

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СОБСТВЕННОЙ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ И ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ СЫВОРОТКИ КРОВИ И СИНОВИАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ ПРИ АРТРИТАХ

ИВАНОВА С.В.

*УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов  
медицинский университет»*

**Резюме.** Исследование сыворотки крови и синовиальной жидкости больных ревматоидным (РА), реактивным (РеА) и псориатическим (ПА) артритами показало, что интенсивность собственной флуоресценции сыворотки крови выше, чем у синовиальной жидкости при использованных условиях возбуждения. Интенсивность флуоресценции обеих биологических жидкостей в ультрафиолетовой области изменялась аналогично: была достоверно выше в группах больных РА и РеА и ниже – в группе больных ПА.

Общая протеолитическая активность (ОПА) и содержание основных ингибиторов в сыворотке крови было значительно выше, чем в синовиальной жидкости. Наибольшие значения ОПА как в синовиальной жидкости, так и в сыворотке крови наблюдались у больных РА и РеА.

Изменения в содержании  $\alpha$ -1-протеиназного ингибитора (АПИ) в синовиальной жидкости были противоположны изменениям в сыворотке крови при данных заболеваниях. Анализ соотношения синовиальная жидкость/сыворотка крови показал, что наибольшее проникновение АПИ в суставной выпот наблюдалось в группе больных ПА, а  $\alpha$ -2-МГ – в группе РА.

**Ключевые слова:** флуоресценция, протеолитическая активность, сыворотка крови, синовиальная жидкость.

**Abstract.** The research of blood serum and synovial fluid of patients with rheumatoid (RA), reactive (ReA) and psoriatic (PA) arthritides has shown, that the intensity of fluorescence peculiar to blood serum is higher than that of synovial fluid under the used conditions of excitation.

The intensity of fluorescence of both biological fluids in ultra-violet area changed similarly: it was reliably higher in the groups of patients with RA and ReA and lower – in the group of patients with PA. The general proteolytic activity (GPA) and the content of the basic inhibitors in blood serum were considerably higher than those in synovial fluid.

The greatest values of GPA both in synovial fluid and in blood serum were observed in patients with RA and ReA. Changes in the content of  $\alpha$ -1-proteolytic inhibitor (API) in synovial fluid were opposite to changes in blood serum in the given diseases.

The analysis of synovial fluid/blood serum correlation has shown, that the greatest penetration of API into the articular exudate was observed in the group of patients with PA and that of  $\alpha$ -2-macroglobulin – in the group with RA.

**Адрес для корреспонденции:** Республика Беларусь, 210041, г. Витебск, ул. Чкалова, д. 41, кор. 2, кв. 9, моб. +375 297-124-124-Иванова С.В.

Заболевания суставов, как и любые патологические состояния, сопровождаются изменениями на молекулярном уровне. Меняется количество или химическая структура белков, входящих в состав плазмы, сыворотки крови и других биологических жидкостей организма.

Сыворотка крови и синовиальная жидкость представляют собой смесь белковых молекул, имеющих различный состав (триптофановые и тирозиновые аминокислотные остатки) и обладающих характерным спектром флуоресценции [1, 2]. Чувствительность основных параметров спектров флуоресценции белков к таким характеристикам, как подвижность, полярность и гетерогенность состава ближайшего микроокружения хромофоров позволяет судить о разнообразных изменениях структурного состояния белков [2-4].

Определение спектрально-флуоресцентных характеристик синовиальной жидкости было использовано для исследования таких заболеваний суставов, как синовиты различного генеза, деформирующий остеоартроз и ревматоидный артрит [5-7]. Для изучения сыворотки крови при многих заболеваниях эффективно применялся метод флуоресцентных зондов [8-10]. Однако недостаточно изучены параметры собственной флуоресценции сыворотки крови при заболеваниях суставов.

Развитие воспалительных заболеваний суставов приводит к появлению протеиназ-ингибиторного дисбаланса с активацией протеолиза и угнетением его естественных ингибиторов [11-14].

