УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ
«ВИТЕБСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ОРДЕНА ДРУЖБЫ НАРОДОВ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

УДК 577.125.5:612.123.017.1

РЯБЦЕВА
Татьяна Владимировна

ПРООКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ПЛАЗМЫ КРОВИ, ЛИМФОЦИТОВ И НЕЙТРОФИЛОВ В НОРМЕ И ПРИ СИСТЕМНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук
по специальности
14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология
03.01.04 – биохимия

Витебск, 2011

Работа выполнена в учреждении образования «Международный государственный экологический университет имени А.Д.Сахарова»

Научный руководитель:	**Капич Александр Николаевич**, доктор биологических наук, профессор кафедры иммунологии УО «Международный государственный экологический университет имени А.Д. Сахарова»
Второй научный руководитель:	**Голубович Владимир Петрович** доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией прикладной биохимии ГНУ «Институт биоорганической химии НАН Беларуси»
Официальные оппоненты:	**Чиркин Александр Александрович** доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой химии УО «Витебский государственный университет им. П.М.Машерова»
	Тихонова Людмила Владимировна кандидат биологических наук, старший научный сотрудник центральной научно-исследовательской лаборатории УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»
Оппонирующая организация:	УО «Белорусский государственный университет»

Защита диссертации состоится «06» октября 2011 года в «14^{00}» часов в конференц-зале на заседании совета по защите диссертаций Д 03.16.04 при УЗ «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет» по адресу: 210602, г. Витебск, пр-т Фрунзе, 27, конференц-зал; тел. (212) 22-53-80; e-mail: mar_kon@tut.by

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»: 210602, г. Витебск, пр-т Фрунзе, 27

Автореферат разослан «__» _сентября_ 2011 года

Ученый секретарь
совета по защите диссертаций,
д.м.н., доцент М.Р. Конорев

© Витебский государственный ордена Дружбы народов
медицинский университет, 2011

ВВЕДЕНИЕ

К системным заболеваниям соединительной ткани относят такие заболевания как ревматоидный артрит (РА), системный склероз (СС) и системная красная волчанка (СКВ). Изучение состояния про- и антиоксидантных систем пациентов с данными заболеваниями является актуальной задачей современной иммунологии по двум причинам. Во-первых, свободные радикалы и перекисное окисление липидов являются регуляторами иммунологических реакций, а их избыточная активность может приводить к повреждению и развитию аутоиммунных реакций. Во-вторых, сосудистые катастрофы, связанные с атеросклеротическим поражением являются одной из самых частых причин преждевременной летальности при воспалительных ревматологических заболеваниях. Исследования показали, что риск кардиоваскулярных осложнений у пациентов с РА значительно выше, чем в популяции и не отличается от риска пациентов с доказанным кардиоваскулярным риском (сахарный диабет 2-го типа, гиперлипидемия). Данный факт связывают со сходством патогенетических механизмов развития атеросклеротического поражения и ревматоидного поражения сосудов. Ускоренное развитие атеросклероза характерно и для СС, несмотря на отсутствие у подавляющего большинства пациентов традиционных факторов риска. При СКВ смертность от атеросклеротических кардиоваскулярных и цереброваскулярных заболеваний наступает с равной и иногда с большей частотой, чем от самой СКВ. Риск развития острого инфаркта миокарда у пациентов с СКВ в 5-9 раз выше, чем в популяции. Несмотря на значительные успехи, достигнутые в изучении патогенеза заболеваний соединительной ткани, нерешенным остается вопрос о том, какой вклад в накопление токсических продуктов перекисного окисления липидов в плазме крови пациентов с аутоиммунной патологией вносят реакции иммунитета и какова прооксидантная активность внутриклеточных ферментов нейтрофилов и лимфоцитов периферической крови пациентов с РА, СКВ и СС. Одним из важных вопросов является также оценка влияния терапии заболеваний соединительной ткани на состояние про- и антиоксидантного баланса в организме, что позволит регулировать риск развития сердечно-сосудистых осложнений.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Связь работы с крупными научными программами (проектами) и темами. Диссертационная работа выполнена в период 2005-2009 гг. Тема диссертационной работы соответствует приоритетным направлениям фундаментальных и прикладных научных исследований Республики Беларусь на 2006–2010 гг. (Постановление Совета Министров Республики Беларусь № 512 от 17.05.2005 г.): «4. Разработка новых лечебных, диагностических, профилактических и реабилитационных технологий, приборов и изделий медицинского назначения, лекарственных и иммунобиологических препаратов, клеточных и молекулярно-биологических технологий». Работа являлась частью плановых исследований НИИ «Экологических проблем», научно-исследовательской лаборатории «Радиационной иммунологии»

Международного государственного экологического университета имени А.Д. Сахарова. В поддержку темы диссертационной работы был получен грант Министерства образования Республики Беларусь № ГР 2008588 «Оценка прооксидантной активности иммунокомпетентных клеток в норме и при патологии». Часть работы выполнялась в рамках темы НИР по ГНТП «Лечебные и диагностические технологии, подпрограмма «Терапия»: «Разработать и внедрить в клиническую практику метод лечения системных заболеваний соединительной ткани отечественным цитостатическим препаратом Лейкладин» № ГР 20071808.

Цель исследования: разработать, стандартизировать и апробировать метод комплексной биохимической оценки прооксидантной активности лимфоцитов и нейтрофилов, а также плазмы крови.

Задачи исследования:

1. Разработать способ комплексной оценки активности перекисного окисления липидов в процессе активации нейтрофилов и лимфоцитов.
2. Изучить особенности перекисного окисления липидов при активации лимфоцитов и нейтрофилов.
3. Разработать и оптимизировать метод определения прооксидантной активности нейтрофилов, лимфоцитов и плазмы крови.
4. Изучить прооксидантно\антиоксидантный статус пациентов с ревматоидным артритом, системным склерозом и системной красной волчанкой с использованием разработанных методов.
5. Клиническая апробация разработанной системы для оценки влияния цитостатической терапии препаратом «Лейкладин» на динамику процессов перекисного окисления липидов у пациентов с ревматоидным артритом и системным склерозом.

Объект исследования: плазма крови, лимфоциты и нейтрофилы периферической крови 25 условно здоровых доноров, 17 пациентов с ревматоидным артритом, 17 – с системной красной волчанкой, 17 – с системным склерозом.

Предмет исследования: концентрация кислорода, продукты перекисного окисления липидов, функциональная активность нейтрофилов, ферментативная и неферментативная прооксидантная активность плазмы, лимфоцитов и нейтрофилов, активность каталазы лимфоцитов и нейтрофилов.

Положения, выносимые на защиту

1. Установлено, что при активации фитогемагглютинином скорость поглощения кислорода мононуклеарами увеличивается в 5,8 раза, а скорость накопления продуктов перекисного окисления липидов увеличивается в 20 раз по сравнению с состоянием покоя. Установлено, что при фагоцитозе микроорганизмов нейтрофилами скорость образования продуктов перекисного окисления липидов возрастает в 5,7 раза по сравнению с состоянием покоя, при этом скорость образования продуктов перекисного окисления липидов при фагоцитозе *S. saprophyticus* и *S. cerevisiae* в 1,6 раза и 1,2 раза соответственно меньше чем, при фагоцитозе *E.coli*. Доказано проявление антиоксидантных

свойств плазмой крови, а также ионами железа и меди в процессе фагоцитоза.

2. Разработан метод, который позволяет проводить комплексную оценку прооксидантной активности лимфоцитов и нейтрофилов, а также плазмы крови. С помощью данного метода впервые установлено, что прооксидантная активность плазмы крови превышает прооксидантную активность нейтрофилов и лимфоцитов в 3,8 и 1,8 раза соответственно, а прооксидантная активность лимфоцитов превышает прооксидантную активность нейтрофилов более чем в 2 раза.
3. Коэффициент суммарной прооксидантной активности пациентов с ревматоидным артритом равна 0,69 (0,57;0,74), пациентов с системным склерозом - 0,34 (0,13;0,44), пациентов с системной красной волчанкой - 0,15 (0,12;0,14). Полученные результаты являются дополнительным критерием для диагностики данных заболеваний.
4. Установлено, что цитостатический препарат «Лейкладин» опосредовано проявляет антиоксидантную активность, снижая концентрацию продуктов перекисного окисления липидов в плазме крови и стимулируя активность каталазы лимфоцитов и нейтрофилов у пациентов с ревматоидным артритом и системным склерозом.

