

На правах рукописи

**ЩЕЛЧКОВА
НАТАЛЬЯ АЛЕКСАНДРОВНА**

**ОКИСЛИТЕЛЬНАЯ МОДИФИКАЦИЯ КОМПОНЕНТОВ
СИСТЕМЫ КРОВИ В НОРМЕ И
ПРИ ЭНДОГЕННОЙ ИНТОКСИКАЦИИ
(на примере хронических дерматозов)**

**03.01.04 - биохимия
03.03.01 - физиология**

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

**Нижний Новгород
2011**

Работа выполнена в биохимической лаборатории ФГБУ «Нижегородский научно-исследовательский кожно-венерологический институт», на кафедре молекулярной биологии и иммунологии ФГБОУ ВПО «Нижегородский Государственный университет им. Н.И. Лобачевского».

Национальный исследовательский университет.

Научные руководители:

доктор биологических наук
доктор медицинских наук,
профессор

Копытова Т. В.

Добротина Н. А.

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук

Обухова Л. М

доктор медицинских наук

Смирнов В. П.

Ведущее учреждение: ФГБОУ ВПО «Марийский государственный университет» г. Йошкар-Ола

Защита состоится « ____ » декабря 2011 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета Д.212.166.15 Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского по адресу: 603950, Нижний Новгород, пр. Гагарина, д. 23, корп. 1, биологический факультет.

Автореферат разослан « ____ » _____ 2011г.

С диссертацией можно ознакомиться в фундаментальной библиотеке Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского по адресу: 603950, г. Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23.

Ученый секретарь диссертационного совета

кандидат биологических наук, доцент

Копылова
Светлана Вячеславовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Актуальной проблемой современной биологии и медицины является изучение концепции эндогенной интоксикации (ЭИ) в патогенезе различных по этиологии заболеваний (Marshall J.C., 2003; Афанасьева А.Н. и др., 2007; Малахова М.Я., Петросян Л.Б., 2011). Большое внимание уделяется хронической патологии, снижающей качество жизни индивида и определению преморбидных состояний (Малахова М.Я., Зубаткина О.В., 2006). Неоспорим тот факт, что система крови является первым защитным звеном, активно реагирующим на компоненты ЭИ. Существенное значение в формировании ЭИ придается активации свободнорадикальных процессов в органах и тканях, индуцируемых патологией. Свободные радикалы способны инициировать перекисное окисление жирнокислотных остатков в составе липидов (Бизенкова М.Н. и др., 2007) и эффективно окислять, тем самым менять активность и инактивировать различные белки (Dalle-Donne I., et. al., 2002; Дубинина Е.Е. Пустыгина А.В., 2006; Муравлева Л.Е. и др., 2010), разрушать некоторые полисахариды и стимулировать мутагенез за счет накопления окислительных повреждений ДНК (Finkel T., Holbrook N., 2000; Barja G. Herrero A., 2000; Дурнев А.Д. и др., 2002).

В настоящее время отмечается значительное увеличение хронических заболеваний кожи. При этом наиболее часто регистрируются состояния, ассоциированные с аллергическим статусом: атопический дерматит; патологией дифференциации клеток кожи: псориаз. Единой точки зрения на причины возникновения, механизмы хронизации и снижение эффективности лекарственных воздействий при этих полигенных патологиях до настоящего времени нет (Agíma M., 2005; Finlay A., 2007; Пазина М.В., 2009; Владимирова И.С., 2010). При диагностированной ЭИ, концепция которой подразумевает мультифакториальность развивающейся патологии, кожа становится мишенью вторичного повреждения, вызванного эндогенными токсическими соединениями, с комплексом морфофункциональных изменений. Несмотря на появление большого количества новых препаратов и значительный прогресс в области понимания патогенеза, дерматозы крайне трудно поддаются лечению. При этом причины недостаточной эффективности лекарственных воздействий до настоящего времени остаются не выясненными.

Знание механизмов токсического воздействия окисленомодифицированных биомолекул на формирование ЭИ может явиться основой для обоснования разработки новых патогенетических схем лечения.

Цель работы: исследовать влияние продуктов окислительной модификации системы крови на формирование эндогенной интоксикации у больных хроническими распространенными дерматозами.

Задачи исследования:

1. Провести оценку интенсивности процессов липопероксидации. Изучить влияние показателей перекисного окисления липидов (ДК, МДА, ОШ), спектра липидов в сыворотке, эритроцитах крови и в пуле молекул средней массы на эндогенную интоксикацию при дерматозах.
2. Изучить окислительную модификацию белков системы крови при ЭИ у больных дерматозами.
3. Провести сравнительное изучение продукта окисления ДНК - 8-ОН-2-дезоксигуанозина в сыворотке крови в норме, в зависимости от ЭИ при различных альтерациях кожи.
4. Провести сравнительный анализ изученных показателей системы крови в группах больных с различной восприимчивостью к проводимой терапии.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Гиперактивность свободнорадикальных процессов при тяжелых хронических дерматозах выражается увеличением содержания первичных и вторичных продуктов ПОЛ в сыворотке крови, являясь пусковым механизмом развития ЭИ. Нарастание количества МСМ приводит к снижению перекисного окисления на уровне оснований Шиффа, что повторно запускает активацию окислительных процессов.
2. ЭИ при хронических дерматозах проявляется увеличением фрагментации белков и окисленности олигопептидов. Показатель - соотношение суммарного количества МСМ и окислительной модификации белков сыворотки крови - с высокой степенью вероятности определяет резистентность больных к проводимой терапии.
3. ЭИ у больных хроническими дерматозами сопровождается повышением содержания 8-ОН-2-дезоксигуанозина – продукта окислительной модификации ДНК в сыворотке крови.

Научная новизна. Впервые проведена биохимическая характеристика пула МСМ сыворотки крови и эритроцитов при хронической альтерации кожи. Впервые комплексно исследованы соотношения липидов в пуле МСМ сыворотки крови и эритроцитах в условиях ЭИ.

Впервые проведено изучение уровня различных карбонильных производных в сыворотке крови, пуле МСМ сыворотки и эритроцитов крови, показана их роль в формировании эндогенной интоксикации при различных дерматозах.

Впервые изучен основной маркер окисленной ДНК – 8-ОН-2-дезоксигуанозин в качестве характеристики глубины свободнорадикальных процессов организма при дерматозах с ЭИ.

