

УДК 616-002.77+611.018.54: 615.275.3

Ю. М. ЧЕРНЯКОВА¹, Л. С. ПИНЧУК¹, А. И. ГРИЦУК²

**ИЗМЕНЕНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНЫХ СВОЙСТВ СЫВОРОТКИ КРОВИ,
МОДИФИЦИРОВАННОЙ ДОКСИЦИКЛИНОМ, КАК ОДИН ИЗ ФАКТОРОВ
ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ЕЮ ЛЕЧЕБНОГО ЭФФЕКТА ПРИ ОСТЕОАРТРИТАХ**

¹Институт механики металлополимерных систем им. В. А. Белого НАН Беларуси, Гомель.

²Гомельский государственный медицинский университет, Беларусь.

(Поступила в редакцию 19.11.2010)

Введение. В настоящее время наметилась тенденция интраартикулярного лечения суставов препаратами на основе сыворотки крови (СК) [1, 2]. Во многих случаях СК используют в сочетании с лекарственными средствами (ЛС) [3]. Лечение суставов СК, модифицированной ЛС в организме пациента, показало хорошие результаты [4, 5] и признано стандартным методом лечения остеоартрита (ОА) [6]. В патологически измененном суставе СК временно выполняет функции синовиальной жидкости (СЖ) и дополнительно – средства, инъецирующего ЛС в синовиальную среду сустава. Однако молекулярные механизмы связывания ЛС с белками СК и их высвобождения в полости сустава, ряд других физико- и биохимических аспектов действия комплекса «сыворотка–ЛС» нуждаются в дальнейшем изучении.

Для понимания механизмов лечебного действия интраартикулярных инъекций СК целесообразно оценить ее влияние на протекание свободнорадикальных реакций окисления в синовиальной среде сустава, контролируемых системой антиоксидантной защиты организма. Свободнорадикальное окисление – физиологически необходимый метаболический процесс, который происходит во всех тканях организма человека. Нарушение баланса между процессами перекисного окисления и системой антиоксидантной защиты является предпосылкой развития в организме любого патологического процесса [7]. К таковым отнесены заболевания суставов, в ходе течения которых изменяется биохимический состав СЖ [8]. Представляет интерес исследование окислительной активности СЖ, взятой из условно здоровых и пораженных ОА суставов, а также применяемых для лечения ОА препаратов на основе СК.

Для оценки антиоксидантной активности биологических сред часто применяют реакцию окисления адреналина: по скорости образования адrenoхрома при окислении адреналина в щелочной среде судят о подавлении свободнорадикального окисления химическими веществами и определяют их ингибирующую активность [9]. Экспериментально обнаружен продукт окисления адреналина, поглощающий свет при длине волны 347 нм [9, 10]. Образование этого продукта значительно опережает по времени образование адrenoхрома (поглощение при 480 нм). Антиоксиданты (супероксиддисмутаза, аскорбат, цистеин и др.) ингибируют образование этого соединения. Простота реализации метода и хорошая воспроизводимость результатов позволили применить реакцию окисления адреналина со спектрофотометрической регистрацией продукта окисления, имеющего поглощение при длине волны 347 нм (волновое число 2880), для измерения антиоксидантной активности слезной жидкости [11].

Цель исследования – сравнительная оценка окислительной способности СЖ, СК, а также лекарственного комплекса «СК–доксидиклин» с помощью метода окисления адреналина.

Объекты и методы исследования. Объектами исследования служили следующие жидкости:

1) условно здоровая СЖ (взята при артротомии коленного сустава, не имеющего признаков ОА и синовита);

- 2) СЖ при гемосиновите;
- 3) СЖ при обострении ОА;
- 4) свежая СК;
- 5) СК после 6 мес. хранения в ампуле при $T = -25\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- 6) СК после приема пациентом 100 мг доксициклина;
- 7) СК после приема пациентом 200 мг доксициклина.

СК получали следующим образом. У соматически здорового пациента натошак шприцем забирали из локтевой вены 30 мл крови. Шприц устанавливали вертикально и выдерживали при температуре 18–22 °С в течение 5–6 ч. После расслоения крови отбирали сыворотку, образовавшуюся над фибриновым сгустком.

Модифицирование СК осуществляли в соответствии с инструкцией [6]. Через 2 ч после приема пациентом доксициклина в дозе 100 или 200 мг осуществляли забор крови и фракционировали ее описанным выше способом.

Активность исследуемых жидкостей в реакциях окисления адреналина изучали следующим образом. Карбонатный буферный раствор в концентрации 0,2 М готовили на бидистиллированной воде из Na_2CO_3 (Sigma, США). Значение pH буфера на уровне 10,65 устанавливали путем добавления к раствору сухого NaHCO_3 (компания J. T. Baker, Голландия). В кювету с 2 мл буферного раствора добавляли 100 мкл 0,1%-ного аптечного раствора адреналина гидрохлорида и быстро перемешивали. Кювету помещали в спектрофотометр СФ-46 (ЛОМО) и с интервалом 5 с в течение 2 мин измеряли величину оптической плотности D при длине световой волны 347 нм. Затем к 2 мл карбонатного буфера добавляли 10 мкл исследуемой жидкости и 100 мкл 0,1%-ного аптечного раствора адреналина гидрохлорида. Нарастание оптической плотности регистрировали в течение 2 мин.