Личный вклад соискателя. Совместно с научными руководителями определены цель и задачи настоящей работы. Соискателем проведено планирование и выполнение всех этапов диссертационного исследования. Все основные научные результаты, изложенные в диссертации, автором получены лично. Рябцева Т.В. выполнила 80% исследований по теме диссертации. Соискателем выполнены все эксперименты по изучению динамики концентрации кислорода и накоплению продуктов перекисного окисления липидов при фагоцитозе и митогениндуцированной активации мононуклеаров. Совместно с научным руководителем разработан метод определения прооксидантной активности лимфоцитов, нейтрофилов и плазмы крови. Автором представленной работы была создана база данных, осуществлена статистическая обработка полученных результатов с использованием методов непараметрической статистики. Рябцевой Т.В. проведен логистический регрессионный анализ для прогнозирования развития РА, СС и СКВ с использованием таких параметров как концентрация продуктов перекисного окисления липидов, прооксидантная активность лимфоцитов и нейтрофилов, плазмы. При разработке математической модели оценки общей прооксидантной активности помощь автору оказывал сотрудник лаборатории прикладной биохимии ГНУ «Институт биоорганической химии НАН Беларуси». Отбор и лечение пациентов для исследования произведен сотрудниками второй кафедры внутренних болезней УО «Белорусский государственный медицинский университет». Соискателем произведен анализ полученных данных, сделано обобщение полученных результатов, сформулированы выводы исследования, написаны материалы печатных работ, рукопись диссертации и автореферат. Вклад автора в совместные публикации в соавторстве с научным руководителем составляет 85%.

Апробация результатов диссертации. Материалы диссертационной работы были представлены и обсуждены на: международной научной конференции “Сахаровские чтения: экологические проблемы XXI века” (Минск, Беларусь, май 2007, 2008 гг.); республиканской научной конференции «Молекулярная медицина и биохимическая фармакология» (Гродно, Беларусь, 28-29 июня, 2007г.); международной конференции молодых ученых по молекулярной биологии и генетике (Киев, Украина, 2007г.); международной научной конференции «Проблемы регуляции висцеральных функций» (Минск, Беларусь, сентябрь, 2008 г.); международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, Россия, 2008 и 2009 гг.); съезде ревматологов России (Москва, Россия, 2009 г.).

Опубликованность результатов диссертации. Основные научные результаты диссертации опубликованы в 4 статьях (1,58 авторских листа) в рецензируемых научных журналах, включенных в перечень изданий ВАК. Кроме этого материалы диссертационного исследования опубликованы в 15 печатных научных работах: в материалах научных конференций и съездов – 5, в тезисах докладов научных конференций и съездов –10. Всего опубликовано 19 печатных научных работ (5 единолично, всего 3,5

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, общей характеристики работы, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, трех глав с результатами собственных исследований, заключения, библиографического списка, включающего список использованных источников - 159 (28 русскоязычных и 131 зарубежных) и список публикаций соискателя по теме диссертационной работы (20 работ). Диссертационная работа изложена на 120 страницах машинописного текста, иллюстрирована 32 рисунками и 14 таблицами.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования. Объектом исследования являлись лимфоциты и нейтрофилы, а также плазма крови практически здоровых доноров (n=25) и пациентов с ревматоидным артритом (n=17), системной красной волчанкой (n=17) и системным склерозом (n=17), проходивших лечение на базе Республиканского ревматологического центра в 9-й ГКБ г. Минска.

Выделение лимфоцитов и нейтрофилов из периферической крови осуществляли с помощью ступенчатого градиента плотности. Изучение взаимосвязи показателей активности фагоцитоза и ПОЛ проводили в экспериментах как с цельной гепаринизированной кровью в качестве источника фагоцитов, так и с выделенными нейтрофилами. В качестве объектов фагоцитоза использовали суспензии прокариотических (*S. saprophyticus, S. aureus*, *E. coli*) и эукариотических микроорганизмов (*S. cerevisiae*). Бактерицидную активность определяли методом Decleva et al. В качестве тест-объекта для определения бактерицидной активности нейтрофилов использовали *S. aureus*. Стимуляцию лимфоцитов *in vitro* осуществляли митогенами: конканавалин А и фитогемагглютинин. Активацию процессов ПОЛ оценивали по изменению концентрации кислорода в среде методом

оксиграфии. Определение продуктов ПОЛ проводили в реакции с тиобарбитуровой кислотой. Активность каталазы определяли спектрофотометрическим методом, который основан на способности перекиси водорода образовывать с солями молибдена стойкий окрашенный комплекс.

Полученные данные систематизировали и обрабатывали с помощью персонального компьютера и программы «*StatSoft STATISTICA 6.0.*». Результаты представляли в виде медианы и процентилей (Me (25‰;75‰)). Для оценки однородности двух независимых выборок применяли критерий Манна-Уитни. При оценке двух зависимых групп (до и после терапии) использовали метод Уилкоксона. Критический уровень значимости *p* нулевой гипотезы принимали равным 0,05. Для изучения связи между параметрами использовали непараметрический метод вычисления коэффициента ранговой корреляции Спирмена.

Результаты собственных исследований

Способ одновременной регистрации клеточных и молекулярных параметров в процессе активации иммунокомпетентных клеток. Для регистрации клеточных и молекулярных параметров при активации лимфоцитов и нейтрофилов, суспензию клеток помещали в оксиграфическую ячейку, в основе которой лежит электрод Кларка, после достижения состояния равновесия в ячейку добавляли активационный фактор (для нейтрофилов – суспензию микроорганизмов предварительно инактивированную, для лимфоцитов – раствор митогена) и регистрировали изменение концентрации кислорода в среде, после остановки реакции микроскопически регистрировали клеточные параметры, а также определяли продукты ПОЛ (рисунок 1).

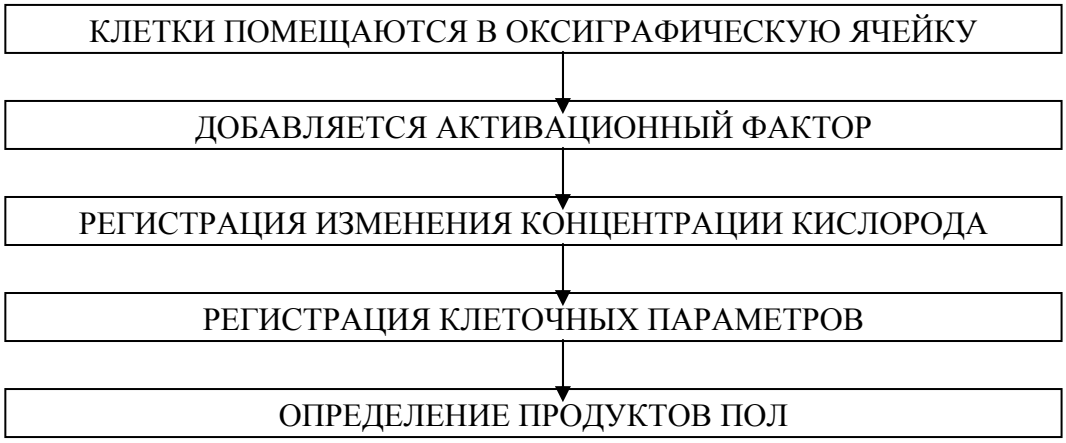


Рисунок 1 – Способ одновременной регистрации клеточных и молекулярных параметров в процессе активации нейтрофилов и лимфоцитов

Для изучения содержания растворенного кислорода в среде в процессе фагоцитоза в оксиграфическую ячейку добавляли 500 мкл суспензии нейтрофилов ($3*10^6$ клеток/мл) в растворе Эрла. После стабилизации уровня кислорода последовательно добавляли 50 мкл $CaCl_2$ и 500 мкл суспензии микроорганизма, предварительно инактивированной высокой температурой для

того, чтобы исключить потребление кислорода микроорганизмами. Мониторинг содержания кислорода проводили в течение 60 мин.

Для оценки изменения концентрации растворенного кислорода в среде в процессе митогенной активации лимфоцитов с помощью оксиграфа Hansatech в ячейку добавляли 900 мкл суспензии лимфоцитов (3*106 клеток/мл) в растворе Эрла. После стабилизации уровня кислорода последовательно добавляли 50 мкл $CaCl_2$ и 50 мкл лектина. Мониторинг содержания кислорода проводили в течение 60 мин.