Результаты проведенных исследований углубляют представление о патогенетической роли процессов свободнорадикального окисления в развитии хронической альтерации кожи.

Определены информативные тесты для выявления нарушения восприимчивости пациента к лекарственным препаратам.

Практическая значимость работы. Интегральные маркеры токсичности и показатели свободнорадикального окисления обладают информативностью для ранней и объективной лабораторно-функциональной диагностики эндогенного токсикоза в организме пациентов с различными альтерациями кожи. Апробирован и оформлен в виде заявки на изобретение показатель - отношение суммарного количества МСМ и ОМБ сыворотки крови, который с высокой степенью вероятности определял резистентность больных тяжелыми хроническими дерматозами к проводимой терапии.

Апробация и публикация материалов исследования. Материалы диссертации докладывались на IV съезде Российского общества биохимиков и молекулярных биологов" г. Новосибирск, 2008, 14 – й Нижегородской сессии молодых ученых (естественнонаучные дисциплины) апрель 2009; 5-ой Общероссийской научной конференции «Актуальные вопросы науки и образования» Москва, 11-13 мая 2009г; 3-й научно-практический симпозиуме «Свободнорадикальная медицина и антиоксидантная терапия» Волгоград, 12-14 мая, 2010г.; 3-й Общероссийской научной конференции «Актуальные вопросы науки и образования», Москва, 11 – 13 мая 2010 г, VIII Международной конференции «Биоантиоксидант», Москва, 4 – 6 октября, 2010 г.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 13 печатных работ, 4 из которых в изданиях, рекомендованных ВАК для публикации материалов диссертаций, подана 1 заявка на изобретение.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 171 странице основного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания лабораторных методов исследования, 3 глав собственных исследований, обсуждения результатов и выводов. Список литературы включает 325 источника, в том числе 230 отечественных и 95 зарубежных авторов. Диссертация содержит 24 таблицы и 9 рисунков.

Содержание работы

Материалы и методы исследования.

Объектом для исследования служили сыворотка и эритроциты больных тяжелыми хроническими дерматозами: псориаз, atopический дерматит, пузырьные дерматозы. Проведено клинико-лабораторное обследование 165 пациентов: 45 – atopическим дерматитом, 70 – псориазической болезнью, 50 - пузырьными дерматозами в возрасте от 19 до 75 лет. Из всех обследованных мужчин - 49% (81 человека), женщины - 51% (84 человека).

Контрольную группу составили от 20 до 45 человек без видимых проявлений кожной патологии, заболеваний сердечно-сосудистой системы и желудочно-кишечного тракта, репрезентативных по полу и возрасту.

Лабораторное обследование включало:

- выделение молекул средней массы - МСМ (Малахова М.Я., 1995; Николайчик В.В. и др., 1991) с определением в их составе содержания ОП (диагностическими наборами фирмы «Синтакон»), мочевины (диагностическими наборами фирмы «Абрис»), гидрофобной составляющей (Николайчик В.В. и др., 1991).

- оценку состояния прооксидантной системы крови и пула МСМ по количеству продуктов липопероксидации – первичных – ДК (Гончаренко М.С., 1985); вторичных - МДА, по реакции с тиобарбитуровой кислотой (Гончаренко М.С., 1988; Орехович В.А., 1977 с нашими модификациями); и оснований Шиффа (Волчегорский И.А., 1989; Львовская Е.И. и соавт., 1991). Окислительная модификация белков и эритроцитов крови, а также пула МСМ крови оценивалась спектрофотометрически по методу Е.Е. Дубининой (1995).

- фракционирование липидов крови и пула МСМ выполнялось методом одномерной тонкослойной хроматографии в тонком слое силикагеля при последовательном применении двух систем растворителей (Творогова М.Г. с соавт., 1998).

- окислительная модификация нуклеиновых кислот оценивалась методом твердофазного иммуноферментного анализа набором Assay Desings DNA Damage ELISA (Кат. № EKS-350), содержащим моноклональные антитела на микропланшетном фотометре Multiscan EX (ThermoLabSistems, Финляндия).

Всего выполнено 783 анализа в сыворотке крови, 635 в эритроцитах, а также 434 и 250 анализов в пуле МСМ сыворотки и эритроцитов крови.

Характеристика и сравнительный анализ лабораторных тестов проводились в зависимости от формы альтерации кожи (атопический дерматит, псориаз, пузырьные дерматозы), выраженности эндогенной интоксикации и восприимчивости к проводимой терапии дерматоза.

Статистический анализ проводили с использованием пакета программ Microsoft Excel и Statistica 6.0. При сравнении средних значений изучаемых групп процент возможной ошибки находили по таблице t-критерия Стьюдента для парных сравнений (при нормальном распределении), выражаемый в виде значений достоверности различия - «р».

Результаты исследования и их обсуждение

В настоящее время можно считать установленным фактом, что наиболее информативным критерием интегральной оценки изменений метаболического статуса при ЭИ на уровне организма является изучение спектра МСМ (Малахова М.Я., Петросян Л.Б., 2010; Федорова О.В. и др., 2011). В ходе проведенных нами исследований показано, что у половины больных хроническими дермато-

зами вне зависимости от вида альтерации кожи определяется манифестное статистически значимое ($p < 0,05$) увеличение количества МСМ в сыворотке крови и эритроцитах по сравнению с группой практически здоровых лиц. Такая частота выявления ЭИ позволила нам разделить общую группу обследованных на больных с ЭИ и без нее по уровню МСМ сыворотки крови, для обнаружения специфических изменений в метаболическом статусе пациентов на фоне эндотоксикоза. Группа с ЭИ имела достоверно высокие значения МСМ по сравнению с контролем и группой без ЭИ ($p < 0,05$) как в сыворотке крови ($23,46 \pm 1,39$; $12,81 \pm 0,38$ и $12,59 \pm 0,3$ опт.ед., соответственно), так и в эритроцитах ($21,87 \pm 0,8$; $16,0 \pm 1,2$ и $16,85 \pm 1,25$ опт. ед., соответственно).

Влияние различных метаболитов прооксидантной системы на формирование ЭИ при тяжелых хронических альтерациях кожи.

