УДК 616.5-036.12-031.14-07:616.153.96

ОКИСЛИТЕЛЬНАЯ МОДИФИКАЦИЯ АЛЬБУМИНА СЫВОРОТКИ КРОВИ БОЛЬНЫХ ВУЛЬГАРНЫМ ПСОРИАЗОМ ПО РЕЗУЛЬТАТАМ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ ЛЕЧЕНИЯ

Копытова Т.В., Коткова Е.В.

НГФ ФГБУ «Государственный научный центр дерматовенерологии и косметологии» Минздрава России, Нижний Новгород, e-mail: ekotkova@mail.ru

Изучено влияние различных видов терапии псориаза на интенсивность окислительной модификации альбумина в сыворотке крови. В сыворотке крови больных определяли степень спонтанной и металлкатализируемой окислительной модификации альбумина по уровню карбонильных производных на основе метода Е.Е. Дубининой. Исследование показало, что у больных псориазом, не получавших лечения, окислительная модификация альбумина выражается преимущественным образованием кетонов нейтрального характера как при спонтанном, так и металлкатализируемом окислении. Применяемые в настоящее время методы терапии псориаза приводили к нормализации уровня кетонов нейтрального характера только при металлкатализируемой окислительной модификации. При спонтанной ОМА изменения в показателях остаются на том же уровне, что и у не леченных больных. Подобный эффект может быть связан с особенностями механизма окисления.

Ключевые слова: окислительная модификация альбумина, псориаз, метотрексат, ремикейд, фототерапия, биологические препараты.

OXIDATIVE MODIFICATION OF SERUM ALBUMIN PATIENTS WITH PSORIASIS ABOUT DIFFERENT KINDS OF TREATMENT

Kopytova T.V., Kotkova E.V.

State Research Center of Dermatology and Cosmetology, Nizhny Novgorod, e-mail: ekotkova@mail.ru

In this article has been researched the effect of different types of treatment for psoriasis on the intensity of the oxidative modification of albumin in the blood serum. In the serum of patients was determined the degree of spontaneous and metal-catalyzed oxidative modification of albumin by the level of carbonyl derivatives based on the method E.E. Dubinina. The study showed that in untreated patients with psoriasis oxidative modification of albumin is expressed in the preferential formation of ketones with neutral character both in the spontaneous and metal-catalyzed oxidation. Currently used methods of psoriasis therapy led to normalization of the level of ketones with neutral character with metal-catalyzed oxidative modification. With spontaneous oxidative modification changes in the indicators remain at the same level as that of the untreated patients. A similar effect may be related to features of the oxidation mechanism.

Keywords: oxidative modification of albumin, psoriasis, metotrecsat, remicaid, fototherapy, biologicl prepare.

Непреходящая актуальность проблемы изучения псориаза (ПС) связана не только с ростом заболеваемости в популяции, но и увеличением количества тяжелых, инвалидизирующих форм. Существует большое разнообразие факторов, влияющих на развитие и течение ПС, что определяет значительную трудность в выборе эффективного метода терапии.

Основными патологическими процессами при ПС являются гиперплазия эпидермиса с нарушением дифференцировки эпителиоцитов и воспалительная реакция в дерме [3]. В соответствии с этим все методы патогенетической терапии направлены на подавление пролиферации эпителиоцитов, нормализацию нарушений их дифференцировки, устранение воспалительного процесса [4]. В настоящее время считается общепризнанным, что воспалительная составляющая при ПС поддерживается окислительным стрессом (ОС).

Маркерами этого процесса являются перекисное окисление липидов, состояние антиоксидантной системы, окислительная модификация белков (ОМБ). ОМБ считается наиболее ранним маркером ОС [8]. Состояние молекулы альбумина как основного белка плазмы и транспортера лекарственных средств играет при этом существенную роль.

Одним из видов лечения больных ПС является фототерапия (УФВ-терапия и ПУВА-терапия). Она оказывает противовоспалительное, иммуносупрессивное и антипролиферативное действие.

При тяжелых формах в период прогрессирования заболевания используют системные препараты (метотрексат, ретиноиды, циклоспорин и др.). Базисным препаратом в лечении тяжелых форм ПС является метотрексат (МТ). МТ позволяет значительно замедлить ускоренное образование эпителиальных клеток кожи.

В последнее время для лечения тяжелых форм ПС используются генно-инженерные биологические препараты (Ремикейд, Хумира, Стелара и др.), представляющие собой моноклональные антитела. Фармакологическое действие этих агентов направлено на снижение активации Т-клеток путем ингибирования костимуляции или инактивации цитокинов.