Применение данного способа позволило изучить динамику концентрации кислорода (таблица 1) и продуктов ПОЛ (рисунок 2, 3) при фагоцитозе микроорганизмов.

Таблица 1 – Изменение концентрации кислорода в покое и в процессе фагоцитоза *S. saprophyticus* нейтрофилами

Время инкубации, мин	В покое		При фагоцитозе	
	Концентрация кислорода, нмоль/л	Скорость поглощения кислорода, нмоль/мин	Концентрация кислорода, нмоль/л	Скорость поглощения кислорода, нмоль/мин
0	231,1 ± 5,4	---	233,1 ± 3,7	---
5	228,1± 3,6	0,6 ± 0,05	226,1 ± 6,6	1,4 ± 0,42
10	226,1 ± 3,4	0,4 ± 0,19	215,4 ± 5,3* **	2,14 ± 0,04* **
15	223,4 ± 3,2	0,54 ± 0,08	205,8 ± 4,2* **	1,92 ± 0,06*
20	222,7 ± 2,1	0,14 ± 0,02 **	193,1 ± 6,5* **	2,54 ± 0,03* **
25	220,1 ± 6,2	0,52 ± 0,11	178,4 ± 7,2* **	2,94 ± 0,03* **
30	219,4 ± 2,5 **	0,14 ± 0,04 **	170,3 ± 5,1* **	1,62 ± 0,12*
35	217,6 ± 2,8 **	0,36 ± 0,06 **	165,4 ± 5,4* **	0,98 ± 0,11* **
40	215,4 ± 2,6 **	0,44 ± 0,02 **	163,4 ± 3,5* **	0,41 ± 0,13 **
45	213,6 ± 6,8 **	0,36 ± 0,03 **	160,4 ± 4,2* **	0,62 ±0,24 **
50	212,2 ± 5,7 **	0,28 ± 0,01 **	158,7 ± 6,5* **	0,34 ± 0,11 **
55	211,4 ± 3,7 **	0,16 ± 0,05 **	156,4 ± 6,3* **	0,46 ± 0,08* **
60	210,7 ± 3,4 **	0,14 ± 0,06 **	152,4 ± 4,2* **	0,42 ± 0,16* **

Примечание: * - p≤0,05 при сравнении с контролем,
** - p≤0,05 при сравнении с началом измерений

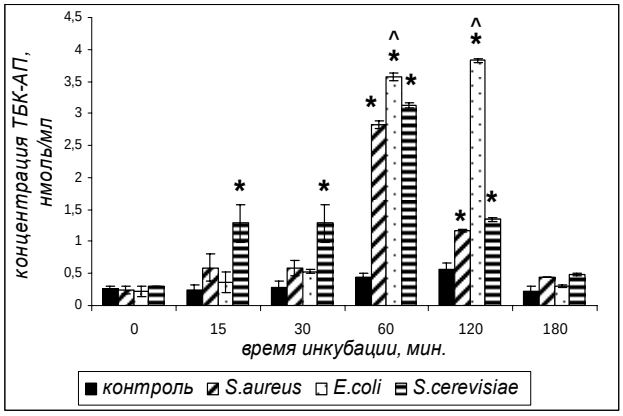


Рисунок 2 - Концентрация продуктов перекисного окисления липидов при фагоцитозе нейтрофилами в цельной крови

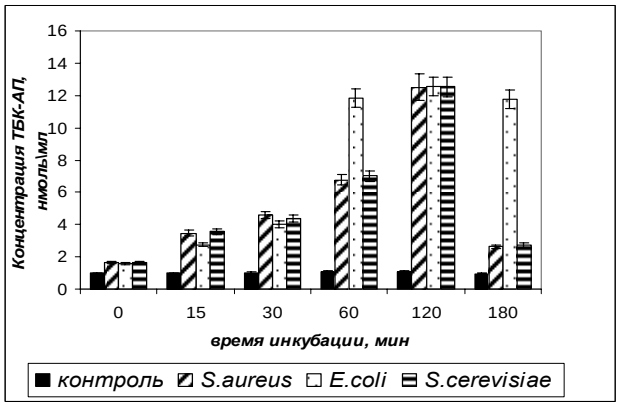


Рисунок 3 - Концентрация продуктов перекисного окисления липидов при фагоцитозе изолированными нейтрофилами

Примечание: * - p≤0,05 при сравнении с нулевой точкой, ^ - p≤0,05 при сравнении между группами, метод Манна-Уитни

Изучение динамики накопления ТБК-АП при фагоцитозе разных микроорганизмов нейтрофилами гепаринизированной крови показало, что, более высокие значения данного показателя наблюдались при фагоцитировании грамотрицательной бактерии *E. Coli.*

Анализ накопления продуктов ПОЛ при фагоцитозе микроорганизмов нейтрофилами, предварительно инкубированными с ионами железа и меди, показал, что ионы меди обладают более выраженными антиоксидантными свойствами, чем ионы железа, минимальное накопление продуктов ПОЛ в процессе фагоцитоза *in vitro* наблюдали при концентрации ионов железа равной 0,25μМ, а ионов меди 0,15 μМ.

При помощи разработанного способа установлено, что скорость поглощения кислорода мононуклеарами при их активации ФГА увеличивается в 3 раза (таблица 2), а скорость накопления продуктов ПОЛ увеличивается в 20 раз при активации ФГА и в 35 раз при активации КонА по сравнению с состоянием покоя (таблица 3).

Таблица 2 – Динамика скорости поглощения кислорода мононуклеарами в покое и при активации фитогемагглютинином

Время инкубации, мин	Скорость поглощения кислорода лимфоцитами в покое, нмоль/мин	Скорость поглощения кислорода лимфоцитами при активации, нмоль/мин	Достоверность различий
0-5	0,92 (0,87;0,93)	0,26 (0,21;0,42)	$p<0,05$
5-10	0,82 (0,81;0,85)	3,44 (3,21;3,84)	$p<0,05$
10-15	0,70 (0,64;0,78)	2,28 (2,25;2,42)	$p<0,05$
15-20	0,68 (0,66;0,71)	3,94 (3,48;3,96)	$p<0,05$
20-25	0,64 (0,61;0,69)	1,54 (1,47;1,61)	$p<0,05$
25-30	0,64 (0,61;0,66)	0,62 (0,52;0,68)	$p>0,05$

Таблица 3 – Скорость накопления альдегидных продуктов перекисного окисления липидов в покое и при активации мононуклеаров

Время инкубации, мин	Скорость накопления ТБК-АП в покое, нмоль/час	Скорость накопления ТБК-АП при активации лимфоцитов ФГА, нмоль/час	Скорость накопления ТБК-АП при активации лимфоцитов КонА, нмоль/час
0-30	0,24 (0,06; 0,36)	2,22 (1,80;2,58)*	0,36 (0,12;0,72)
30-60	0,60 (0,18;1,20)	0,36 (0,06;0,54)*	1,20 (1,08;1,44)
60-90	0,12 (0,06;0,018)	0,42 (0,24;0,48)*	4,21 (4,14;4,44)*
90-120	0,12 (0,06;0,36)	2,40 (1,80;3,01)*	0,36(0,12;0,48)*
120-150	-0,06 (-0,18;0,12)	0,6 (0,12;1,20)*	0,48 (0,18;0,60)*

Примечание: * - различия достоверны с $p<0,05$

Метод определения прооксидантной активности лимфоцитов, нейтрофилов и плазмы крови человека *in vitro*. Суть метода заключается в том, что биологическую жидкость, в которой предполагается наличие прооксидантной активности, инкубировали в присутствии полиненасыщенной жирной кислоты, например, линолевой, после чего определяли наличие продуктов перекисного окисления липидов в реакционной смеси. О