Изучение выраженности процессов пероксидации показало существенное увеличение содержания молекулярных продуктов ПОЛ в сыворотке, эритроцитах крови и в пуле МСМ при хронической альтерации кожи. Однако в группе без ЭИ повышенные значения ДК отмечались у 40% пациентов, а в группе больных с ЭИ только у 26% больных. Содержание ТБК-продуктов имело обратную зависимость: группа без ЭИ в 40% случаев характеризовалась высокими значениями, а ЭИ сопровождалась повышением данного показателя у 60% пациентов (Рис.1).

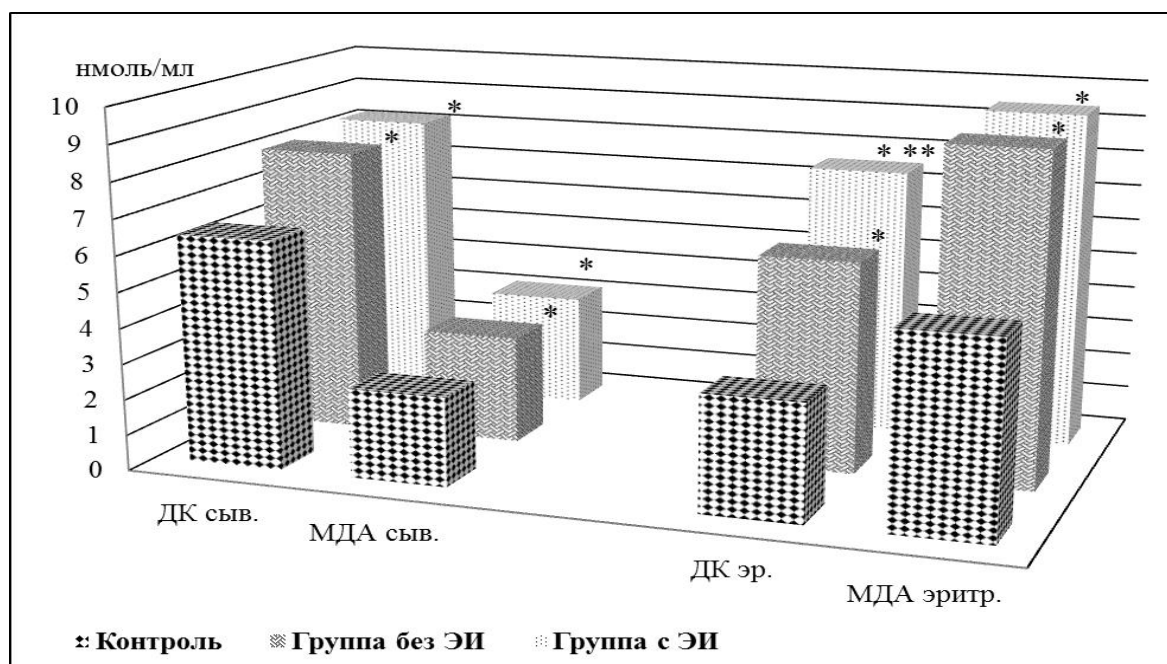


Рис.1. ПОЛ системы крови при различной степени выраженности ЭИ в норме и альтерациях кожи.

* – достоверность различий с контролем ($p < 0,05$)

** – достоверность различий групп между собой ($p < 0,05$)

Содержание диеновых конъюгатов и ТБК-зависимых продуктов ПОЛ у больных с альтерацией кожи относительно контроля, было существенно выше в эритроцитах, чем в сыворотке крови, и проявилось в среднем с одинаковой частотой вне зависимости от ЭИ. Количество ДК в эритроцитах крови на фоне эндотоксикоза на 30% превышало аналогичное значение в группе без ЭИ и более чем в 2 раза контрольные значения. Уровень вторичных продуктов ПОЛ в эритроцитах вне зависимости от ЭИ был достоверно повышен. Умеренный процесс накопления ПОЛ является физиологическим стимулятором их самообновления (Донцов В.И. и др., 2006).

Анализ результатов по содержанию инактивированных продуктов ПОЛ – основаниям Шиффа (ОШ) (Рис.2.), показал, что при ЭИ снижается образование продуктов конденсации высокоактивных альдегидов и аминов. Это создает условия для запуска цепи свободнорадикальных процессов (СРП) вновь, усугубляя влияние ПОЛ на организм. Опираясь на эти факты, можно сказать, что начальная активация свободнорадикального окисления не зависит от наличия ЭИ и направлена на утилизацию патологических иммунных агентов.

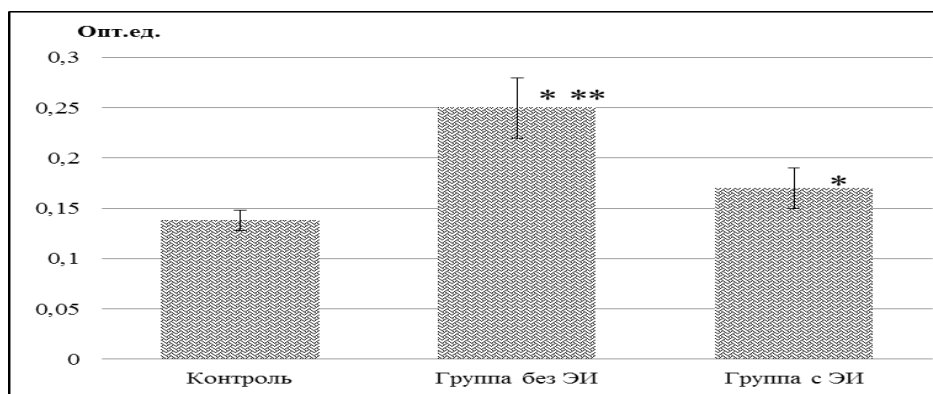


Рис.2. Основания Шиффа сыворотки крови при различной степени выраженности ЭИ в норме и альтерациях кожи.

* – достоверность различий с контролем ($p < 0,05$)

** – достоверность различий групп между собой ($p < 0,05$)

При анализе пула МСМ оказалось, что количество первичных продуктов ПОЛ статистически значимо увеличено относительно контроля как в группе больных с ЭИ, так и без нее ($1,08 \pm 0,1$ и $2,12 \pm 0,26$; $4,6 \pm 0,07$ нмоль/л соответственно, $p < 0,05$) только в сыворотке крови. При этом эндогенная интоксикация сопровождалась увеличением данного показателя в меньшей степени, что, возможно, связано с наличием в составе МСМ веществ – акцепторов свободных радикалов, например, мочевины, СЖК. Содержание МДА в пуле МСМ как сыворотки крови, так и эритроцитов было статистически значимо выше контрольных значений, но не зависело от ЭИ. Таким образом, уровень МСМ лимитирует СРП в организме.