Цель исследования – изучение влияния различных видов терапии псориаза на интенсивность окислительной модификации альбумина (ОМА) в сыворотке крови.

Материал и методы исследования. Под наблюдением находились 84 пациента вульгарным псориазом. Возраст варьировал от 21 до 76 лет, длительность заболевания от 1 года до 53 лет. Диагноз устанавливался на основании анамнеза и клинической картины заболевания. Образцы крови исследовались при поступлении больных в стационар Нижегородского филиала «ГНЦДК», т.е. в момент обострения заболевания. При выборе метода терапии учитывается возраст больного, анамнестические данные, клиническая форма, распространенность кожного процесса и наличие сопутствующей патологии.

В контрольную группу вошли 20 практически здоровых лиц сопоставимого возраста без признаков кожной патологии.

Группу сравнения составили 20 пациентов, не получавшие ранее лечение.

27 пациентам проводились процедуры фототерапии, доза облучения назначалась исходя из индивидуальной чувствительности больного, курс 15–35 процедур.

У 30 пациентов в качестве монотерапии применялись инъекции препарата Метотрексат по схеме Weinstein-Frost, в зависимости от тяжести заболевания и веса пациента доза МТ составляла 2,5–5,0 мг троекратно с интервалом в 12 часов – цикл повторяли через 1 неделю; или 7,5–22,5 мг/нед.

У 7 пациентов применялся инфликсимаб (Ремикейд) из расчета 5 мг/кг веса больного

на инфузию по схеме 3 инфузии 0,2,6-я недели терапии с последующей поддерживающей терапией каждые 8 недель.

В сыворотке крови больных определяли степень спонтанной и металлкатализируемой (МК ОМА) окислительной модификации альбумина по уровню карбонильных производных на основе метода Е.Е. Дубининой [6]. Метод основан на том, что конечные продукты свободно-радикального окисления белков могут количественно реагировать с 2,4-динитрофенилгидразином с образованием альдегидных и кетонных группировок. Оптическую плотность образовавшихся динитрофенилгидразонов регистрировали на спектрофотометре СФ-56 при следующих длинах волн: 270 нм – альдегидные (аДНФГн) и 370 нм – кетонные (кДНФГн) производные нейтрального характера, 430 нм – альдегидные (аДНФГо) и 530 нм – кетонные (кДНФГо) производные основного характера.

Для изучения ОМА альбумин из сыворотки крови выделяли 3,0 % этанольным раствором (96 °) трихлоруксусной кислоты, так как в этих условиях он не подвергается осаждению, оставаясь в подкисленном спиртовом растворе. Состав выделенной фракции был исследован электрофоретически – белок представлял собой чистую фракцию альбумина.

Полученные данные статистически обработаны с помощью STATISTICA 7.0 и представлены в виде M±m, где M – среднее арифметическое, m – стандартная ошибка среднего. Оценку значимости отличий между сравниваемыми группами проводили по t-критерию Стьюдента ($p < 0,05$).

Результаты исследования

По изменению содержания продуктов ОМБ можно судить о степени повреждения клетки в условиях оксидативного стресса, а также о резервных возможностях организма. Спонтанная ОМБ характеризует конститутивную способность белков к окислению. Металлкатализируемая (МК) ОМБ указывает на количество субстрата для окисления и возможность его вовлечения в этот процесс [5].

Среди белков плазмы крови особое значение имеет сывороточный альбумин. Этот белок выполняет многообразные функции в организме, но ключевой является транспортная. Поэтому нарушение состояния молекулы альбумина может приводить к снижению эффективности медикаментозного лечения. Окислительные повреждения, при которых образующиеся карбонильные производные формируют поперечные сшивки, нарушающие трехмерную структуру белка, способствуют разворачиванию глобулы и увеличению гидрофобности молекулы. Все это может препятствовать связыванию альбумина с различными лигандами и, в конечном итоге, приводить к конформационным изменениям и снижению активности белка. Считается, что альбумин, с одной стороны, обладает антиоксидантными свойствами, а, с другой, может быть сам ловушкой свободных радикалов

[7].

При сравнении показателей спонтанной ОМА в группе больных ПС, не получавших лечения с контрольной группой, было выявлено (табл.1):

1. Статистически значимое повышение в 1,8 раза уровня кДНФГн.
2. Статистически значимое снижение в 2 раза количества кДНФГо.
3. Показатели альдегидных производных от контрольной группы практически не отличались.

При металлкатализируемом окислении зарегистрировано:

1. Повышение уровня кДНФГн в 1,4 раза.
2. Снижение кДНФГо в 3,9 раза.
3. Показатели альдегидных производных от контрольной группы не отличались.

