверно различались между РА и СКВ по 18:2; между РА и СС – по 18:1 и 20:4. Установленные различия в спектре жирных кислот нейтрофилов могут служить критерием для дифференциальной диагностики этих заболеваний.

В наибольшей группе, которую составили больные РА, нами была исследована зависимость изменений в жирнокислотном спектре от длительности заболевания, возраста больных, стадии, степени активности заболевания. Достоверные различия получены у больных РА с увеличением стадии заболевания для пальмитиновой и стеариновой кислот, причем с увеличением стадии доля ненасыщенных кислот 16:0 (пальмитиновой) и 18:0 (стеариновой) возрастает. Увеличение степени активности заболевания также было сопряжено с увеличением 18:0, так при 1 степени активности уровень стеариновой кислоты в нейтрофилах крови составляет  $6,38 \pm 0,22$  мкмоль/мл, при 2-й –  $9,12 \pm 1,02$  мкмоль/мл, 3-й –  $10,63 \pm 1,29$  мкмоль/мл. При увеличении температуры и локальной активности воспалительного процесса достоверно снижается уровень полиненасыщенных ЖК – олеиновой, ленолевой и арахидоновой. Для 18:1 и 18:2 ( $p < 0,001$ ), для 20:4 ( $p < 0,05$ ).

Спектр ЖК нейтрофилов в группе больных РА в сочетании с ХГС не отличался от такового в популяции больных РА без гепатита, но имелись достоверные различия с уровнем трикозановой кислоты (20:3) ( $p < 0,05$ ), как предшественника арахидоновой кислоты (20:4). Нетипичные кислоты (20:3) зарегистрированные в нейтрофилах крови больных РА появляются при недостатке арахидоновой кислоты. При этом уменьшение доли тетраеновых и гексаеновых кислот с появлением 20:3 приводит к сохранению степени ненасыщенности липидов, но к более интенсивному образованию оксикислот и лейкотриенов. При РА С уровень нетипичных ЖК несколько ниже, чем в целом при РА, что не позволяет судить о степени влияния данной кислоты на неспецифическую резистентность

нейтрофилов, но свидетельствует о менее активном протекании воспаления при сочетанной патологии. Полученные данные представлены в таблице 2

Таблица 2

Средние значения уровней ЖК в мкмоль/мл при РА в сочетании с ХГС

	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	20:4	20:3
РА С	45,82	3,89	11,78	29,86	12,88	1,47	0,34
n=5	12,67	2,21	2,50	10,54	6,61	0,64	0,11
РА	40,65	5,41	10,04	26,09	12,05	1,62	2,26
n=36	6,37	0,76	1,23	3,83	2,39	0,33	0,97
t-критерий							
РА РА С	0,36	0,65	0,63	0,34	0,12	0,22	1,98*

где – \* $p < 0,05$ .

Мы не наблюдали при иммуногистохимическом исследовании поражения ВГС сегментоядерных нейтрофилов, возможно, с этим связано отсутствие достоверных различий при сопоставлении жирнокислотных спектров мембран нейтрофилов в подгруппах РА и РА С. Установленный факт различия в уровне трикозановой (20:3) кислоты может отражать неспецифическую резистентность данных мононуклеаров к ВГС, учитывая, что появление 20:3 приводит к сохранению степени ненасыщенности липидов и сохранение их пластических свойств.

Жирные кислоты сыворотки крови

В практической деятельности исследование ЖК спектра в сыворотке крови более доступно. Нами установлено, что характер изменений в сыворотке не имеет одинаковой направленности с изменением ЖК спектра в нейтрофилах. Если основу ЖК-спектра нейтрофилов составляют пальмитиновая (16:0)-43 % и олеиновая (18:1)-23% кислоты, в меньшей степени пальмитоолеиновая (16:1)-10 %, стеариновая (16:1)-13 %, линолевая (18:2)-10 % кислоты, а на долю арахидоновой (20:4) приходится лишь 1 %, то в сыворотке крови на долю пальмитиновой и олеиновой кислот (16:0 и 18:1) приходится 92%, и их изменения являются наиболее типичными и достоверными ( $p < 0,01$ ).

Уровень пальмитиновой и олеиновой кислоты при СКВ и РА повышается. Достоверные результаты получены при исследовании ЖК спектров сыворотки для пальмитоолеиновой кислоты (16:1), высокий уровень которой может служить маркером воспалительного процесса ( $p < 0,01$ ).

В норме уровень 16:1 составляет с учетом сигмального отклонения  $0,21 \pm 0,02$  мкмоль/мл. Для СКВ и СС в сыворотке крови достоверно различие с нормой по линолевой кислоте ( $p < 0,05$ ). В количественном отношении спектры ЖК в сыворотке крови достоверно отличались от нормы при РА – по 16:0, 16:1, 18:1, при СКВ – по 16:0, 16:1, 18:1, 18:2, при СС – по 16:1, 18:2; при ОА – по 16:1, 18:1. При сравнении РА с другими ревматическими заболеваниями достоверные различия выявлены в группе РА – ОА – по 16:1, РА – СС – по 18:0, 18:1, 18:2.

