

УДК 616-07:061.62:616.5

**ОКИСЛИТЕЛЬНАЯ МОДИФИКАЦИЯ АЛЬБУМИНА СЫВОРОТКИ КРОВИ
ЧЕЛОВЕКА ПРИ ВОСПАЛИТЕЛЬНОМ ЗАБОЛЕВАНИИ КОЖИ**

© 2014 г.

*Т.В. Копытова,¹ Е.В. Коткова,^{1,2} Н.А. Добротина²*¹ Государственный научный центр дерматовенерологии и косметологии, Н. Новгород² Нижегородский госуниверситет им. Н.И. Лобачевского

ekotkova@mail.ru

Поступила в редакцию 25.02.2014

С целью изучения степени окислительной модификации альбумина сыворотки крови обследованы 32 пациента с воспалительным заболеванием кожи. Оценивалось количественное содержание модифицированного и эффективного сывороточного альбумина и его карбонильных производных. Найдено статистически значимое снижение концентрации эффективного альбумина и повышение уровня кетонных карбонильных (370 нм) группировок при спонтанной и индуцированной окислительной модификации белка у больных с воспалительным процессом кожи относительно контрольной группы. Выявлено, что к концу лечения системными ретиноидами уровень спонтанной окислительной модификации альбумина снижается, а количество эффективного альбумина повышается..

Ключевые слова: акне, окислительная модификация альбумина, альбумин, системные ретиноиды.

Введение

В настоящее время проблема воспалительных септических процессов кожи имеет большое значение в связи с увеличением количества торпидно протекающих и трудно излечимых форм [1]. По-видимому, это связано с изменением, в основном снижением, иммунологической и общей реактивности организма, обусловленной влиянием экологии, образом жизни, нарушениями в питании.

Глубокие поражения кожи сопровождающиеся септическими высыпаниями, такие как акне, чаще всего проявляются в пубертатном периоде, стихают к 30 годам, однако у отдельных больных, например при эндокринных дисфункциях у женщин, сохраняются после 30–40 лет [2]. Они причиняют различные страдания больным, в том числе и психические, так как сопровождаются формированием глубоких деформирующих рубцов, нарушением микробного пейзажа кожи, изменением обмена веществ в коже и подкожной клетчатке. При этом возможны скрытые иммунодефициты, нарушения в углеводном, белковом, эндокринном обмене и трофической функции нервной системы.

Использование системных ретиноидов показано как протокольная терапия при тяжелых формах акне, не поддающихся другим видам лечения. Системные ретиноиды (препараты акнекутан и роаккутан, действующее вещество изотретиноин, химический аналог витамина А) известны своей цитотоксичностью, тератогенными свойствами. В связи с этим, важен кон-

троль за состоянием как окислительных процессов в белках, так и, особенно, за функционированием молекулы альбумина как полифункционального белка и основного транспортера лекарственных средств в организме.

По данным литературы и исследованиям нашей клиники, различные нарушения белкового гомеостаза, в том числе и альбуминовой фракции, являются характерными для больных акне [3] и коррелируют с окислительными процессами в организме.

Полифункциональная роль альбумина в организме проявляется регулированием не только белкового, но и других гомеостазов. Этот белок участвует в поддержании внутрисосудистого коллоидно-осмотического давления, обладает конъюгирующими и инактивирующими свойствами, выполняет гомеостатическую, детоксицирующую, ферментоподобную, антиоксидантную, хемокинетическую функции [4–6]. Нарушение функций альбумина ведет к накоплению токсичных компонентов. Регуляция этих процессов осуществляется не только за счет количественного содержания альбуминов, но и их конформации, модификации, то есть функциональной характеристики.

В постгеномную эру особое значение уделяется геномике, однако протеомика не должна уходить на второй план. В работе исследуются качественные и количественные изменения протеиновых систем на примере альбумина сыворотки крови человека.

Данных о влиянии системных ретиноидов на функционирование альбумина в доступной литературе нами не найдено.

Цель настоящей работы – изучение степени окислительной модификации альбумина сыворотки крови при воспалительном процессе кожи в динамике его лечения системными ретиноидами.

Материалы и методы

Обследованы 32 пациента с тяжелыми формами воспалительного процесса кожи (акне), средний возраст составил 21.3 ± 3.7 года.

В лечении больных использовались системные ретиноиды: у 22 пациентов – акнекутан, у 10 – роаккутан. Контрольную группу составили 20 практически здоровых лиц без признаков кожной патологии. Были проведены 3 обследования пациентов: первое – до лечения системными ретиноидами, второе – через 1 месяц, третье – через 2 месяца терапии.

Во время каждого обследования в сыворотке крови больных определяли перечисленные ниже параметры.

- Количество модифицированного и эффективного сывороточного альбумина по методу Кожевникова [7]. Метод основан на способности сывороточного альбумина, находящегося в растворе, содержащем мочевины, образовывать с ней комплексы. Степень деспирализации альбумина прямо пропорциональна количеству мочевины в сывороточном гидролизате. Гидролизат нормальной сыворотки крови мочевины содержать не должен.