Таблица 1

Уровень окислительной модификации альбумина сыворотки крови у больных псориазом без лечения, (M±m)

п/гр.	аДНФГн	кДНФГн	аДНФГо	кДНФГо	Суммарная ОМА
Спонтанная ОМА (ед. оптич. плотн. / мл сыв.)					
Контрольная группа(n=20)	1,96±0,34	2,18±0,20	1,49±0,17	0,22±0,04	5,86±0,71
Больные ПС без лечения (n=20)	2,53±0,21	3,75±0,36#	1,61±0,15	0,11±0,02#	7,99±0,75#
Металлкатализируемая ОМА (ед. оптич. плотн. / мл сыв.)					
Контрольная группа(n=20)	2,42±0,41	3,17±0,26	2,26±0,22	0,47±0,06	8,33±0,87
Больные ПС без лечения (n=20)	2,74±0,24	4,42±0,28#	2,09±0,13	0,12±0,02#	9,37±0,64

– статистически значимые различия с контрольной группой ($p<0,05$).

Таким образом, у больных ПС ОМА обусловлена преимущественным образованием кДНФГн, которые, по данным Абаленихиной Ю.В., являются высокотоксичными продуктами и маркерами агрегации белков [1]. То есть уже на стадии формирования патологического процесса происходят окислительные изменения в молекуле альбумина, которые выявляются при анализе как спонтанной, так и МК ОМА.

В связи с тем, что применяемые в терапии ПС методы лечения являются достаточно агрессивными для организма, представлялось интересным проследить их влияние на функциональное состояние белковых систем и в частности альбумина. Известно, что при фототерапии часто отмечаются побочные реакции в виде эритемы, зуда и пигментации кожи, при длительной терапии – преждевременное старение кожи, имеются сведения о риске канцерогенного действия. Многими авторами отмечается частота побочных эффектов,

вызванных приемом метатрексата (МТ). Повреждающее действие МТ на органы с высокой степенью пролиферации обусловлено подавлением репарации клеток. При использовании биологических препаратов отмечается угнетение иммунной защиты организма.

Результаты исследования содержания продуктов ОМА в сыворотке крови больных ПС в зависимости от вида терапии представлены в таблице 2.

Таблица 2

Уровень спонтанной окислительной модификации альбумина сыворотки крови у больных псориазом по результатам лечения, (M±m)

п/гр.		аДНФГн	кДНФГн	аДНФГо	кДНФГо	Суммарная ОМА
Спонтанная ОМА (ед. оптич. плотн. / мл сыв.)						
Больные ПС без лечения (n=20)		2,53±0,21	3,75±0,36#	1,61±0,15	0,11±0,02#	7,99±0,75#
Результат лечения:	фототерапия (n=27)	1,81±0,23*	2,95±0,23#	1,51±0,11	0,12±0,01#	6,40±0,47
	метотрексат (n=30)	2,48±0,22	3,08±0,27#	1,42±0,11	0,21±0,04*	7,18±0,53
	биологические препараты(n=7)	1,98±0,61	3,12±0,41#	1,42±0,18	0,11±0,02#	6,62±1,23
Контрольная группа(n=20)		1,96±0,34	2,18±0,20	1,49±0,17	0,22±0,04	5,86±0,71

* – статистически значимые различия с группой сравнения ($p<0,05$); # – статистически значимые различия с контрольной группой ($p<0,05$).

В группе больных, получавших фототерапию, выявилось статистически значимое снижение показателей аДНФГн в 1,4 раза относительно группы сравнения. Уровень остальных производных практически не изменялся.

В результате лечения больных МТ выявилось повышение уровня кДНФГо в 1,9 раза, который приблизился к показателям контрольной группы. Уровень остальных карбонильных производных практически не изменялся, но и не увеличивался.

Лечение биологическими препаратами не привело к изменениям уровня ни одного из показателей спонтанной ОМА.

Несколько иные и разнонаправленные изменения были выявлены при изучении показателей МК ОМА сыворотки крови (табл. 3).

При использовании методов фототерапии происходит снижение количества альдегидов, нормализация показателей кДНФГн. Уровень кетонов основного характера остался таким же, как и в группе сравнения.

При терапии МТ обнаружена нормализация и достоверное снижение кДНФГн в 1,2

относительно группы сравнения.