Липидный профиль системы крови при эндогенной интоксикации у больных с альтерацией кожи.

Известно, что у больных дерматозами имеются разнонаправленные изменения липидного обмена, имеющие значение в патогенезе заболеваний (Прохоренков В.И., 2000; Корсунская И.М. и др., 2004; 2005). В доступной литературе нет сведений об особенностях липидного спектра при хронических дерматозах в условиях ЭИ.

Применение хроматографических методов с использованием двух систем растворителей дало возможность выявить одновременно 9 - 10 фракций липидных компонентов в сыворотке крови и мембранах эритроцитов при кожных патологиях и у здоровых лиц. Из них - 4 фракции фосфолипидов: лизофосфатидохолин (ЛФХ), сфингомиелин (СМ), фосфатидилэтаноламин (ФЭА), фосфатидилхолин (ФХ); фракции моно-, ди- и три- глицеридов – МГ, ДГ, ТГ; свободные жирные кислоты (СЖК) и холестерин (ХС). Компьютерная денситометрия хроматограмм позволила оценить соотношение долей отдельных классов липидов в сыворотке крови и системе эритрона у здоровых лиц и у пациентов с альтерацией кожи.

В сыворотке крови больных кожной патологией были выявлены разнонаправленные, но статистически незначимые изменения большинства фосфолипидов: число больных с повышенным и пониженным уровнем СМ составило в среднем по 30%; уровень ФХ снижен у 32%, а повышен у 20% пациентов; ФЭА повышен лишь у 17% пациентов. Статистически значимым было снижение количества ЛФХ практически у всех больных, которое не зависело от количества в сыворотке крови МСМ.

Анализ основных групп липидов сыворотки крови больных без ЭИ выявил статистически значимое увеличение содержания общих фосфолипидов ($28,45 \pm 1,17\%$ относительно $24,28 \pm 1,2\%$ в контроле, $p < 0,05$), а также снижение содержания ХС ($30,44 \pm 1,57\%$ и $36,67 \pm 1,76\%$ в контроле, $p < 0,05$). В группе больных с ЭИ имелась лишь тенденция к увеличению содержания в сыворотке крови фосфолипидов и снижению холестерина.

Мембраны эритроцитов крови больных дерматозами по сравнению с контролем характеризовались статистически значимым снижением содержания трудно окисляемых фосфолипидов (СМ и ЛФХ) и повышением количества легко окисляемых фракций (ФЭА).

Известно, что в составе пула МСМ имеются вещества гидрофобной природы: холестерин, ФЛ, ТГ, СЖК (Карякина Е.В., 2004). Они связываются с белками плазмы крови, приобретают свойства гаптенгов и поглощаются, в основном, клетками иммунной системы, модулируя ее активность.

Установлено, что в группе больных с ЭИ гидрофобная составляющая МСМ сыворотки крови в 1,2 раза увеличена относительно показателя здоровых лиц. Гидрофобная фракция находится в сыворотке крови практически полностью в связанном состоянии в виде комплексов с альбуминами и липопротеинами (Болдырев А.А. и др., 2006; Белоногов Р.Н. и др., 2009; Власов А.П. и др., 2010). Таким образом, ЭИ у больных хроническими дерматозами проявляется нарастанием количества гидрофобных веществ в пуле МСМ, что обосновало изучение липидных фракций пула МСМ системы крови. Нами впервые был исследован липидный спектр МСМ сыворотки и эритроцитов крови при хронических дерматозах (Таблица 1).

Таблица 1

Содержание фракций липидов в пуле МСМ сыворотки крови у больных тяжелыми дерматозами в зависимости от наличия ЭИ (в % от общего количества липидов по данным ТСХ) (M± m).

Фракции	Контроль	Общая группа	Группа без ЭИ	Группа с ЭИ
ФЛ	6,59±0,71	12,38±0,90*	13,03±1,34*	10,49±1,40*
МГ	7,14±0,49	8,69±0,51	9,04±0,68*	8,88±1,10
СЖК	22,05±1,32	22,75±1,09	21,89±1,12	25,70±1,18* **
ОГЛ	25,36±1,10	27,91±1,31	28,4±1,65	26,86±2,65
ХС	44,48±1,85	36,89±1,32*	36,76±1,65*	36,41±3,22*

* – уровень значимости различий с контролем (p)<0,05

** - уровень значимости различий групп между собой (p)<0,05

В составе пула МСМ общей группы больных количество ФЛ увеличено в 2 раза, фракция МГ повышена на 30%, а фракция ХС снижена на 21%. Полученные результаты позволяют говорить, что гидрофобная часть пула МСМ при хронических дерматозах формируется ФЛ и ГЛ на фоне низких значений ХС.

В группе с ЭИ содержания ФЛ повышение в 1,6 раза, а в группе без ЭИ в 2 раза по сравнению с контролем (p<0,05). Это увеличение, очевидно, связано с окислительной модификацией белка ЛП-частицы, которая нарушает его взаимодействие с фосфолипидной молекулой.

Характерной особенностью пациентов с ЭИ является статистически значимое увеличение содержания СЖК (p<0,05) в пуле МСМ. Известно, что СЖК в крови переносятся молекулами альбумина, но накопленные в крови МСМ взаимодействуют с активными центрами этого белка, препятствуя их связыванию. Содержание холестерина в пуле МСМ сыворотки крови статистически

значимо снижено в обеих группах по сравнению с контролем, что соответствует низкому процентному уровню ХС в системе крови пациента.

В эритроцитах крови не выявлено статистически значимых различий в количестве гидрофобной фракции МСМ исследованных групп и контроля, что сопровождалось и отсутствием изменений в основных ее фракциях (СЖК, ГЛ, ХЛ) по сравнению с контролем и группой с ЭИ.

Влияние ЭИ на окислительную модификацию белков системы крови при альтерации кожи.