Обнаружены различия по общим липидам сыворотки между здоровыми лицами, с одной стороны и ОА, СКВ – с другой, а также между сыворотками больных РА и ОА, РА и СКВ. Уровень 20:4 не зависит от стадии заболевания и максимален при ОА, т.е. там, где арахидоновая кислота меньше всего подвержена дальнейшему метаболизму. При РА возрастает уровень 16:0, 16:1, 18:1, с увеличением СОЭ снижается отношение 18:1/18:2 и возрастает 18:2/20:4 за счет увеличения уровня 18:2. С увеличением длительности заболевания повышается уровень 18:1, 18:2, 20:4. С возрастом увеличивается уровень общих липидов, 16:1 и 18:2, а также

отмечено увеличение уровня общих липидов от II к IV стадии РА. От I к IV стадии РА снижается коэффициент насыщенности и возрастает уровень 18:1 и 18:2, что косвенно указывает на увеличение синтеза простагландинов по использованию пула ненасыщенных жирных кислот. Соотношение 18:1/18:2 возрастает при всех исследованных ревматических состояниях, но максимально этот показатель достигает при РА и ОА, значения снижаются в постепенно от СС к СКВ.

Таблица 3

Жирнокислотный состав сыворотки крови при РА (в мкмоль/мл)

Жирные кислоты	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	20:4	18:1/18:0	18:2/20:4	Насыщен/ Ненасыщ.
РА С (n=5)	9,02 ±1,98	0,93 ±0,36	0,96 ±0,07	6,53 ±1,19	7,31 ±0,97	0,60 ±0,06	0,88 ±0,13	13,62 ±3,91	0,63 ±0,07
Здоровые (n=19)	4,97 ±0,36	0,26 ±0,07	0,93 ±0,05	3,35 ±0,25	6,61 ±0,43	0,51 ±0,04	0,52 ±0,03	18,40 ±4,45	0,55 ±0,07
РА (r=36)	8,29 ±0,80	0,52 ±0,06	1,14 ±0,15	6,51 ±0,59	7,75 ±0,73	0,55 ±0,04	0,93 ±0,07	15,80 ±1,51	0,62 ±0,02
Достоверность различий									
РА С – Здоровые	2,01*	1,86*	0,36	2,61**	0,66	1,26	2,70**	0,81	1,24
РА С – РА	0,34	1,13	1,09	0,01	0,36	0,72	0,32	0,52	0,26

где – \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,02$

Как видно из таблицы 3, различия по ЖК спектру сыворотки крови при РА С достоверны только в сопоставления с нормой. Направленность изменений – увеличение уровня 16:0, 16:1 и 18:1, как следствие – увеличение коэффициента 18:1/18:0. В подгруппе РА С и РА без гепатита достоверных различий по жирнокислотному спектру сыворотки крови не было, что может быть обусловлено сходным метаболизмом при основном заболевании и незначительным влиянием наличия вируса гепатита С на биохимические параметры при РА.

Исследование ЖК-спектра в нейтрофилах и в сыворотке крови позволяет установить сам факт воспалительного процесса по возрастанию уровня пальмитоолеиновой кислоты (16:1) в сыворотке крови, предположить иммунный характер патологии по изменению в соотношении жирных кислот в сторону увеличения доли ненасыщенных (особенно арахидоновой) в нейтрофилах. Спектры ЖК при СКВ, РА имеют одинаковую направленность и характеризуются увеличением абсолютных значений жирных кислот. В нейтрофилах крови достоверное влияние на ЖК оказывала стадия заболевания ( $p < 0,001$ ), при этом уровень арахидоновой кислоты достоверно уменьшался, что указывало на воспалительный характер обнаруженных изменений. Для определения факторов, оказывающих влияние на ЖК спектр при РА, данные исследования соотнесены с длительностью заболевания, возрастом больных, стадией, степенью активности, СОЭ, суставным индексом. Достоверное влияние на ЖК спектр в сыворотке оказывали длительность и стадия заболевания. За аутоиммунный характер процесса отвечает увеличение доли полиненасыщенных жирных кислот в нейтрофилах крови. При дегенеративном процессе и с увеличением возраста больных в целом в сыворотке крови достоверно нарастает уровень пальмитоолеиновой кислоты. В данной группе имеется различие в соотношении насыщенных\ненасыщенных жирных кислот для нейтрофилов крови при РА, что свидетельствует об утрате пластических свойств клеток.

Литература

1. Маянский, Д. Н. Хроническое воспаление / Д. Н. Маянский. М.: Медицина, 1991. 195 с. (82)

2. Юсипова, Н. А. Метаболические основы ревматоидного артрита / Н. А. Юсипова, Л. А. Гончарик, В. Г. Безкровная // Актуальные вопросы диффузных болезней соединительной ткани, коллагенозов: тез. докл. Минск, 1989. 200 с. (148)
3. Elmgreen, J. Inhibition of human neutrophils by auranofin: chemotaxis and metabolism of arachidonate via the 5-lipoxygenase pathway / J. Elmgreen, I. Anfelt-Ronne, O. N. Nielsen // Ann. Rheum. Dis. 1989. Vol. 48, № 2. P. 134 – 138. (283)
4. Increase in the concentration of carbon 18 monounsaturated fatty acids in the liver with hepatitis C: analysis in transgenic mice and humans / K. Moriya [et al.] // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2001. Vol. 281, № 5. P. 1207 – 1212. (347)
5. Leu, G. Z. Anti-HCV activities of selective polyunsaturated fatty acids / G. Z. Leu, T. Y. Lin, J. T. Hsu // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2004. Vol. 318, №. 1. P. 275 – 280. (368)