Таблица 3

Уровень индуцированной окислительной модификации альбумина сыворотки крови у больных псориазом по результатам лечения, (M±m)

п/гр.		аДНФГн	кДНФГн	аДНФГо	кДНФГо	Суммарная ОМА
Металлкатализируемая ОМА (ед.оптич.плотн. / мл сыв.)						
Больные ПС без лечения (n=20)		2,74±0,24	4,42±0,28#	2,09±0,13	0,12±0,02 #	9,37±0,64
Результат лечения:	фототерапия (n=27)	1,87±0,34*	3,41±0,21*	1,62±0,11*#	0,12±0,02 #	7,02±0,64*
	метотрексат (n=30)	2,33±0,29	3,66±0,15*	1,85±0,15	0,17±0,03 #	8,01±0,71
	биологические препараты(n=7)	2,33±0,41	3,31±0,17*	1,83±0,22	0,16±0,03 #	7,63±0,36*
Контрольная группа(n=20)		2,42±0,41	3,17±0,26	2,26±0,22	0,47±0,06	8,33±0,87

*** –** статистически значимые различия с группой сравнения ($p<0,05$)**;** # – статистически значимые различия с контрольной группой ($p<0,05$).

Лечение биопрепаратами привело к понижению кДНФГн в 1,3 раза.

Таким образом, анализируя полученные данные, можно заключить, что все методы лечения нормализуют основной показатель окисленности молекулы альбумина – кДНФГн, но только при МК ОМА.

При спонтанной ОМА изменения в показателях практически не обнаруживаются и они остаются на том же уровне, что и у не леченных больных.

В тоже время можно отметить более выраженные положительные изменения в спектре карбонильных производных при фототерапии, что возможно является следствием каскада фотохимических процессов, описанных Бавриной А.П. [2].

Более быстрая нормализация показателей МК ОМА по сравнению со спонтанной ОМА в результате лечения больных может быть связана с особенностями механизма окисления.

Как считает Дубинина Е.Е. при воспалительных процессах происходит окислительная модификация белков и ферментов нейтрофилов в присутствии Fe^{3+} за счет активных форм кислорода (АФК), генерируемых при дыхательном взрыве. АФК вызывают разрушение коллагеновых фибрилл. При металлкатализируемой ОМБ, вызываемой АФК, затрагиваются в основном те участки белковой молекулы, которые осуществляют связь белка с металлом

переменной валентности. Спонтанной окислительной модификации подвергаются фактически все аминокислоты. Очевидно, МКО – это местный специфический процесс, связанный с небольшим количеством белков, участвующих в связывании металлов переменной валентности, и поэтому он быстрее нормализуется после проведенного лечения, т.к. снимается воспаление. Следовательно, происходит повышение резервов организма.

Выводы:

1. ОМА – показатель выраженности влияния АФК на молекулу альбумина в сыворотке крови.
2. Используемые в настоящее время методы лечения тяжелых форм ПС, несмотря на хороший терапевтический эффект, не восстанавливают физиологические свойства альбумина, что возможно способствует рецидивам заболевания.
3. В терапии ПС необходимо использовать антиоксиданты.

Список литературы

1. Абаленихина Ю.В. Окислительная модификация белков и лизосомальный цистеиновый протеолиз иммунокомпетентных органов крыс в условиях модулирования синтеза оксида азота / Ю.В. Абаленихина. – Рязань, 2015. – 26 с.
2. Баврина А.П. Технология комплексной фототерапии для компенсации нарушений, вызванных высокоинтенсивным лазерным излучением, в эксперименте // СТМ. – 2015. – Т. 7, № 4. – С.78-83.
3. Братухина Г.Д. Прогностическая роль клинико-морфологической оценки воспалительного инфильтрата при псориазе / Г.Д. Братухина. – Новосибирск, 2004. – 23 с.
4. Владимиров В.В. Современные методы лечения псориаза // Consilium Medicum – 2006. – С.23-26.
5. Губский Ю.И. Токсикологические последствия окислительной модификации белков при различных патологических состояниях / Ю.И. Губский, И.Ф. Беленичев // Совр. пробл. токсикол. – 2005. – № 3. – С. 20-26.
6. Дубинина Е.Е. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод ее определения / Е.Е.Дубинина, С.О.Бурмистров, Д.А.Ходов, И.Г. Портов // Вопр. мед. химии. – 1995. – Т. 41, № 1. – С. 24-26.
7. Созарукова М.М. Сывороточный альбумин как источник и мишень свободных радикалов в патологии / М.М. Созарукова, Е.В. Проскурнина, Ю.А. Владимиров // Вестник РГМУ. – 2016. – № 1. – С. 61-66.
8. Halliwell B. Free radicals and human disease: Where are we now? / B.Halliwell, M.C.

Gutteridge, E.S. Cross // J. Lab. Clin. Med. – 1992. – V. 119. – P. 598-620.