Было установлено, что при артритах изменяется не только концентрация протеолитических ферментов и ингибиторов, но и их соотношение в синовиальной жидкости и сыворотке крови [13-16]. В норме уровень  $\alpha$ -2-макроглобулина ( $\alpha$ -2-МГ) в синовиальной жидкости составляет менее 5% (соотношение синовиальная жидкость/кровь – 0,03-0,04), а уровень  $\alpha$ -1-протеиназного ингибитора (АПИ) – 20-25% сывороточного (соотношение синовиальная жидкость/кровь – 0,2-0,25) [17].

Анализ соотношения синовиальная жидкость/кровь при артритах показал, что данный показатель возрастал при ревматоидном артрите до 0,7 для АПИ и до 0,36-0,45 для  $\alpha$ -2-МГ [14] и был весьма информативен при заболеваниях суставов. Проникновение ингибиторов в суставной выпот зависело от их молекулярной массы, вследствие чего высокомолекулярного  $\alpha$ -2-МГ было значительно меньше, чем АПИ [18].

В исследовании [15] также было установлено, что уровень  $\alpha$ -2-МГ в сыворотке крови больных ревматоидным артритом был выше, чем в синовиальной жидкости, а соотношение синовиальная жидкость/кровь (0,6) было значительно выше нормального.

Целью данного исследования было проведение сравнительного анализа параметров флуоресценции, протеолитической активности и соотношения

содержания основных ингибиторов в сыворотке крови и синовиальной жидкости (СЖ/СК) при ревматоидном, реактивном и псориатическом артрите.

### Методы

Для проведения флуоресцентного анализа и определения протеолитической активности была исследована сыворотка крови 50 человек: 22 – больных ревматоидным артритом (РА), 15 – больных реактивным артритом (РеА) и 13 – больных псориатическим артритом (ПА). Образцы синовиальной жидкости были взяты у 29 человек: 11 – больных РА, 10 – РеА и 8 – ПА. Контрольную группу (КГ) для исследования сыворотки крови составили 46 доноров в возрасте 30-50 лет.

Регистрация спектров флуоресценции сыворотки крови проводилась непосредственно после ее разведения в 20 раз 0,89% раствором NaCl на спектрофлуориметре CM-2203 (SOLAR, Беларусь) при длине волны возбуждения 286 нм в диапазоне 300–500 нм с использованием кварцевой кюветы размером 1,2x1,2 см.

Для исследования синовиальной жидкости ее предварительно разводили в 10 раз 0,89%-ным раствором NaCl и центрифугировали в течение 15 минут при 1500 об/мин. Надосадочную жидкость отбирали и обозначали как бесклеточный экстракт синовиальной жидкости. Регистрацию спектров флуоресценции полученных образцов проводили при длине волны возбуждения  $\lambda_{\text{в}}=350$  нм в диапазоне 400-600 нм и при длине волны  $\lambda_{\text{в}}=286$  нм в диапазоне 300–500 нм.

Спектры флуоресценции всех образцов сыворотки крови и синовиальной жидкости были откорректированы по спектральной квантовой чувствительности соответственно техническим характеристикам прибора. Интенсивность флуоресценции (I) выражали в относительных единицах (отн. ед.) [4].

Определение протеолитической активности в сыворотке крови и синовиальной жидкости проводили, взяв за основу метод Erlander B. F. et al. [19] с использованием в качестве субстрата высокостабильного в растворе низкомолекулярного хромогенного соединения – N- $\alpha$ -бензоил-D,L-аргинин паранитроанилид (БАПНА). Основой для определения активности ингибиторов служил метод, предложенный Т.А. Хватовым и В.Б. Беловой [20].

Статистическую обработку результатов экспериментов проводили с помощью пакета прикладных программ «Statistica 6.0».

Для проверки нормальности распределения количественных показателей использовались критерии Колмогорова-Смирнова, Лиллиефорса и Шапиро-Уилка.