прооксидантной активности судили по ускорению перекисного окисления субстрата, по сравнению с контролем, где вместо биологической жидкости использовали физиологический раствор. Для сравнительной оценки прооксидантных свойств рассчитывали прооксидантную активность (ПОА) по следующей формуле:

$$ПОА=((C_{опыта} – C_{контроль})/t_{инкуб.}),$$

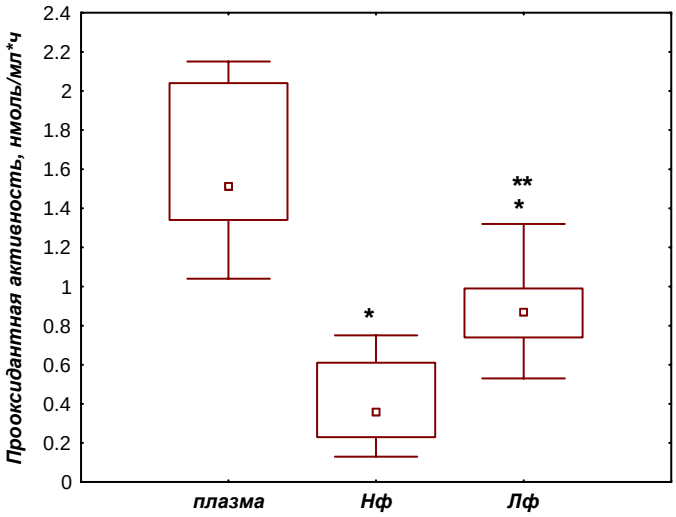
где *ПОА* – прооксидантная активность, нмоль\мл*ч; $C_{опыта}$ – концентрация ТБК-АП в опытной пробе, нмоль\мл; $C_{контроль}$ – концентрация ТБК-АП в контрольной пробе, нмоль\мл, $t_{инкуб.}$ – время инкубации, ч.

В результате проведенных исследований установлено, что при инкубации плазмы крови в присутствии перекиси водорода (0,1 мМ) и линолевой кислоты (0,3 мМ) в реакционной смеси происходило накопление ТБК-АП в 1,9 раза превышающее контрольные значения, что свидетельствует о наличии определенных прооксидантных свойств в плазме крови практически здоровых доноров. Изучение динамики процесса перекисного окисления линолевой кислоты, инициированного плазмой крови, показало, что максимальное количество ТБК-АП в оптимизированной системе накапливалось через 2 часа инкубации при температуре 37^0С. В дальнейшем наблюдали уменьшение концентрации ТБК-АП, что, по-видимому, было связано с разрушением альдегидных продуктов, реагирующих с ТБК. В опытных пробах скорость окисления составила 1,98 (1,03;2,02) нмоль/мл*ч, что достоверно выше (p=0,009, тест Манна-Уитни) контрольных значений – 0,48 (0,28;0,55) нмоль/мл*ч. Существенное влияние на проявление прооксидантных свойств плазмы крови оказывал состав реакционной смеси. В присутствии комплексообразующих буферов интенсивность реакций перекисного окисления снижалась, о чем свидетельствовало уменьшение концентраций ТБК-АП в реакционных системах, в которых использовались фосфатный и трисHCl буфера (pH=7.2-7.4). Добавление перекиси водорода во всех случаях стимулировало прооксидантные свойства плазмы, при этом увеличение концентрации перекиси водорода в системе приводило к активации процессов ПОЛ. Эксперименты по изучению разницы в прооксидантной активности плазмы и сыворотки крови показали, что плазма крови обладает более выраженными прооксидантными свойствами. Прооксидантная активность сыворотки крови составила 0,22 (0,07;0,45) нмоль/мл*ч, что в 6,8 раз меньше прооксидантной активности плазмы крови (1,50 (1,02;2,27) нмоль/мл*ч).

Изучение прооксидантной активности клеток иммунной системы показало, что при инкубации лизата лимфоцитов/нейтрофилов с эмульсией линолевой кислоты в присутствии перекиси водорода (0,1 мМ) в реакционной смеси происходит накопление ТБК-активных продуктов, что свидетельствует о проявлении лизатом лимфоцитов/нейтрофилов прооксидантной активности. В системе с инициированным нейтрофилами перекисным окислением линолевой кислоты происходило накопление ТБК-АП с 0,29 (0,27;0,29) нмоль/мл до 0,83 (0,53;1,21) нмоль/мл (p≤0,05). В системе с инициированным лимфоцитами перекисным окислением линолевой кислоты происходило накопление ТБК-АП с 0,11 (0,08; 0,11) нмоль/мл до 1,51 (1,22; 1,56) нмоль/мл (p=0,009).

Эксперименты по оптимизации условий постановки описанной выше методики показали, что оптимальное время инкубации смеси составляет 90 мин.

Сравнительная оценка прооксидантной активности лизата лимфоцитов и нейтрофилов практически здоровых доноров свидетельствовала, что прооксидантная активность лимфоцитов превышает прооксидантную активность нейтрофилов более чем в 2 раза. Так, скорость окисления линолевой кислоты лизатом лимфоцитов составила 0,86 (0,74;0,99) нмоль/мл*ч, а скорость окисления лизатом нейтрофилов – 0,46 (0,31;0,75) нмоль/мл*ч (рисунок 4)



*- различия достоверны с $p<0,05$ по сравнению с плазмой крови, ** - различия достоверны с $p<0,05$ при сравнении лимфоцитов и нейтрофилов

Рисунок 4 – Прооксидантная активность плазмы крови и лизатов нейтрофилов и лимфоцитов практически здоровых доноров

Таким образом, результаты наших исследований показывают, что лимфоциты обладают более выраженной прооксидантной активностью по сравнению с нейтрофилами. Однако это касается лишь окислительной способности внутриклеточных факторов.

Состояние антиоксидантно\прооксидантного баланса пациентов с системной красной волчанкой (СКВ), системным склерозом (СС) и ревматоидным артритом (РА). Для характеристики состояния антиоксидантно\прооксидантного равновесия пациентов с системными заболеваниями соединительной ткани изучали следующие параметры: концентрация ТБК-АП в плазме крови, прооксидантная активность плазмы, лимфоцитов и нейтрофилов, скорость накопления ТБК-АП в процессе фагоцитоза и при митогениндуцированной активации лимфоцитов, активность каталазы лимфоцитов и нейтрофилов. Полученные результаты представлены в таблице 4.

Для выяснения взаимосвязей между изучаемыми параметрами провели корреляционный анализ, в результате которого обнаружили прямую зависимость концентрации ТБК-АП в плазме с прооксидантной активностью плазмы и прооксидантной активностью лимфоцитов. Кроме того, отмечали обратную зависимость концентрации ТБК-АП в плазме и накоплением продуктов ПОЛ при активации лимфоцитов. Можно предположить, что

процессы ПОЛ, развивающиеся при активации лимфоцитов, могут участвовать в утилизации продуктов ПОЛ, накапливающихся в плазме крови. Обратную корреляцию прооксидантной активности нейтрофилов наблюдали с прооксидантной активностью плазмы и накоплением продуктов ПОЛ при фагоцитозе. Очевидно, что при РА, СС и СКВ наблюдается определенный дисбаланс про- и антиоксидантных систем в организме. Исходя из этого, при оценке состояния про- и антиоксидантных систем мы рекомендуем определять не только активность антиоксидантных ферментов и продуктов ПОЛ, но и прооксидантную активность лизата лимфоцитов и нейтрофилов. Определение прооксидантной активности при ревматических заболеваниях, можно использовать в качестве маркера развития вторичной сердечно-сосудистой патологии.