Эффективная концентрация альбумина (ЭКА) рассчитывается по формуле

$$\text{ЭКА} = \text{ОКА} - \text{МА},$$

где ОКА – общая концентрация альбумина (г/л); МА – концентрация модифицированного альбумина,

$$\text{МА (г/л)} = 45.3 C_m / \text{ОКА},$$

где C_m – концентрация мочевины в гидролизате, 45.3 – расчетный коэффициент.

- Степень спонтанной и индуцированной (металл-катализируемой) окислительной модификации альбумина (ОМА) по уровню карбонильных производных на основе метода Е.Е. Дубининой [8]. Данный метод позволяет оценить окислительный потенциал организма при оценке спонтанного окисления белка и его резервно-адаптационные возможности [9] при индуцированном окислении.

Метод основан на том, что конечные продукты свободнорадикального окисления белков могут количественно реагировать с 2,4-динитрофенилгидразином с образованием альдегидных и кетонных группировок. Оптическая плотность образовавшихся альдегид- и кетон-динитрофенилгидразонов регистрируется при 270 нм (альдегидные производные нейтрально-

го характера, АДНФГ НХ), 430 нм (альдегидные производные основного характера, АДНФГ ОХ), 370 нм (кетонные производные нейтрального характера, КДНФГ НХ), 530 нм (кетонные производные основного характера, КДНФГ ОХ).

Металл-катализируемая ОМА определяется после инкубации исследуемого образца в среде Фентона, содержащей $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$.

Альбумин выделяли из сыворотки крови 3.0%-ным этанольным раствором (96°) трихлоруксусной кислоты, так как в этих условиях он не подвергается осаждению, оставаясь в подкисленном спиртовом растворе. Для проверки чистоты выделенной фракции был проведен электрофорез на плёнке из ацетатцеллюлозы. Показано, что белок представлял собой чистую фракцию альбумина.

Полученные данные статистически обработаны с помощью компьютерной программы *Microsoft Office Excel 2010* и представлены в виде средних арифметических значений ($M \pm m$). Оценку значимости отличий между сравниваемыми группами проводили по критерию Стьюдента. Различия считались достоверными при $p < 0.05$.

Результаты и их обсуждение

В последние годы внимание исследователей обращено на изучение изменений свойств отдельных белков, участвующих в развитии патологических процессов. К таким белкам, легко подвергающимся модификациям, относится альбумин.

Концентрация альбумина в сыворотке крови является важным клинико-лабораторным показателем. Однако нормальное содержание альбумина еще не означает его функциональной полноценности. Уже несколько десятилетий назад было замечено, что при некоторых заболеваниях сорбционные и другие физико-химические свойства альбумина изменяются – происходит нарушение нативной конформации молекулы, снижается отрицательный электрический заряд. Такой альбумин был назван модифицированным [10].

В норме эффективная концентрация альбумина совпадает с общей концентрацией альбумина. При патологии эта величина существенно снижается из-за появления модифицированного альбумина, даже в тех случаях, когда общее количество данного белка находится в пределах нормы [11].

У больных акне до лечения концентрация эффективного альбумина достоверно снижена относительно контрольной группы. В динамике лечения системными ретиноидами происходит нормализация показателя. При этом различия между препаратами проявились более медленным восстановлением нормальных значений у

Таблица

Динамика показателей концентрации эффективного альбумина, г/л ($M \pm m$)

Группа контроля ($n = 20$)	До лечения ($n = 32$)	Акнекутан		Роаккутан	
		через 30 дней	через 60 дней	через 30 дней	через 60 дней
44.5±0.86	40.2±1.08*	39.14±0.83*	43.29±0.8	45.83±1.75	46.08±1.1

* Статистически значимые различия с контрольной группой ($p < 0.05$).