Выявление достоверных различий проводилось с использованием методов Краскела-Уоллиса и Манна-Уитни для несвязанных выборок. Корреляционные связи анализировались с помощью ранговой корреляции Спирмена. Критическое значение уровня значимости принималось с учетом поправки Бонферони [21-23].

## Результаты

Интенсивность флуоресценции сыворотки крови в ультрафиолетовой области  $I_{333}$  измерялась в максимуме эмиссии при длине волны 333 нм.

Для синовиальной жидкости регистрация спектров проводилась при двух различных волнах возбуждения, и положение максимума спектра флуоресценции зависело от длины волны возбуждающего света.

Поэтому интенсивность флуоресценции синовиальной жидкости измерялась при 335 нм,  $I_{335}$  (возбуждение светом в ультрафиолетовой области  $\lambda_{в.}=286$  нм) и при 438-445 нм,  $I_{438-445}$  (возбуждение светом в видимой области  $\lambda_{в.}=350$  нм). Результаты измерений данных показателей для больных артритами представлены в таблице 1.

Таблица 1 - Интенсивность флуоресценции сыворотки крови и синовиальной жидкости при артритах.

| Диагноз | Интенсивность флуоресценции    |                                    |                                |
|---------|--------------------------------|------------------------------------|--------------------------------|
|         | Синовиальной жидкости          |                                    | Сыворотки крови                |
|         | $I_{335}, \lambda_{в.}=286$ нм | $I_{438-445}, \lambda_{в.}=350$ нм | $I_{333}, \lambda_{в.}=286$ нм |
| РА      | $2,00 \pm 0,24$                | $0,40 \pm 0,03$                    | $3,51 \pm 0,23^{1,2}$          |
| РеА     | $1,55 \pm 0,17$                | $0,44 \pm 0,03$                    | $4,04 \pm 0,45^{1,2}$          |
| ПА      | $0,96 \pm 0,19$                | $0,59 \pm 0,06$                    | $2,68 \pm 0,33^{1,2}$          |

Примечание. Достоверность различий по сравнению: <sup>1</sup> – с  $I_{335}$ ; <sup>2</sup> – с  $I_{438-445}$ , ( $p < 0,01$ )

Сравнительный анализ собственной флуоресценции сыворотки крови и синовиальной жидкости выявил следующие закономерности. Наибольшие значения интенсивности флуоресценции в ультрафиолетовой области ( $\lambda_{в.}=286$  нм) наблюдались в сыворотке крови.

Показатель  $I_{333}$  был достоверно выше, чем показатель  $I_{335}$ : на 76% (в 1,76 раза) – в группе больных РА ( $p=0,01$ ), на 160% (в 2,6 раза) – в группе больных РеА ( $p=0,002$ ) и на 179% (в 2,79 раза) – в группе ПА ( $p=0,002$ ). Интенсивность флуоресценции сыворотки крови  $I_{333}$  ( $\lambda_{в.}=286$  нм) также была выше интенсивности флуоресценции синовиальной жидкости в видимой области  $I_{438-445}$  ( $\lambda_{в.}=350$  нм): в 8,8 раза – в группе больных РА ( $p=2 \cdot 10^{-5}$ ), в 9,2 раза – в группе РеА ( $p=10^{-5}$ ) и в 4,5 раза – в группе ПА ( $p=10^{-4}$ ).

В ультрафиолетовой области ( $\lambda_{в.}=286$  нм) изменения интенсивности флуоресценции сыворотки крови и синовиальной жидкости в зависимости от диагноза (РА-РеА-ПА) носили схожий характер: имели наибольшие значения в группах больных РА и РеА и наименьшие – в группе больных ПА, коэффициент корреляции между  $I_{335}$  и  $I_{333}$   $r=0,5$  ( $p=0,05$ ).

Увеличение интенсивности флуоресценции данных биологических жидкостей может быть вызвано усилением процесса распада белков и накоплением низко- и среднемолекулярных органических веществ, поступающих в кровь и синовиальную жидкость при данных заболеваниях, особенно при РА и РеА.