Окисление белков является надежным и ранним маркером окислительных повреждений (Dean, R.T., Fu S., Stocker, R. et al., Jackson, M.J.1999). Имеющиеся в литературе данные свидетельствуют, что в условиях окислительного стресса под влиянием АФК происходят изменения в структуре белковых молекул, нарушающие ее конформацию (Davies, K.J.,1987; Дубинина Е.Е., 2006; 2008). Это генерирует новые антигены и провоцирует иммунный ответ (Squier T.C., 2001; Lambeth J.D.,2007). Измененные белковые молекулы легче подвергаются протеолизу (окислительная модификация белка путем фрагментации) и катаболизму с образованием олигопептидов (ОП) и конечных продуктов белкового обмена (мочевина), которые становятся компонентами ЭИ (Пасечник И.Н., 2004)(Таблица 2).

Группа с выраженной ЭИ характеризовалась статистически значимым повышением ОП сыворотки крови в 50% случаев, что свидетельствует об активации у этих больных процессов окислительной деструкции, вызванных ЭИ.

Уровень мочевины в составе МСМ из сыворотки крови и эритроцитов больных с ЭИ превышает контрольные значения и показатели в группе без ЭИ почти в 2 раза. По нашему мнению это свидетельствует о том, что при хронических системных дерматозах имеет место, интенсификация процессов утилизации окислено - модифицированных протеинов. Это является очень важным, так как известна способность мочевины встраиваться в метаболические цепи, нарушая или изменяя их функционирование.

ОМБ может быть связана не только с нарушением структуры полипептидной цепочки, но и отдельных аминокислотных остатков, что приводит к изменению конформации белка и его регуляторно - функциональных свойств. (Дубинина Е.Е., Пустыгина А.В., 2008). Это определяется характером образовавшихся карбонильных производных, регистрируемых на различных длинах волн спектра ОМБ. Белки плазмы, подвергшиеся окислительной деструкции, имеют довольно большой период полураспада. Исходя из этого, повышение количества белков с окисленными карбонильными группами является наиболее перспективным маркером интенсивности СРП.

Олигопептиды и мочевины пула МСМ системы крови в норме и при альтерации кожи в зависимости от наличия ЭИ.

Показатель	Контроль	Группа без ЭИ	Группа с ЭИ
ОП сыворотки, мг/л	40,19±2,27	40,35±2,31	48,76±2,74* **
Мочевина пула МСМ сыворотки, ммоль/л	0,41±0,05	0,58±0,06	1,00±0,12* **
Мочевина пула МСМ эритроцитов, ммоль/л	0,87±0,09	0,54±0,06*	1,13±0,09* **

* – уровень значимости различий с контролем ($p < 0,05$)

** – уровень значимости различий групп между собой ($p < 0,05$)

У больных общей группы тяжелыми хроническими дерматозами уровень первичных – альдегидных продуктов ОМБ (270 нм) был выше контрольных значений на 76% и регистрировался у 60% пациентов, а уровень вторичных – кетонных продуктов ОМБ (370 нм) увеличен на 58% относительно контроля и обнаруживался у 74% больных. Высокие значения показателей выявлены у пациентов вне зависимости от ЭИ (Рис.3).

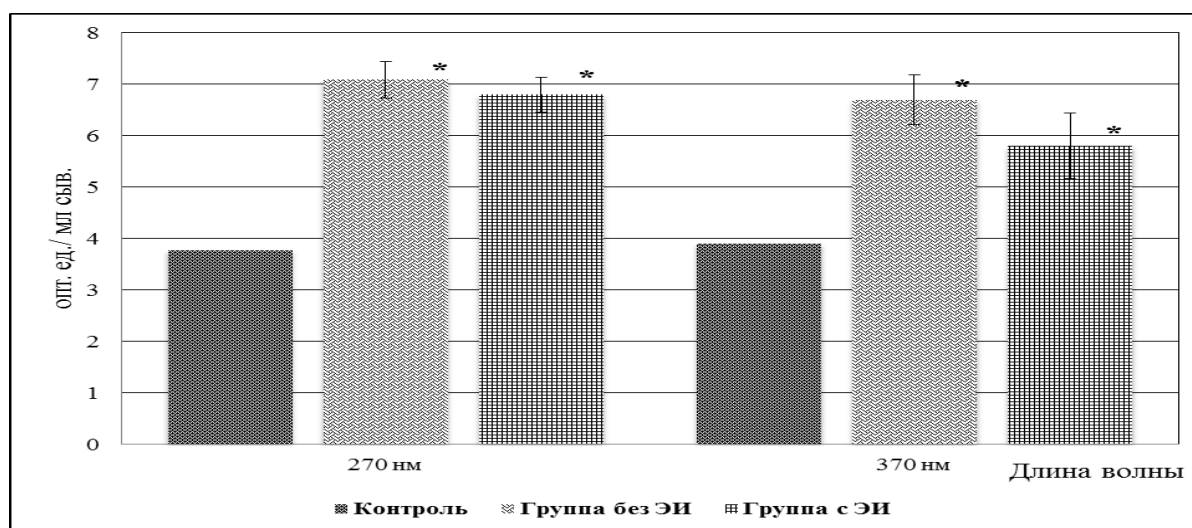


Рис. 3. Содержание различных карбонильных производных сыворотки крови в норме и при альтерациях кожи в зависимости от наличия ЭИ ($M \pm m$).

* – уровень значимости различий с контролем ($p < 0,05$)

Проведенный нами анализ ОМБ в группе без ЭИ выявил увеличение данного показателя у 66 – 77% пациентов, в то время как повышенный уровень ПОЛ (по вторичным продуктам, вызывающим повреждение белковых молекул) регистрировался лишь в 40% наблюдений. Это позволяет нам говорить о пер-

воочередности ОМБ, проявляющейся накоплением дефектных протеинов и развитием на этой основе аутоиммунных процессов.

Анализ представленных в таблице 3 данных выявил статистически значимое увеличение количества карбонильных производных (230 нм - альдегидные производные нейтрального характера и 270 нм – альдегидные производные основного характера) в группе больных с ЭИ не только относительно контрольных значений, но и группы больных без ЭИ. Эти изменения говорят об интенсификации окислительной модификации ОП при ЭИ.

Таблица 3

Содержание различных карбонильных производных в пуле МСМ сыворотки крови в норме и при альтерациях кожи в зависимости от наличия ЭИ (опт.ед. на мл сыворотки).