Результаты и их обсуждение. Кинетические зависимости окисления адреналина исследуемыми жидкостями приведены на рис. 1. Как видно из рисунка, все жидкости являются активными окислителями.

Минимально, но сильнее, чем буферный раствор (рис. 1, кривая 8), окисляет адреналин СЖ, взятая из условно здоровых и гемосиновитных суставов. Это связано с тем, что в норме СЖ представляет собой упорядоченную структурно равновесную систему с небольшой физико-химической активностью (рис. 1, кривая 1), достаточной для компенсации случайных биохимических нарушений синовиальной среды, имеющих место в здоровом суставе. СЖ из сустава с гемосиновитом

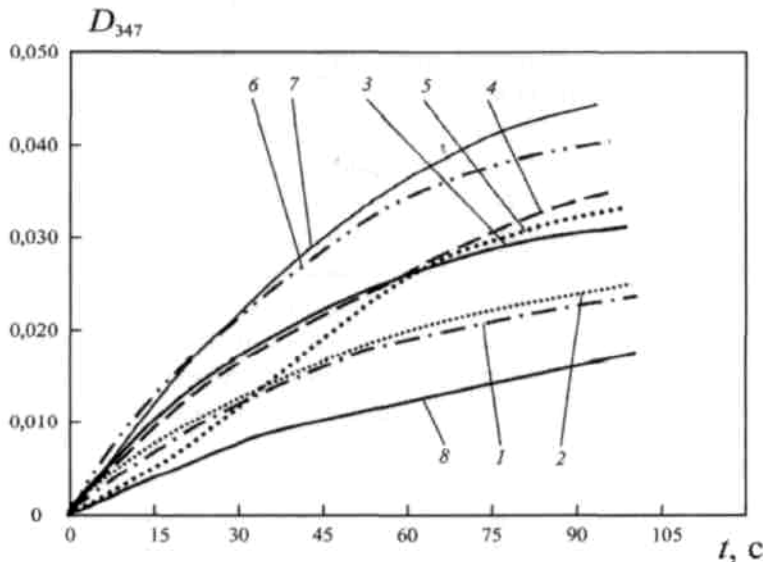


Рис. 1. Изменение оптической плотности D при длине световой волны 347 нм смесей адреналина и исследуемых жидкостей в зависимости от времени (t) с момента их смешения: 1 – условно здоровая синовиальная жидкость (СЖ); 2 – СЖ при гемосиновите; 3 – СЖ при обострении ОА; 4 – свежая сыворотка крови (СК); 5 – СК после 6 мес. хранения; 6, 7 – СК после приема пациентом 100 и 200 мг доксициклина соответственно; 8 – буферный раствор

содержит продукты разрушения и окисления гемоглобина эритроцитов в виде ионов Fe^{3+} . Ее смешивание с адреналином (рис. 1, кривая 2) приводит к более быстрому нарастанию поглощения в области 347 нм благодаря окислению адреналина с восстановлением в растворе ионов Fe^{3+} до Fe^{2+} .

Образцы 3, 4 и 5 обладают большей способностью к окислению адреналина с образованием регистрируемого спектрофотометрически продукта его окисления. Это вызвано тем, что молекулы белков СК здорового человека и СЖ при обострении ОА имеют большое количество активных групп, физико-химические взаимодействия которых необходимы для поддержания оптимального метаболизма в тканях сустава.

Наиболее сильно окисляют адреналин образцы СК здорового человека, модифицированные доксициклином (рис. 1, кривые 6, 7). Образец СК, максимально насыщенный ЛС, является самым сильным окислителем. Зависимость интенсивности окисления от концентрации доксициклина в СК позволяет связать окислительную способность образцов 6 и 7 с наличием в них этого ЛС.

Регистрируемый продукт окисления адреналина не является адrenoхромом, который может образоваться только при свободнорадикальном окислении адреналина активными формами кислорода [12]. Окисление адреналина СК, модифицированной доксициклином в организме пациента, осуществляется по другим механизмам.

Терапевтическая эффективность тетрациклинов при ОА определяется способностью этих препаратов ингибировать матричные металлопротеиназы. Эти специфические цинкозависимые ферменты (коллагеназы, желатиназы, стромелизины и др.) играют важную роль в деградации макромолекул внеклеточного матрикса соединительной ткани. Доксициклин подавляет выработку провоспалительных цитокинов, в частности ИЛ-1 β , аналогично кортикостероидам [13]. По-видимому, это вызвано высокой реакционной способностью доксициклина, молекула которого содержит много активных гидроксильных кетогрупп, сопряженных с углеводородными циклами (рис. 2) [14].