Результаты сравнения протеолитической и ингибиторной активности в сыворотке крови и синовиальной жидкости представлены в таблице 2.

Таблица 2 - Протеолитическая и ингибиторная активность сыворотки крови и синовиальной жидкости и отношение «синовиальная жидкость/сыворотка крови» (СЖ/СК) для основных ингибиторов АПИ и  $\alpha$ -2-МГ.

| Диагноз | СЖ/СК |      | АПИ, г/л         |                 | $\alpha$ -2-МГ, г/л |                 | ОПА, ммоль/(л·с)  |                 |
|---------|-------|------|------------------|-----------------|---------------------|-----------------|-------------------|-----------------|
|         | АПИ   | МГ   | СК               | СЖ              | СК                  | СЖ              | СК                | СЖ              |
| РА      | 0,19  | 0,50 | 1,48 $\pm$ 0,11* | 0,28 $\pm$ 0,06 | 1,06 $\pm$ 0,13*    | 0,53 $\pm$ 0,05 | 33,95 $\pm$ 3,11* | 5,77 $\pm$ 2,55 |
| РеА     | 0,65  | 0,31 | 1,04 $\pm$ 0,15* | 0,68 $\pm$ 0,12 | 1,72 $\pm$ 0,16*    | 0,54 $\pm$ 0,04 | 26,94 $\pm$ 2,73* | 5,60 $\pm$ 1,12 |
| ПА      | 1,05  | 0,37 | 0,89 $\pm$ 0,16  | 0,93 $\pm$ 0,50 | 1,40 $\pm$ 0,40*    | 0,52 $\pm$ 0,18 | 23,58 $\pm$ 4,07* | 1,42 $\pm$ 0,85 |

Примечание: \* – достоверность различий по сравнению с синовиальной жидкостью ( $p < 0,05$ )

Было установлено, что общая протеолитическая активность (ОПА) в сыворотке крови значительно выше, чем в синовиальной жидкости. В группе больных РА протеолитическая активность в сыворотке была на 488% (в 5,88 раза) выше, чем в синовиальной жидкости, в группе больных РеА – на 381% (в 4,8 раза), а в группе больных ПА – на 1560% (в 16,6 раза).

Уровень АПИ в сыворотке крови был также достоверно выше на 430% (в 5,3 раза;  $p = 1,8 \cdot 10^{-5}$ ), чем в синовиальной жидкости в группе больных РА и на 53% – в группе больных РеА и практически не различался в группе больных ПА. Кроме того, изменения в содержании АПИ в синовиальной жидкости были противоположны изменениям в сыворотке крови: в зависимости от диагноза (РА-РеА-ПА) содержание АПИ в сыворотке уменьшалось, а в синовиальной жидкости – увеличивалось.

Данная связь подтверждалась обратной, сильной и значимой корреляцией  $r = -0,9$  ( $p = 0,01$ ). Следовательно, наибольшее проникновение низкомолекулярного АПИ в суставной выпот наблюдалось в группе больных ПА. Этот вывод подтверждался и анализом такого важного при артритах показателя, как соотношение между содержанием основных ингибиторов протеолитических ферментов в синовиальной жидкости и сыворотке крови (СЖ/СК). Отношение СЖ/СК для АПИ было наиболее высоким в группе больных ПА, а самое низкое – в группе больных РА.

Содержание  $\alpha$ -2-МГ так же, как и АПИ, в сыворотке крови больных артритами было достоверно выше, чем в синовиальной жидкости: в группе больных РА – на 100% (в 2 раза;  $p = 2,3 \cdot 10^{-4}$ ), в группе больных РеА – на 219% (в 3,19 раза;  $p = 7,1 \cdot 10^{-4}$ ) и в группе больных ПА – на 169% (в 2,69 раза;  $p = 0,05$ ). Изменения в содержании  $\alpha$ -2-МГ в сыворотке и синовиальной жидкости при данных заболеваниях не имели достоверной корреляционной связи, как это наблюдалось для АПИ.