Показатель	Контроль	Общая группа	Группа без ЭИ	Группа с ЭИ
230нм	6,62±0,35	7,42±0,30	6,31±0,39	8,04±0,54* **
270 нм	2,1±0,28	1,98±0,08	1,62±0,11	2,26±0,12 **

* – уровень значимости различий с контролем (p)<0,05

** – уровень значимости различий групп между собой (p)<0,05

Окислительная модификация нуклеиновых кислот при кожной альтерации в зависимости от ЭИ.

Одним из следствий окислительного стресса на молекулярном уровне является окислительное повреждение нуклеиновых кислот, вызываемое активными формами кислорода, что представляется важнейшим патохимическим процессом (Дурнев А.Д. и др., 2002). Повреждения ДНК включают однонитевые и/или двунитевые разрывы цепей ДНК, модификацию азотистых оснований и др. Ранее было показано (Dizdaroglu M. et al., 1992), что из четырех оснований, входящих в структуру ДНК, наиболее окисляемым является гуанин.

Пациенты с тяжелыми хроническими дерматозами характеризовались повышенным уровнем 8-ОН-2-дезоксигуанозина в сыворотке крови в среднем на 36% относительно контроля. Нами выявлено, что наличие ЭИ сопровождается увеличением данного показателя у 50% больных с кожной патологией, и он превышает контрольные значения в 1,5 раза (рис.5.). В тоже время в группе без ЭИ наблюдается рост данного показателя лишь в 25% случаев. Учитывая полученные данные можно сказать, что ЭИ усугубляет СРП, выводя их на генетический уровень повреждения клетки.

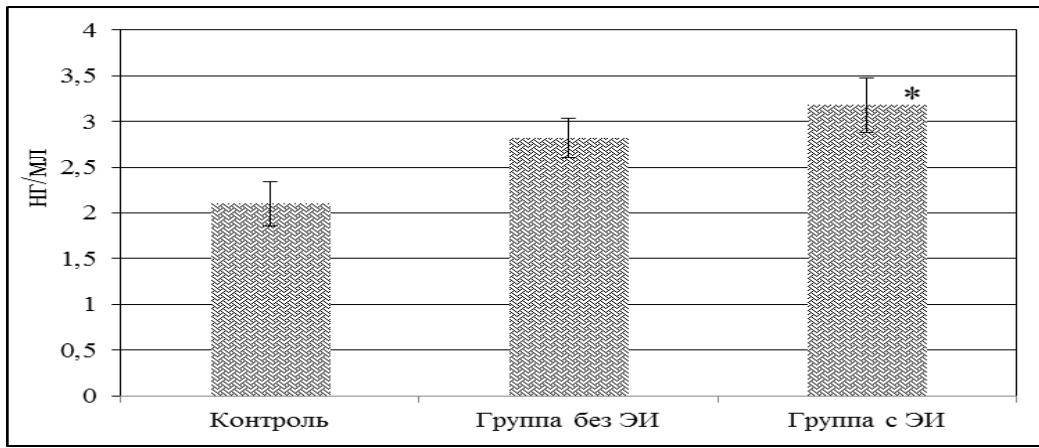


Рис.5. Содержание 8-ОН-2-дезоксигуанозина в сыворотке крови в норме и при альтерациях кожи в зависимости от наличия ЭИ (нг/мл сыворотки).

* – уровень значимости различий с контролем (p)<0,05

С учетом проведенных исследований была предложена схема, отражающая основные пути взаимовлияния эндогенной интоксикации и окислительных процессов при хронической альтерации кожи (Рис.6.).