Таблица 4 – Состояние про- и антиоксидантных систем в контроле, при ревматоидном артрите, системном склерозе и системной красной волчанке

№ п\п	Показатель	Контроль (n=15)	РА (n=17)	СКВ (n=17)	СС (n=17)
1	Концентрация ТБК-АП в плазме, нмоль/мл	3,72 (2,79;3,94)	**9,12 * (5,25; 9,45) ↑**	4,09 ** (3,33;6,08)	4,21 ** (2,73;5,25)
2	Накопление ТБК-АП в процессе фагоцитоза, нмоль/ч	5,14 (4,27; 5,08)	**8,80* (8,71;8,72) ↑**	**7,32* (7,25;7,54) ↑**	4,60 ** ^ (4,31;4,48)
3	Накопление ТБК-АП в процессе активации лимфоцитов, нмоль/ч	1,33 (1,29;1,42)	**0,43* (0,24;0,42) ↓**	**0,34* (0,28;0,33) ↓**	**0,48* (0,46;0,54) ↓**
4	Прооксидантная активность плазмы, нмоль/мл*ч	1,51 (1,34;2,04)	3,32 (1,37; 3,36)	**3,39* (2,59;4,03) ↑**	**3,62* ** (2,42;5,54) ↑**
5	Прооксидантная активность нейтрофилов, нмоль/мл*ч	0,36 (0,33;0,61)	**0,24* (0,18; 0,30) ↓**	0,58 (0,50;0,66)	0,59 (0,51;0,66)
6	Прооксидантная активность лимфоцитов, нмоль/мл*ч	0,87 (0,74;0,99)	**0,18* (0,13;0,21)↓**	1,02* ** (0,87;1,13)	**0,52 * ^ ** (0,43;0,66)↓**
7	Каталаза нейтрофилов, е.а.	85,63 (74,13;87,45)	77,33 (45,14;98,94)	**97,09* ** (92,50;115,18) ↑**	90,02 (54,70;118,77)
8	Каталаза лимфоцитов, е.а.	56,31 (47,51;56,83)	**28,64* (19,60;34,71) ↓**	46,71 ** (41,74;67,36)	**26,55* ^ (21,58;38,40) ↓**

Примечания: * - различия достоверны с $p \leq 0,05$, критерий Манна-Уитни
↓ - ниже контрольных значений
↑ - выше контрольных значений

В связи с тем, что при РА, СКВ и СС наблюдается разнонаправленный характер изменения прооксидантной активности плазмы, лимфоцитов и нейтрофилов полученные результаты подверглись тщательному математическому анализу. На основании формулы, предложенной старшим научным сотрудником, кандидатом физико-математических наук Фигловским В.А., учитывающей вклад изменения каждого из изучаемых параметров можно рассчитать общую антиоксидантно / прооксидантную активность организма при РА, СКВ и СС по сравнению с контролем

$$F = \sum_{i=1,8} fK(i)*K$$

где F - результирующая функция, i – номер показателя от 1 до 8, fn(i) = значение теста, К=0, если max(i)>fn(i)>min(i) и К=1, если fn(i)>max(i) или >fn(i)<min(i), fK(i) – теоретически рассчитанный коэффициент (кластерный анализ) для каждой отдельной характеристики: fK (ТБК-АП)=0,225; fK (ПА-пл)=0,022; fK (ПА-лф)=0,225; fK (ПА-нф)=0,011; fK (ПА-фаг)=0,045; fK (ПА-лек)=0,079; fK (Кат-лф)=0,337; fK (Кат-нф)=0,056.

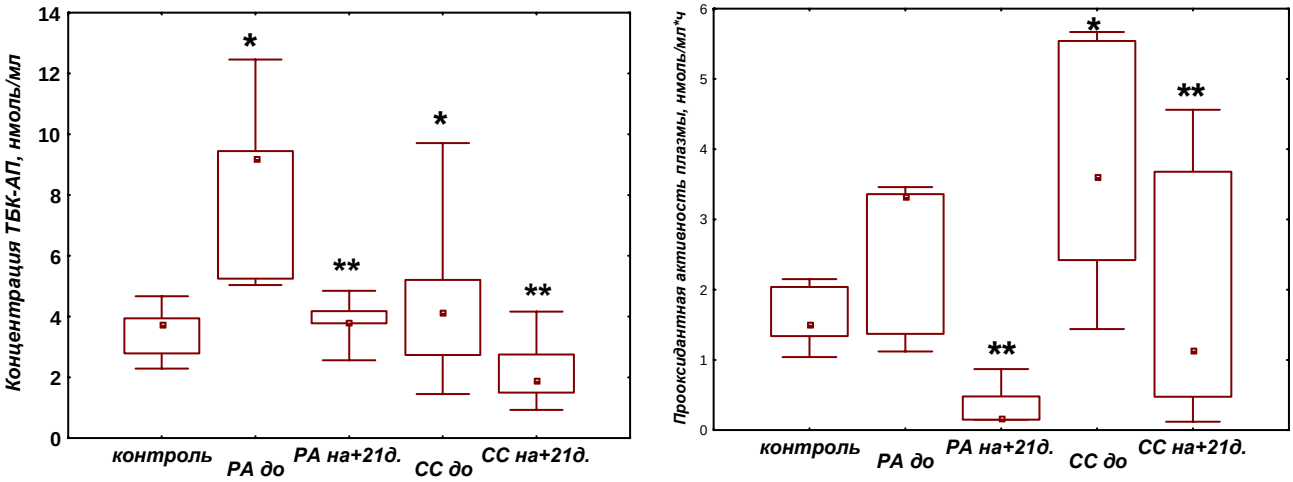
В результате вычислений, приняв значение функции практически здоровых доноров F=0, были получены следующие значения функции F при аутоиммунной патологии: для РА F=0,69 (0,57;0,74), СКВ F=0,15 (0,12;0,14) и СС= 0,34 (0,13;0,44). Полученные различия статистически значимы с $p \leq 0,01$. Таким образом, максимальное отклонение от контрольных значений наблюдается при РА, минимальное – при СКВ. Данную формулу, учитывающую вклад как клеточной, так и гуморальной прооксидантной активности крови можно использовать в качестве дополнительного критерия при постановке диагноза.

На основании логистического регрессионного анализа были составлены уравнения и построены графики, которые могут быть использованы для прогнозирования вероятности развития РА, СС и СКВ по состоянию прооксидантно/антиоксидантного баланса. Анализ показал, что для прогнозирования РА возможно использование таких параметров как концентрация ТБК-АП, прооксидантная активность плазмы крови, прооксидантная и каталазная активность лизата лимфоцитов и нейтрофилов; для прогнозирования СС – прооксидантная активность плазмы, лизата лимфоцитов и нейтрофилов, а также активность каталазы лимфоцитов и нейтрофилов; для прогнозирования СКВ – концентрация ТБК-АП в плазме, прооксидантная активность плазмы и активность каталазы в лимфоцитах и нейтрофилах.

Традиционный подход к лечению как РА, так и СС по-прежнему базируется на комбинации противовоспалительных, цитотоксических и иммуносупрессивных препаратов. На сегодняшний день изучается возможность применения отечественного цитостатического препарата «Лейкладин» для лечения пациентов с РА и СС, устойчивых к базисной терапии. Основным механизмом действия лейкладина является индукция

апоптоза лимфоцитов, что может сопровождаться активацией процессов перекисного окисления липидов.

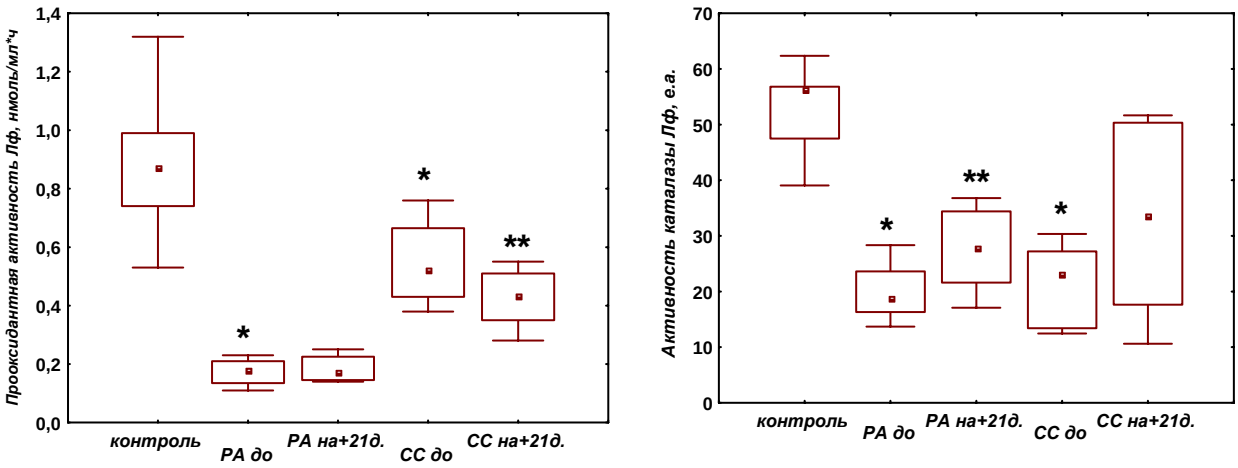
Изучение концентрации ТБК-АП в плазме крови показало, что на +21 день после окончания курса лейкладина концентрация ТБК-АП в плазме крови пациентов с РА снижается с 9,21 (5,25;9,45) до 3,81 (3,78; 4,18) нмоль/мл и с 4,12 (2,73;5,20) до 1,95 (1,73;2,75) нмоль/мл при СС. Аналогичные изменения наблюдали при изучении прооксидантной активности плазмы. На +21 день после окончания курса лейкладина прооксидантная активность плазмы крови пациентов с РА и СС снижается с 3,32 (1,37;3,36) до 0,17 (0,15; 0,48) нмоль/мл и с 3,62 (2,42;5,54) до 1,13 (0,47;3,68) нмоль/мл соответственно (рис.5). Снижение прооксидантной активности свидетельствует об уменьшении активности окислительных процессов плазмы, а также, возможно, об активации антиоксидантных систем в плазме крови.