Несмотря на то, что уровень  $\alpha$ -2-МГ в сыворотке изменялся при РА и РеА, в синовиальной жидкости он оставался неизменным. Вероятно,  $\alpha$ -2-МГ, вследствие своей более высокой молекулярной массы, менее лабилен, чем АПИ и не способен проникать в суставной выпот из сыворотки крови в соизмеримом с АПИ количестве.

Отношение СЖ/СК для  $\alpha$ -2-МГ, в отличие от АПИ, при ревматоидном артрите было выше, чем в группах больных РеА и ПА, что свидетельствует о

наилучшем проникновении  $\alpha$ -2-МГ в синовиальный выпот в группе больных РА по сравнению с группами больных РеА и ПА.

Процесс проникновения основных ингибиторов из сыворотки крови в синовиальный выпот согласуется с литературными данными [14, 15], также как и результаты расчетов отношения СЖ/СК для основных ингибиторов АПИ и  $\alpha$ -2-МГ.

### Заключение

Исходя из проведенных экспериментов, можно сделать следующие выводы. Интенсивность собственной флуоресценции сыворотки крови выше, чем синовиальной жидкости как в ультрафиолетовой, так и в видимой областях. В ультрафиолетовой области ( $\lambda_{\text{в}}=286$  нм) изменения интенсивности флуоресценции сыворотки крови и синовиальной жидкости в зависимости от диагноза были аналогичны: имели достоверно наибольшие значения в группах больных РА и РеА и наименьшие – в группе больных ПА.

Общая протеолитическая активность и содержание основных ингибиторов в сыворотке крови было значительно выше, чем в синовиальной жидкости. Кроме того, ОПА как в сыворотке, так и в синовиальной жидкости повышалась у больных РА и РеА.

Изменения в содержании АПИ в синовиальной жидкости были противоположны изменениям в сыворотке крови при данных заболеваниях. Изменения в содержании  $\alpha$ -2-МГ в сыворотке и синовиальной жидкости не имели достоверной корреляционной связи.

Анализ соотношения СЖ/СК при данных заболеваниях показал, что наибольшее проникновение низкомолекулярного АПИ в суставной выпот наблюдалось в группе больных ПА, а  $\alpha$ -2-МГ – в группе больных РА. Следовательно, выявленные изменения параметров собственной флуоресценции и протеолитической активности сыворотки крови и синовиальной жидкости достаточно информативны и могут быть использованы при диагностике таких заболеваний, как ревматоидный, реактивный и псориатический артриты.

### Литература

1. Конев, С. В. Электронно-возбужденные состояния биополимеров / С. В. Конев. – Минск: Наука и техника, 1965. – 177 с.
2. Черницкий, Е. А. Люминесценция и структурная лабильность белков в растворе и клетке / Е. А. Черницкий. – Минск.: Наука и техника, 1972. – 278 с.
3. Дюбко, Т. С. О некоторых аспектах применения флуоресцентного анализа в криобиологии. 1. Собственная флуоресценция белков / Т. С. Дюбко // Вестник Харьков. нац. ун-та. Сер. Биология. – 2006. – Вып. 3. – С. 221-231.
4. Лакович, Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии / Дж. Лакович. – М.: Мир, 1986. – 496 с.
5. Козлова, Н. М. Исследование синовиальной жидкости с помощью флуоресцентных зондов / Н. М. Козлова, А. Г. Кутько // IV съезд фотобиологов России: мат. IV съезда фотобиологов России, Саратов, 26-30 сент. 2005 г. / Российское общество фотобиологов, Саратов. гос. ун-т; редкол.: В. В. Тучин [и др.]. – Саратов, 2005. – С. 37-38.