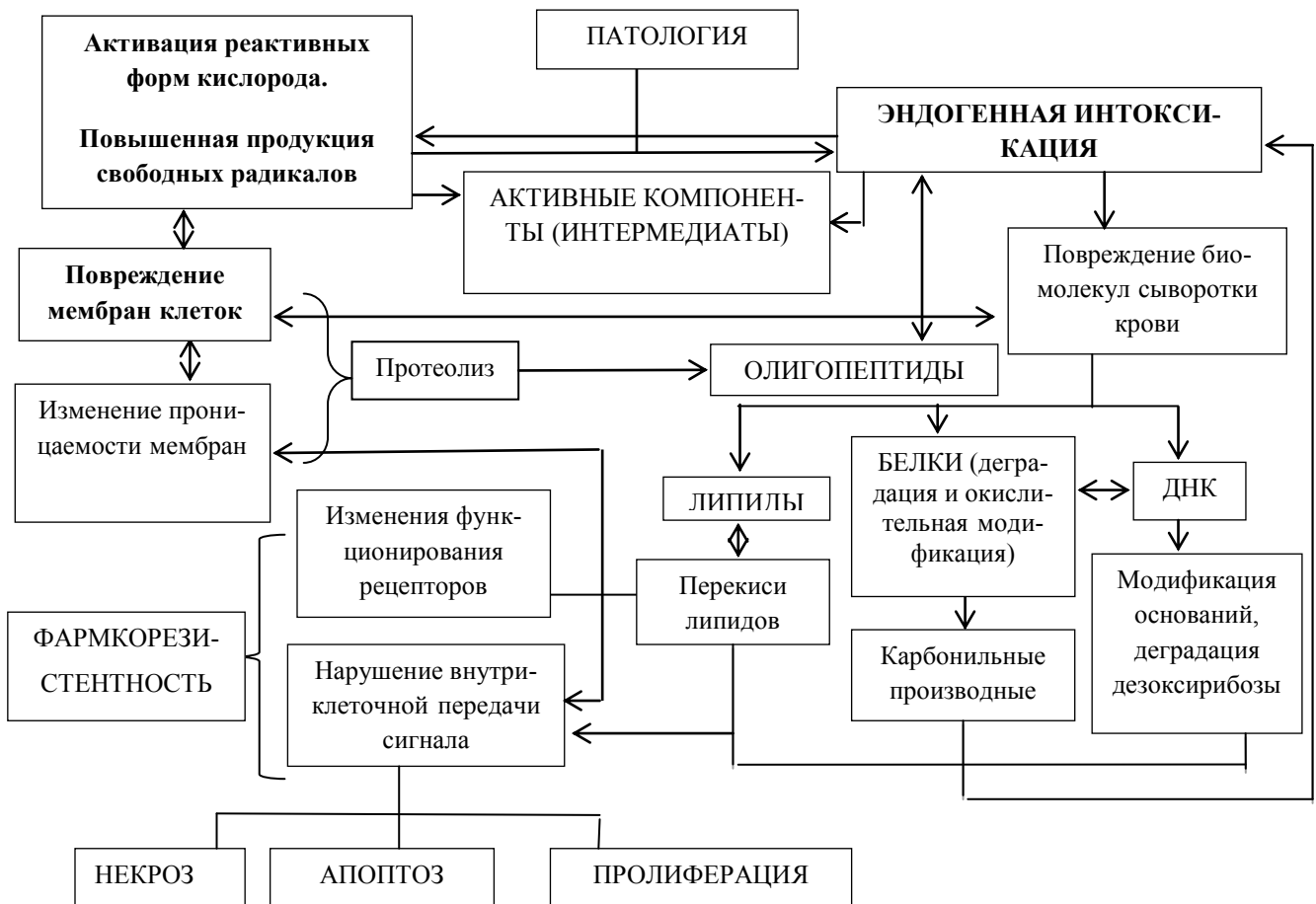


Рис.6. Основные пути взаимодействия эндогенной интоксикации и окислительных процессов при хронической альтерации кожи.

Сравнительный анализ изученных биохимических маркеров у пациентов с альтерацией кожи при различной восприимчивости к проводимой терапии.

На современном этапе развития медицинской науки и практики, несмотря на значительные достижения в совершенствовании методов диагностики и терапии, специалисты с тревогой отмечают наблюдающуюся тенденцию к неуклонному росту фармакорезистентных форм различных дерматозов. Для выяснения специфики метаболических сдвигов мы сравнили больных с обычным течением заболевания и пациентов с фармакорезистентностью к проводимой терапии (Таблица 4).

Таблица 4

Основные биохимические показатели ЭИ и прооксидантой системы при альтерации кожи в зависимости от восприимчивости к лечению.

	Показатель	Контроль	Чувствительны к лечению	Фармако резистентны
Сыворотка	∑МСМ усл.ед	12,80±0,38	16,15±1,11*	16,18±0,86*
	ОП (мг/л)	43,56±2,72	52,42±3,00*	48,39±2,74
	Мочевина (нмоль/л)	0,42±0,05	0,67±0,09*	0,92±0,10*
	ДК, нмоль/л	6,44±0,51	7,39±0,63	7,93±0,62
	МДА, нмоль/л	2,50±0,14	2,99±0,09*	3,07±0,11*
	ОШ, опт.ед.	0,14±0,01	0,3±0,037*	0,19±0,02* **
	∑ОМБ (ОЕ*/ мл сыв.)	14,48±1,50	25,02±0,82*	16,36±1,50**
Эритроциты	МСМ (усл.ед.)	17,00±1,71	20,92±1,54	20,25±1,14
	ОП (мг/л)	22,16±1,95	26,73±2,65	26,87±1,50
	Мочевина (нмоль/л)	0,87±0,09	0,56±0,07*	0,96±0,1**
	ДК, нмоль/л	3,25±0,20	5,49±0,44*	5,45±0,52*
	МДА, нмоль/л	5,34±0,31	10,86±1,60*	12,45±1,34*
	∑ОМБ (О.Е.)	0,156±0,02	0,187±0,01	0,132±0,015**

* – достоверность различий с контролем (p<0,05)

** – достоверность различий групп между собой (p<0,05).

Анализ полученных данных показал, что уровень МСМ сыворотки крови в обеих группах статистически значимо увеличен относительно контроля. Количество ОП сыворотки крови в группе пациентов, восприимчивых к терапии, статистически значимо превышало контрольные значения. Частота выявления их повышенного содержания в группе пациентов, чувствительных к лечению, составила 60%, тогда как в другой группе – только 34% .

Уровень мочевины в составе МСМ из сыворотки крови был достоверно повышен в обеих группах по сравнению с контрольными значениями, но в первой группе регистрировался в два раза реже, чем во второй, что свидетельствует об усиленном катаболизме белков в группе с фармакорезистентностью. Содержание мочевины в составе МСМ из эритроцитов в первой группе статистически значимо *снижено* по сравнению с контролем и второй группой. Группа пациентов, восприимчивых к терапии, характеризуется двукратным увеличением содержания оснований Шиффа относительно контроля и группы с лекарственной резистентностью.

Статистически значимо повышенный относительно контроля уровень окислительной модификации белка в сыворотке крови регистрировался в 65% случаев больных, восприимчивых к терапии, и в 30% - в фармакорезистентной группе. При этом между группами отмечается статистически значимое снижение ОМБ как в плазме, так и в эритроцитах у пациентов фармакорезистентной группы относительно больных восприимчивых к терапии.

Поскольку повышение уровня ОМБ в крови у больных кожной патологией значительно и регистрируется у подавляющего большинства пациентов, не исключено, что этот показатель может служить тестом глубины метаболических нарушений, а возможно и прогнозом тяжести и торпидности течения заболевания.

Мы установили, что высокой информативностью для оценки восприимчивости больных к терапии обладает коэффициент (K) = отношение количества МСМ к показателю окислительной модификации белка сыворотки крови. При $K < 0,5$ предполагается адекватная реакция организма больного на проводимую терапию, при значении $\geq 0,5$ – резистентность к применяемой терапии. По результатам клинико-лабораторного анализа 32 больных с обычным течением заболевания и хорошим эффектом после проведенной комплексной терапии значения предлагаемого коэффициента были меньше 0,4 у 62,5% обследованных, в группе больных с тяжелым, резистентным течением заболевания, состоящей из 36 больных, значения предлагаемого коэффициента были больше или равны 0,5 у 70% .

ВЫВОДЫ.