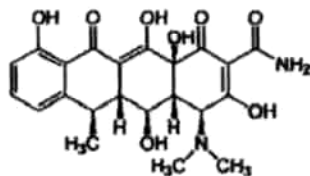


Рис. 2. Схема молекулы доксициклина

Можно предположить, что связывание доксициклина с биохимически нейтральными белками крови в организме пациента происходит путем образования водородных связей между молекулами белков (преимущественно альбумина) и гидроксильными группами доксициклина. В этом взаимодействии атом водорода играет роль мостика, соединяющего молекулы альбумина и доксициклина. Транспортный комплекс не разрушается во время процедур взятия крови, ее фазового расслоения и инъекции сыворотки в сустав. Однако *in vivo* связь тетрациклинов с белками оказывается обратимой и непрочной – межмолекулярные водородные связи легко рвутся в синовиальной среде сустава [15]. Освобождающиеся молекулы доксициклина вступают в свободнорадикальные реакции с активными группами патологически измененных тканей сустава. Доксициклин подавляет воспаление в суставах, блокируя активные группы провоспалительных белковых молекул вне клеток, а также синтез провоспалительных агентов внутри клеток воспаленных тканей [13].

Таким образом, модифицированная СК нормализует при ОА метаболическую и трибологическую функции СЖ, а доксициклин, высвобождающийся из комплексов с белками СК, обеспечивает в полости сустава противомикробный и противовоспалительный эффекты. Кроме того, сыворотка служит питательным субстратом для хряща благодаря высокой концентрации в ней протеинов, дополнительно выполняющих разнообразные регуляторные функции.

Заключение. Впервые экспериментально в реакциях с адреналином изучена окислительная способность синовиальной жидкости, взятой из условно здоровых и патологически измененных

суставов, а также сыворотки крови и лечебных инъекционных препаратов на ее основе, содержащих доксициклин. Установлено, что синовиальная жидкость, взятая из условно здорового сустава, минимально окисляет адреналин. Более сильным окислителем является сыворотка крови, модифицированная доксициклином. Лечебный эффект интраартикулярных инъекций такой сыворотки при остеоартритах может быть объяснен пролонгированным действием доксициклина, молекулы которого высвобождаются в полости сустава при разрушении водородных связей с белками сыворотки. Гидроксильные группы доксициклина связываются с активными группами провоспалительных белковых молекул, блокируя их в патологически измененных тканях сустава.

Литература

1. Filardo G., Kon E., Della Villa S. et al. // Intern. Orthop. 2010. Vol. 34, N 6. P. 909–915.
2. Чернякова Ю. М., Пинчук Л. С. // Вестн. травматологии и ортопедии им. Н. Н. Приорова. 2008. № 2. С. 53–56.
3. Белоенко Е. Д., Чернякова Ю. М., Пинчук Л. С. // Докл. НАН Беларуси. 2007. Т. 51, № 2. С. 72–75.
4. Чернякова Ю. М., Пинчук Л. С. // Здоровоохранение. 2009. № 7. С. 17–20.
5. Чернякова Ю. М., Пинчук Л. С. // Вестн. травматологии и ортопедии им. Н. Н. Приорова. 2010. № 2. С. 25–30.
6. Метод интраартикулярной хондропротекции суставов аутосывороткой крови, модифицированной доксициклином: инструкция № 058-0609, утв. Минздравом РБ 06.05.2010 / С. И. Болтрукевич, Ю. М. Чернякова, Д. Б. Карев, Л. С. Пинчук.
7. Winterbourn C. C. // Clin. Exp. Pharm. Physiol. 1995. Vol. 22, N 11. P. 877–880.
8. Павлова В. Н. Синовиальная среда суставов. М., 1980.
9. Сирота Т. В. // Вопр. мед. химии. 1999. № 3. С. 263–272.
10. Способ определения антиоксидантной активности супероксиддисмутазы и химических соединений: пат. РФ 2144674 / Т. В. Сирота. Оpubл. 20.01.2000.
11. Грицук А. И., Сирота Т. В., Дравица Л. В., Креддок Е. А. // Биомед. химия. 2006. Т. 52. Вып. 6. С. 601–607.
12. Фридович И. Свободные радикалы в биологии / Пер. с англ. М., 1979. Т. 1. С. 272–308.
13. Campbell S. M., Wernick R. // Ann. Intern. Med. 1999, Vol. 130, N 2. P. 135–142.
14. Егоров Н. С. Основы учения об антибиотиках: учебник. 6-е изд. М., 2004.
15. Эллиот В., Эллиот Д. Биохимия и молекулярная биология. М., 2002.

Yu. M. CHERNIAKOVA¹, L. S. PINCHUK¹, A. I. GRITSUK²

CHANGE IN THE OXIDATION PROPERTIES OF DOXYCYCLINE-MODIFIED BLOOD SERUM AS ONE OF THE MEANS OF THE THERAUPITIC MANIFESTATION AT OSTEOARTHRITIS

¹V. A. Belyi Metal-Polymer Research Institute, Gomel, Belarus.

²Gomel State Medical University, Belarus

Summary

One possible mechanism of anti-rheumatic actions of Doxycycline-modified blood serum was studied using experimental model of the adrenaline hydrochloride oxidation. It was concluded that this mechanism is being realizing by blocking of molecules active groups in pathologically changed joint tissues by free-radicals reactions.