6. Слобожанина, Е. И. Спектрально-флуоресцентное исследование синовиального выпота в диагностике хронических заболеваний суставов / Е. И. Слобожанина, Е. Д. Белоенко // Ревматология. – 1990. – № 1. – С. 32-34.
7. Слобожанина, Е. И. Использование флуоресцентных зондов в исследовании компонентов синовиальной жидкости при патологии суставов / Е. И. Слобожанина, Е. Д. Белоенко // Вес. нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2006. – № 4. – С. 10-14.
8. Грызунов, Ю. А. Альбумин сыворотки крови в клинической медицине / Ю. А. Грызунов; под ред. Ю. А. Грызунова, Г. Е. Добрецова. – Москва: ГЭОТАР, 1998. – 440 с.
9. Грызунов, Ю. А. Конформационные изменения связывающих центров альбумина как новая универсальная реакция на патологический процесс. Исследование флуоресцентным методом / Ю. А. Грызунов, Г. Е. Добрецов // IV съезд фотобиологов России: мат. IV съезда фотобиологов России, Саратов, 26-30 сент. 2005 г. / Российское общество фотобиологов, Саратов. гос. ун-т; редкол.: В. В. Тучин [и др.]. – Саратов, 2005. – С. 37-38.
10. Грызунов, Ю. А. Связывающая способность альбумина и липиды сыворотки крови при развитии острого инфаркта миокарда / Ю. А. Грызунов, А. Б. Пестова // Клин. лаб. диагностика. – 1994. – № 5. – С. 23-25.
11. Веремеенко, К. Н. Протеолиз в норме и при патологии / К. Н. Веремеенко, О. П. Голобородько, А. И. Кизим. – Киев: Здоровье, 1988. – 200 с.
12. Корякина, Е. В. Особенности патогенетических механизмов эндогенной интоксикации у больных ревматоидным артритом / Е. В. Корякина, С. В. Белова // Научно-практическая ревматология. – 2001. – № 1. – С. 1-7.
13. Руденко, В. Г. Протеолитические ферменты и их ингибиторы при артритах / В. Г. Руденко, Ю. В. Руденко // Ревматология. – 1990. – № 3. – С. 32-38.
14. Руденко, В. Г. Протеолитические ферменты и их ингибиторы при артритах / В. Г. Руденко, Ю. В. Руденко // Ревматология. – 1990. – № 4. – С. 42-50.
15. Коларов, З.  $\alpha$ -2-макроглобулин в сыворотке крови и синовиальной жидкости больных ревматоидным артритом и остеоартрозом / З. Коларов, Р. Стоилов // Терапевтический архив. – 2000. – № 5. – С. 17-19.
16. Goilin-Charmet, A. Alpha 2-macroglobulin, the main serum antiprotease, binds beta 2-macroglobulin, the light chain of the class I major histocompatibility complex, which is involved in human disease / A. Goilin-Charmet, D. Launier // J. Clin. Sci. (Lond.). – 2000. – Vol. 98. – P. 427-433.
17. Павлова, В. Н. / В. Н. Павлова, Т. Н. Копьева, Л. И. Слущкий. – М.: Медицина, 1988. – 250 с.
18. Swedlund, H. A. Alpha-1-antitrypsin in serum and synovial fluid in rheumatoid arthritis / H. A. Swedlund, G. G. Hunder // Ann. Rheum. Dis. – 1974. – Vol. 33. – №2. – P. 162-164.

19. Erlanger, D. F. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin / D. F. Erlanger, N. Kokowsky // Arch. Biochem. Biophys. – 1961. – Vol. 95. – № 2. – P. 271-278.

20. Хватов, В. Б. Ускоренный метод определения основных ингибиторов протеиназ в плазме крови человека: метод. рекомендации / В. Б. Хватов, Т. А. Белова / МЗ РСФСР. – М., 1981. – 16 с.

21. Авива, Петри. Наглядная медицинская статистика: пер. с англ. / Петри Авива, Кэролайн Сэбин; под ред. В. П. Леонова. – 2-е изд. – Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 168 с.

22. Гельман, В. Я. Медицинская информатика: практикум / В. Я. Гельман. – Спб.: Питер, 2001. – 480 с.

23. Реброва, О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ Statistica / О. Ю. Реброва. – М.: МедиаСфера, 2003. – 312 с.