*- p<0,05, при сравнении с контрольной группой, метод Манна-Уитни
** - p<0,05 при сравнении до и после терапии, метод Уилкоксона

Рисунок 5 – Концентрация ТБК-АП и прооксидантная активность плазмы пациентов с ревматоидным артритом (РА) и системным склерозом (СС) до начала и на +21 день после терапии Лейкладином

В результате терапии РА и СС лейкладином прооксидантная активность лимфоцитов пациентов с СС снижалась на 20,9%, у пациентов с РА отмечалась лишь тенденция к уменьшению, которое составило 2,8%. При этом наблюдали активацию антиоксидантных клеточных систем. Так, на +21 день после окончания курса Лейкладина активность каталазы лимфоцитов периферической крови пациентов с РА и СС увеличивается на 49,6% и 44,7%. соответственно (рис.6).

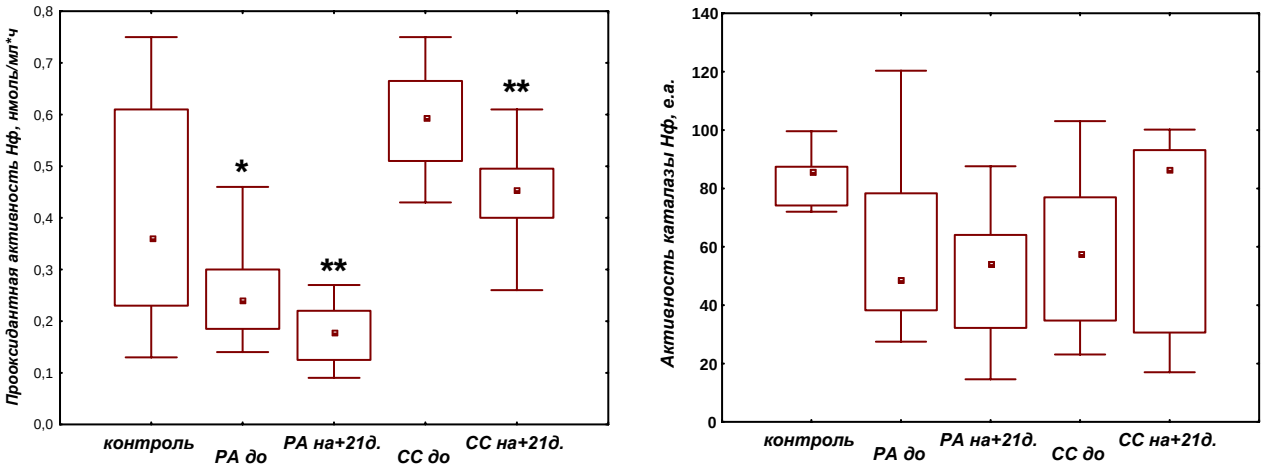


*- p<0,05, при сравнении с контрольной группой, метод Манна-Уитни

** - p<0,05 при сравнении до и после терапии, метод Уилкоксона

Рисунок 6 – Прооксидантная и каталазная активность лимфоцитов пациентов с ревматоидным артритом (РА) и системным склерозом (СС) до начала и на +21 день после терапии Лейкладином

Прооксидантная активность нейтрофилов периферической крови пациентов с РА и СС на +21 день после окончания курса Лейкладина достоверно уменьшается на 33,3% и 30,8% соответственно. После курса препарата активность каталазы нейтрофилов периферической крови пациентов с РА и СС достоверно не изменялась. Однако все же наблюдалось увеличение ее активности на 11,4% при РА и на 49,9% при СС (рис. 7).



*- p<0,05, при сравнении с контрольной группой, метод Манна-Уитни

** - p<0,05 при сравнении до и после терапии, метод Уилкоксона

Рисунок 7 – Прооксидантная и каталазная активность нейтрофилов пациентов с ревматоидным артритом (РА) и системным склерозом (СС) до начала и на +21 день после терапии Лейкладином

Корреляционный анализ взаимосвязи эффективности лечения ревматоидного артрита (по DAS28) с иммунологическими и биохимическими параметрами показал, что наиболее высокие значения коэффициента корреляции отмечали при оценке зависимости между DAS28 и активностью каталазы нейтрофилов, прооксидантной активностью лимфоцитов, процентным

числом CD19+-клеток и процентным числом CD19+-клеток, экспрессирующих маркер апоптоза.

Результаты исследования состояния перекисного окисления липидов у пациентов с РА и СС до начала терапии лейкладином свидетельствовали о дисбалансе прооксидантной и антиоксидантной активности. Наблюдали повышение прооксидантной активности плазмы крови и низкую активность внутриклеточной каталазы, как в лимфоцитах, так и в нейтрофилах пациентов с РА и СС. Однако в процессе терапии данных заболеваний цитостатическим препаратом «Лейкладин» происходило постепенное возрастание активности каталазы и снижение концентрации продуктов ПОЛ в плазме крови, что является признаком восстановления прооксидантно-антиоксидантного баланса в организме. Таким образом, терапия РА и СС лейкладином позволяет восстановить баланс в работе про- и антиоксидантных систем.

Анализ результатов, позволяет сделать следующий вывод: оценка прооксидантно-антиоксидантного баланса может использоваться в качестве дополнительного диагностического критерия для системных заболеваний соединительной ткани, а также в качестве дополнительного критерия эффективности проводимой терапии. Цитостатическая терапия препаратом «Лейкладин» приводит к регулированию прооксидантно-антиоксидантного баланса, что позволит снизить медикаментозную нагрузку у данных пациентов, исключив или уменьшив дозировку препаратов антиоксидантного действия.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные научные результаты диссертации

В результате проведенных исследований сформулированы следующие выводы:

1. При активации фитогемагглютинином скорость поглощения кислорода мононуклеарами увеличивается в 5,8 раза, а скорость накопления продуктов перекисного окисления липидов увеличивается в 20 раз по сравнению с состоянием покоя [2, 7, 15, 16].
2. При фагоцитозе микроорганизмов нейтрофилами скорость образования продуктов перекисного окисления липидов возрастает в 5,7 раза по сравнению с состоянием покоя, при этом скорость образования продуктов перекисного окисления липидов при фагоцитозе *S. saprophyticus* и *S. cerevisiae* в 1,6 раза и 1,2 раза соответственно меньше чем, при фагоцитозе *E.coli*. Доказано проявление антиоксидантных свойств плазмой крови, а также ионами железа и меди в процессе фагоцитоза [1, 10, 11, 12, 13, 14].
3. Разработан метод, позволяющий проводить комплексную оценку прооксидантной активности лимфоцитов, нейтрофилов и плазмы крови. С помощью данного метода впервые установлено, что прооксидантная активность плазмы крови превышает прооксидантную активность нейтрофилов и лимфоцитов в 3,8 и 1,8 раза соответственно, а прооксидантная активность лимфоцитов превышает прооксидантную активность нейтрофилов более чем в 2 раза [3, 5, 18].
4. Разработана математическая модель для оценки состояния антиоксидантно\прооксидантного баланса, использование которой свидетельствуют о том, что суммарная прооксидантная активность у пациентов с ревматоидным артритом равна 0,69 (0,57;0,74), пациентов с системным склерозом - 0,34 (0,13;0,44), пациентов с системной красной волчанкой - 0,15 (0,12;0,14). Полученные результаты являются дополнительным критерием для диагностики данных заболеваний [6, 9, 17].
5. Установлено, что цитостатический препарат «Лейкладин» опосредовано оказывает антиоксидантное действие, показана его способность снижать концентрацию продуктов перекисного окисления липидов в плазме крови и вызывать стимуляцию активности каталазы лимфоцитов и нейтрофилов у пациентов с ревматоидным артритом и системным склерозом [4, 8, 19].