1. Эндогенная интоксикация (ЭИ) у больных тяжелыми хроническими дерматозами сопровождается активацией ПОЛ (по уровню первичных и ТБК- соединений) и снижением количества конечных продуктов (оснований Шиффа) в сы-

- воротке крови. На фоне ЭИ выявляется двукратное увеличение первичных продуктов ПОЛ в эритроцитах, при дальнейшем развитии свободнорадикальных процессов на мембранах не обнаруживается специфичности по отношению к ЭИ. Дисбаланс окислительного метаболизма у больных с ЭИ выражается увеличением уровня ТБК–продуктов пулов МСМ сыворотки и эритроцитов крови.
2. Выявлено накопление свободных жирных кислот в пуле МСМ сыворотки крови при ЭИ. Определено смещение баланса основных липидов системы крови в сторону легко окисляемых фракций, характеризующихся высоким содержанием ненасыщенных жирнокислотных остатков.
 3. Окислительная модификация белков в сыворотке и эритроцитах крови при ЭИ, сопровождающей тяжелые хронические дерматозы, манифестируется деструкцией протеинов, что проявляется накоплением в составе пула МСМ структурно измененных олигопептидов и мочевины.
 4. ЭИ у пациентов с альтерацией кожи характеризуется повышением уровня 8-ОН-2-дезоксигуанозина в сыворотке крови.
 5. Чувствительность пациента к проводимой терапии определяется статистически значимым увеличением уровня окислительной модификации белковых молекул системы крови, что объективно характеризуется количественным соотношением МСМ и общей окислительной модификации белков сыворотки крови.

Работы, опубликованные по теме диссертации.

Статьи в изданиях, рекомендованных ВАК:

1. Копытова Т.В. Комплексная оценка системы эндоинтоксикации и биотрансформации организма человека при патологии кожи / Копытова Т.В., Добротина Н.А., Анненкова А.Б., Абалихина Е.П., **Щелчкова Н.А.**// Вестник ННГУ (серия Биология). 2006. вып.1(11). С.133-138.
2. Копытова Т.В. Значение определения липидов в различных биологических субстратах для диагностики нарушений обменных процессов при псориазе/ Копытова Т.В., Абалихина Е.П., **Щелчкова Н.А.** //Клиническая лабораторная диагностика. 2007. №11. С.20-22.
3. **Щелчкова Н.А.** Значение липидов крови в характеристике степени эндогенной интоксикации при хронических дерматозах /**Щелчкова Н.А.**// Вестник ННГУ (серия Биология). 2010. №2., ч 2. С.602 – 606.
4. Добротина Н.А. Характеристика функционального состояния мембран эритроцитов при эндогенной интоксикации у больных хроническими распространенными дерматозами/Добротина Н.А, Копытова Т.В., **Щелчкова Н.А.** // Фундаментальные исследования. 2010. №2. С.39 – 44.

Статьи, тезисы докладов региональных и международных конференций:

1. Добротина Н.А. Функционально-диагностическое значение выявления эндогенной интоксикации при дерматозах, осложненных бактериальной инфекцией/ Добротина Н.А., Химкина Л.Н., Копытова Т.В., **Щелчкова Н.А.** //Материалы научной конференции, посвященной 85 –летию со дня рождения академика РАМН И.Н. Блохиной. – Н.Н.: Изд – во ННГУ. 2006. С.37.
2. Лобурев А.С. Модификационный метод подсчета количества веществ низкой и средней молекулярной массы биологических субстратов //Сборник научных работ /Лобурев А.С., Ведунова М.В, **Щелчкова Н.А.**// Естествознание и гуманизм (Современный мир, природа и человек) Т3.,№4. 2006. С. 27-28.
3. Копытова Т.В. Значение изучения активности протеолитической системы в оценке степени эндогенной интоксикации организма /Копытова Т.В., Добротина Н.А., Новиков В.В., **Щелчкова Н.А.**//Материалы VI Симпозиум «Химия протеолитических ферментов». 2007. г.Москва. С. 173-174.
4. Копытова Т.В. Роль липидов фракции средних молекул в характеристике эндогенной интоксикации при дерматозах/ Копытова Т. В., Добротина Н. А., **Щелчкова Н.А.** // Материалы IV съезда Российского общества биохимиков и молекулярных биологов" г. Новосибирск. 2008. С.128.
5. **Щелчкова Н.А.** Спектр липидов в составе веществ низкой и средней молекулярной массы для оценки эндотоксемии при тяжелых хронических дерматозов /Щелчкова Н.А. // Тезисы научных работ 14 – й Нижегородской сессии молодых ученых (естественнонаучные дисциплины). 2009г. С.233.
6. Копытова Т.В. Влияние цитостатиков и энтеросорбентов на уровень эндогенной интоксикации и проницаемость эритроцитарных мембран при псориазе/ Копытова Т.В., Химкина Л.Н., Пантелеева Г.А., **Щелчкова Н.А.**// Сборник научных трудов «Современные проблемы дерматовенерологии и косметологии». г.Харьков. 2009. С.117 – 120.
7. Копытова Т.В. Особенности фракции средних молекул у больных тяжелыми хроническими дерматозами/ Копытова Т.В., Добротина Н.А. **Щелчкова Н.А.**// Фундаментальные исследования. 2009. №5. С.29-31.
8. **Щелчкова Н.А.** Показатели окислительного стресса в оценке тяжести течения хронических дерматозов /**Щелчкова Н.А.**//Кислород и антиоксиданты. 2010. №2. С.103–104.
9. **Щелчкова Н.А.** Антиоксидантные свойства энтеросорбентов в лечении больных хроническими распространенными дерматозами с эндогенной интоксикацией./ **Щелчкова Н.А.**, Печуркина Ю.В.// Тезисы VIII Международной конференции «Биоантиоксидант». Москва. 2010. С.533.

Подана заявка на изобретение: Способ выявления фармакорезистентности у больных хроническими распространенными дерматозами. Химкина Л.Н., Ко-

Список сокращений

- АФК – активные формы кислорода
- ДК – диеновые конъюгаты
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- ЛФХ – лизофосфатидилхолин
- МГ – моноацилглицерины
- МДА – малоновый диальдегид
- МСМ – молекулы средней массы
- ОГЛ – общие ацилглицерины
- ОМБ – окислительная модификация белков
- ОП – олигопептиды
- ПОЛ – перекисное окисление липидов
- СЖК – свободные жирные кислоты
- СМ – сфингомиелин
- СРП - свободнорадикальные процессы
- ТБК – продукты реакции с тиобарбитуровой кислотой
- ФЛ – общие фосфолипиды
- ФХ – фосфатидилхолин
- ФЭА – фосфатидилэтаноламин
- ХС – общий холестерин
- ЭИ – эндогенная интоксикация