Рекомендации по практическому использованию результатов

Результаты изучения роли перекисного окисления липидов в реакциях иммунитета являются основой для разработки новых методов терапии, основанных на управлении реакциями перекисного окисления липидов в организме [1, 3, 4, 5, 7, 12].

Разработанный метод определения прооксидантной активности плазмы крови, нейтрофилов и лимфоцитов используется в научных и клинико-диагностических лабораториях для изучения прооксидантно-антиоксидантного

баланса организма (акты внедрения в ЦНИЛ БГМУ лаборатория гемо- и лимфосорбции).

Материалы диссертации используются в практике работы учреждений медицинского и биологического профиля, а также в учебно-педагогическом процессе вузов медицинского, биологического и химического профиля. Метод изучения прооксидантной активности плазмы, нейтрофилов и лимфоцитов нашел свое применение в исследовании гемосовместимости полимеров [20] (Инструкция по применению «Метод комплексной оценки гемо(не)совместимости полимерных материалов медицинского назначения» Утверждена МЗ РБ 18.12.2009, регистрационный номер №078-0709).

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СОИСКАТЕЛЯ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ

Статьи в рецензируемых журналах

1 Рябцева, Т.В. Особенности процессов перекисного окисления липидов при фагоцитозе микроорганизмов с различным строением клеточной стенки / **Т.В. Рябцева**, А.Н. Капич // Изв. НАН Беларуси. Сер. биологических наук. – 2009. – №4. – С.70–75.

2 Рябцева, Т.В. Особенности перекисного окисления липидов в процессе неспецифической активации лимфоцитов человека / **Т.В. Рябцева** // Новости медико-биологических наук. – 2009. – №3. – С.61–65.

3 Рябцева, Т.В. Оценка прооксидантной активности внутриклеточных ферментов нейтрофилов и лимфоцитов человека / **Т.В. Рябцева** // Новости медико-биологических наук. – 2010. – №1. – С.76–80.

4 Воронова, Н.В. Количественное содержание иммуноглобулинов, Т- и В-лимфоцитов у пациентов с ревматоидным артритом на фоне терапии цитостатическим препаратом Лейкладин / Н.В. Воронова, О.П. Сирош, **Т.В. Рябцева**, Т.М. Талако, Н.Ф. Сорока // Изв. НАН Беларуси. Сер. медицинских наук. – 2010. – №2. – С.73–77.

Материалы конференций

5 Рябцева Т.В. Метод определения прооксидантной активности плазмы крови / **Т.В. Рябцева**, А.Н. Капич, Т.В. Корнейчик // Ежегодник «Экологическая антропология» // Минск. – 2007. – С.224–227.

6 Рябцева, Т.В. Определение прооксидантной активности плазмы крови в норме и при патологии / **Т.В. Рябцева**, Т.В. Корнейчик, Д.А. Макаревич, А.Н. Капич // Молекулярная медицина и биохимическая фармакология: материалы респ. науч. конф., Гродно, 28-29 июня 2007г., редкол. В.У. Буко [и др.]. – Гродно 2007. – С.162–168.

7 Рябцева, Т.В. Контроль прооксидантной активности лимфоцитов в процессе их неспецифической активации / **Т.В. Рябцева**, Д.А. Макаревич, А.Н. Капич // Проблемы регуляции висцеральных функций: материалы междунар. науч. конф., Минск, 23-24 октября 2008г.: в 2 ч. / Институт физиологии НАН Беларуси; редкол.: В.С. Улащик [и др.]. – Минск РИВШ, 2008. – Ч.1. – С. 186–191.

8 Рябцева Т.В., Состояние про-и антиоксидантных систем у пациентов с ревматоидным артритом и системным склерозом в процессе терапии цитостатическим препаратом «Лейкладин» / **Т.В. Рябцева**, Н.В. Воронова, О.П. Сирош, Н.Ф. Сорока // Гродненской областной клинической больнице 60 лет. Через инновации к успеху: материалы междунар. науч.-практ. конф., Гродно, 15 октября 2009г., редкол. В.М. Пырочкин [и др.]– Гродно, 2009. – С.480–490.

9 Рябцева Т.В., Прооксидантная активность лимфоцитов и нейтрофилов периферической крови пациентов с ревматоидным артритом, системным склерозом и системной красной волчанкой / **Т.В. Рябцева** // Актуальные вопросы хирургии, анестезиологии и травматологии: клиника, диагностика и лечение. Новые направления в медицине: материалы междунар. науч.-практ. конф., Минск, 23 октября 2009г. 432 ордена Красной Звезды главный военный

клинический медицинский центр Вооруженных Сил Республики Беларусь – Минск. БГМУ, 2009. – С.101–110.

Тезисы конференций

10 Рябцева, Т.В. Активация перекисного окисления липидов в процессе фагоцитоза / **Т.В. Рябцева**, В.Ю. Гриневич, А.Н. Капич // Сахаровские чтения 2007 года: экологические проблемы 21 века: материалы 7-й междунар. науч. конф., Минск, 22-23 мая 2007г. – Минск 2008. – С.82.

11 Ryabzeva, T. The studying of lipid peroxidation activity during phagocytosis / **Ryabzeva T.**, Grinevich V., Kapich A. // Abstract book conference for young scientists, PhD students and students on molecular biology and genetics. – Kyiv, Ukraine. – 2007. – P.M42.

12 Рябцева, Т.В., Активация перекисного окисления липидов в фагоцитарном киллинге микроорганизмов / **Т.В. Рябцева**, А.Н. Капич // Ломоносов-2008: материалы XV междунар. конф. студ., асп. и молодых ученых, Москва, апрель 2008г. – МГУ – С. 24.

13 Вишневская, Ю.А.Дифференцированное исследование различных этапов фагоцитоза с помощью оксиграфической компьютерно-управляемой установки /Ю.А. Вишневская, **Т.В. Рябцева**, Т.В. Корнейчик, А.К. Лебедева, Н.С Свидунович // Сахаровские чтения 2008 года: экологические проблемы 21 века: материалы 8-й междунар. науч. конф., Минск, 22-23 мая 2008г. – Минск 2008. – С.49.

14 Рябцева, Т.В. Взаимосвязь перекисного окисления липидов с микробицидной активностью нейтрофилов / **Т.В. Рябцева** // Сахаровские чтения 2008 года: экологические проблемы 21 века: материалы 8-й междунар. науч. конф., Минск, 22-23 мая 2008г. – Минск 2008. – С.95.

15 Рябцева, Т.В. Участие процессов перекисного окисления липидов в неспецифической активации лимфоцитов человека / **Рябцева Т.В.**, Капич А.Н. // Биология – наука 21 века: сб. тезисов 12-й международной Пущинской школы-конференции молодых ученых, 10-14 ноября 2008г., Пущино, Россия. – Пущино 2008. – С. 185.

16 Рябцева, Т.В. Оценка способности лимфоцитов человека инициировать реакции перекисного окисления липидов в процессе их неспецифической активации / **Т.В. Рябцева** // Ломоносов-2009: материалы XVI междунар. конф. студ., асп. и молодых ученых, апрель 2009г., Москва – МГУ – С. 31.

17 **Рябцева, Т. В.** Накопление продуктов перекисного окисления в процессе фагоцитарной активности нейтрофилов периферической крови больных системной красной волчанкой и ревматоидным артритом / **Т.В. Рябцева**, Н.В. Воронова, Д.А. Макаревич // Материалы съезда (тезисы) ревматологов России. – Москва, Россия. – 2009. – С. 98.

18 Демченко, М.А. Разработка системы для оценки прооксидантной активности нейтрофилов и лимфоцитов in vitro / М.А. Демченко, **Т.В. Рябцева** // Сахаровские чтения 2009 года: экологические проблемы 21 века: материалы 9-й междунар. науч. конф., Минск, 22-23 мая 2008г. – Минск 2009. – С.71.

19 Рябцева, Т.В. Влияние цитостатического препарата «Лейкладин» на процессы ПОЛ у пациентов с ревматоидным артритом и системным склерозом

/ **Т.В. Рябцева**, Т.М. Талако, Н.В. Воронова, О.П. Сирош, Н.Ф. Сорока // тезисы докладов научно-практической конференции «Белорусские лекарства», Минск, Беларусь, - 2010. – С. 182-184.

Инструкции по применению

20 Инструкция по применению «Метод комплексной оценки гемо(не)совместимости полимерных материалов медицинского назначения» д.м.н., профессор Кирковский В.В., д.б.н., профессор Голубович В.П., Макаревич Д.А., к.м.н. доцент Введенский Д.В., **Рябцева Т.В.**, Седёлкина Е.Л. Утверждена МЗ РБ 18.12.2009, регистрационный номер №078-0709.

РЭЗЮМЭ

Рабцава Таццяна Уладзіміраўна

Прааксідантная актыўнасць плазмы крыві, лімфацытаў и нейтрафілаў ў норме и пры сістэмных захворваннях злучальнай тканіны

Ключавыя словы: прааксідантная актыўнасць, перакіснае акісленне ліпідаў, фагацітоз, нейтрафілы, лімфацыты, рэўматоідны артрыт, сістэмная чырвоная ваўчанка, сістэмны склероз.

Мэта даследавання: распрацаваць, стандартаваць і апрабаваць метад комплекснай біяхімічнай адзнакі прааксідантнай актыўнасці лімфацытаў, нейтрафілаў і плазмы.

Вынікі даследавання: распрацаваны спосаб, які дазваляе праводзіць адначасовую адзнаку клеткавых і малекулярных параметраў пры вывучэнні фагацытарнай актыўнасці нейтрафілаў і актывацыі лімфацытаў лектынамі. З дапамогай дадзенага метаду ўсталявана, што хуткасць паглынання кіслароду лімфацытамі пры іх актывацыі павялічваецца ў 5,8 разоў а хуткасць назапашвання прадуктаў ПАЛ павялічваецца ў 20 разоў пры актывацыі ФГА і ў 35 разоў пры актывацыі КонА у параўнанні з станам супакою. Даказана ўцягванне антіаксідантнай сістэмы крыві ў працэсы інгібіравання рэакцый ПАЛ пры фагацытозе. Распрацаваны таксама метад, які дазваляе праводзіць комплексную адзнаку прааксідантнай актыўнасці плазмы крыві, а таксама лімфацытаў і нейтрафілаў. З дапамогай дадзенага метаду ўпершыню паказана, што прааксідантная актыўнасць плазмы крыві перавышае прааксідантную актыўнасць нейтрафілаў і лімфацытаў у 3,8 і 1,8 разу адпаведна, а прааксідантная актыўнасць лімфацытаў перавышае прааксідантную актыўнасць нейтрафілаў больш за ў 2 разу. Адзнака антіаксідантна\ прааксідантнага балансу пацыентаў з сістэмнымі захворваннямі злучальнай тканіны паказала, што пры рэўматоідным артрыце сумарная прааксідантная актыўнасць роўная 0,69 (0,57;0,74), пры сістэмным склерозе - 0,34 (0,13;0,44), пры сістэмнай чырвонай ваўчанцы - 0,15 (0,12;0,14). Таксама паказана, што ўключэнне Лейкладзіна ў тэрапію пацыентаў з рэўматоідным артрытам і сістэмным склерозам прыводзіць да стымуляцыі актыўнасці каталазы лімфацытаў і нейтрафілаў і інгібіраванню праакісляльнай актыўнасці ў дадзеных тыпах клетак.

Вобласці выкарыстання: біяхімія, эксперыментальная і клінічная імуналогія, біятэхналогія, экалогія, вучэбна-педагагічны працэс найвышэйшых вучэбных устаноў медыцынскага, біялагічнага і хімічнага профілю.

РЕЗЮМЕ

Рябцева Татьяна Владимировна

Прооксидантная активность плазмы крови, лимфоцитов и нейтрофилов в норме и при системных заболеваниях соединительной ткани

Ключевые слова: прооксидантная активность, перекисное окисление липидов, фагоцитоз, нейтрофилы, лимфоциты, ревматоидный артрит, системная красная волчанка, системный склероз.

Цель работы: разработать, стандартизировать и апробировать метод комплексной биохимической оценки прооксидантной активности лимфоцитов, нейтрофилов и плазмы крови.

Результаты исследования: разработан способ, который позволяет проводить одновременную оценку клеточных и молекулярных параметров при изучении фагоцитарной активности нейтрофилов и активации мононуклеаров лектинами. С помощью данного способа установлено, что скорость поглощения кислорода мононуклеарами при их активации увеличивается в 5,8 раза, а скорость накопления продуктов ПОЛ увеличивается в 20 раз при активации ФГА и в 35 раз при активации КонА по сравнению с состоянием покоя. Доказано вовлечение антиоксидантной системы крови в процессы ингибирования реакций ПОЛ при фагоцитозе. Разработан метод, который позволяет проводить комплексную оценку прооксидантной активности плазмы крови, а также лимфоцитов и нейтрофилов. С помощью данного метода впервые показано, что прооксидантная активность плазмы крови превышает прооксидантную активность нейтрофилов и лимфоцитов в 3,8 и 1,8 раза соответственно, а прооксидантная активность лимфоцитов превышает прооксидантную активность нейтрофилов более чем в 2 раза. Оценка антиоксидантно\прооксидантного баланса пациентов с системными заболеваниями соединительной ткани показала, что при ревматоидном артрите суммарная прооксидантная активность равна 0,69 (0,57;0,74), при системном склерозе - 0,34 (0,13;0,44), при системной красной волчанке - 0,15 (0,12;0,14). Установлено, что цитостатическая терапия препаратом «Лейкладин» пациентов с ревматоидным артритом и системным склерозом, приводит к снижению концентрации продуктов перекисного окисления липидов в плазме крови и стимуляции активности каталазы лимфоцитов и нейтрофилов.

Области применения: биохимия, экспериментальная и клиническая иммунология, биотехнология, экология, учебно-педагогический процесс высших учебных заведений медицинского, биологического и химического профиля.

SUMMARY

Ryabzeva Tatyana Vladimirovna

The prooxidant activity of plasma, lymphocytes and neutrophils of donors and patients with system diseases

Key words: prooxidant activity, lipid peroxidation, phagocytosis, neutrophils, lymphocytes, rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus, system sclerosis.

Aim of the study: to develop, standardize and test the method of the complex biochemical estimation prooxidant activity of lymphocytes, neutrophils and plasma.

Results: it is developed the method which allows spending a simultaneous estimation of cellular and molecular parameters at studying phagocytosis and activation of mononuclears by lectins. By means of the given method it is established, that speed of absorption of oxygen by lymphocytes at their activation increases in 5,8 times, and speed of accumulation of products the lipid peroxidation increases in 20 times at activation PHA and in 35 times at activation ConA in comparison with a condition of rest. Involving antioxidant systems of blood in processes of inhibition of reactions the lipid peroxidation is proved at phagocytosis. The method which allows spending a complex estimation prooxidant activity of plasma of blood, and also lymphocytes and neutrophils is developed also. By means of the given method for the first time it is shown, that prooxidant activity of plasma of blood exceeds prooxidant activity neutrophils and lymphocytes in 3,8 and 1,8 times accordingly, and prooxidant activity lymphocytes exceeds prooxidant activity neutrophils more than in 2 times. The estimation antioxidant/prooxidant balance of patients with system diseases of a connecting fabric has shown, that at ревматоидном an arthritis total prooxidant activity is equal 0,69 (0,57; 0,74), at a system sclerosis - 0,34 (0,13; 0,44), at system red волчанке - 0,15 (0,12; 0,14). Also it is shown, that inclusion Leucladyne in therapy of patients with rheumatoid arthritis and system sclerosis leads to stimulation catalase activity of lymphocytes and neutrophils and to inhibition prooxidant activity.

Fields of application: biochemistry, experimental and clinical immunology, biotechnology, ecology, educational process of institutions of higher education of medical, biological and chemical type.

Подписано в печать 01.09.2011. Формат 60x84 1/16. Бумага офсетная. Гарнитура Roman.
Печать цифровая. Усл. печ. л. 1,3. Уч. изд. л. 1,4. Тираж 60 экз. Заказ № 1301
ИООО «Право и экономика» Лицензия № 02330/0494335 от 16.03.2009.
220072 Минск Сурганова 1, корп. 2. Тел. 284-18-66, 8 029 684 18 66.
Отпечатано на издательской системе XEROX в ИООО «Право и экономика».