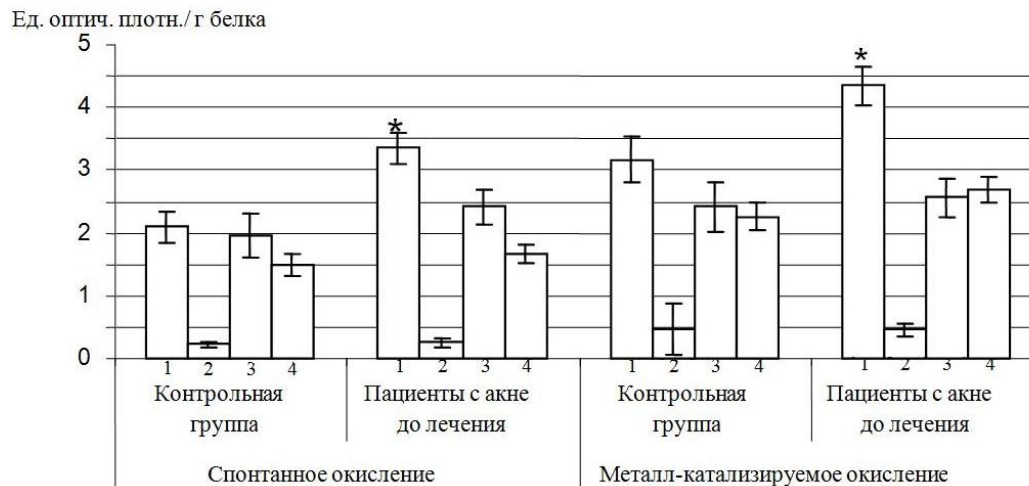


Рис. 1. Уровень карбонильных производных при окислительной модификации альбумина в сыворотке крови контрольной группы и пациентов с акне. * Статистически значимые различия с контрольной группой ($p < 0.05$); 1 – КДФНГ НХ; 2 – КДФНГ ОХ; 3 – АДФНГ НХ; 4 – АДФНГ ОХ

больных, получавших лечение акнекутаном (таблица).

Кроме функционального состояния молекулы альбумина, были изучены показатели его окислительной модификации.

При анализе продуктов окислительной модификации альбумина у больных акне до лечения были выявлены статистически значимые изменения концентрации продуктов окисления альбумина относительно контрольной группы.

Наиболее информативными в нашем исследовании оказались длины волн 270 и 370 нм как при спонтанном, так и металл-катализируемом окислении (МКО).

Уровень спонтанно-окисленных кетонных группировок нейтрального характера выше в 1.6 раза относительно контроля, содержание альдегидных групп – в 1.2 раза (рис. 1). При металл-катализируемом окислении уровень кетонных группировок относительно здоровых доноров выше в 1.4 раза, а уровень альдегидных группировок практически не отличается. Таким образом, при окислительной модификации альбумина образуются преимущественно высоко-токсичные кетонные продукты.

Результаты наших исследований подтверждаются данными В.В. Казакова, Н.М. Ёлкина, которые показали, что содержание карбонильных производных гемоглобина зависит от уровня экспозиции белка со средой Фентона (модель окислительного стресса) [12]. Оказалось, что в

этих условиях наиболее высокий уровень корреляции выявляется для альдегидов и кетонов нейтрального характера.

Важно отметить, что в нашем исследовании продукты МКО имеют показатели выше, чем при спонтанном окислении. Это связано с механизмом МКО, так как в результате металл-индуцированного окисления наиболее активно повреждаются белки.

На 2-м обследовании пациентов через 1 месяц лечения акнекутаном и роаккутаном происходит повышение уровня карбонильных производных при спонтанном окислении, но на 3-м обследовании отмечается снижение показателей до уровня контрольной группы (рис. 2, 3). Очевидно, в начале лечения молекула альбумина подвергается модификациям и происходит снижение ее функциональной активности. В динамике лечения наблюдается постепенная нормализация этих показателей.

Статистически значимое повышение изучаемых показателей в процессе лечения пациентов, а также сравнение с данными до лечения показывают, что изотретиноин при лечении больных воздействует на молекулу альбумина.

Показатели индуцированной ОМА практически не изменяются и в процессе лечения остаются статистически достоверно выше относительно контроля. Дисбаланс между уровнем кетонных группировок, образующихся при спонтанном и индуцированном окислении белков,

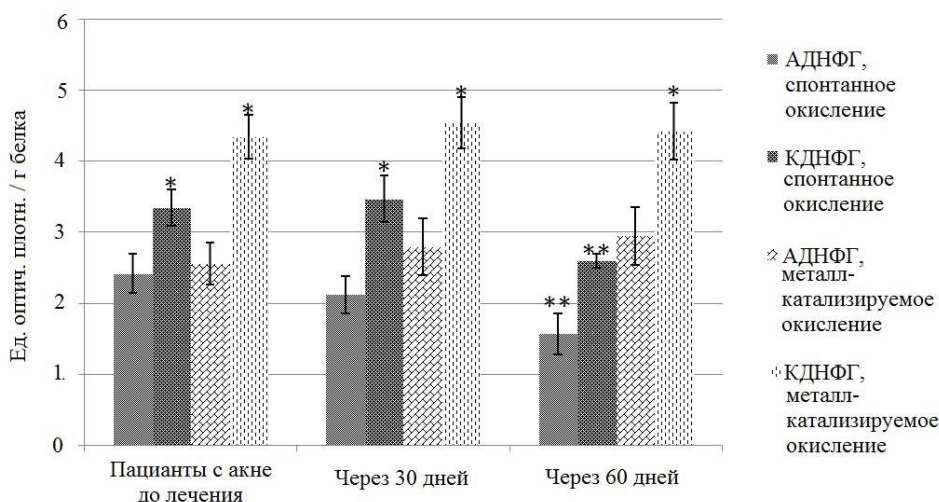


Рис. 2. Уровень карбонильных производных в динамике лечения акнекутаном.

* Статистически значимые различия с контрольной группой ($p < 0.05$);

** статистически значимые различия с показателями до лечения ($p < 0.05$)

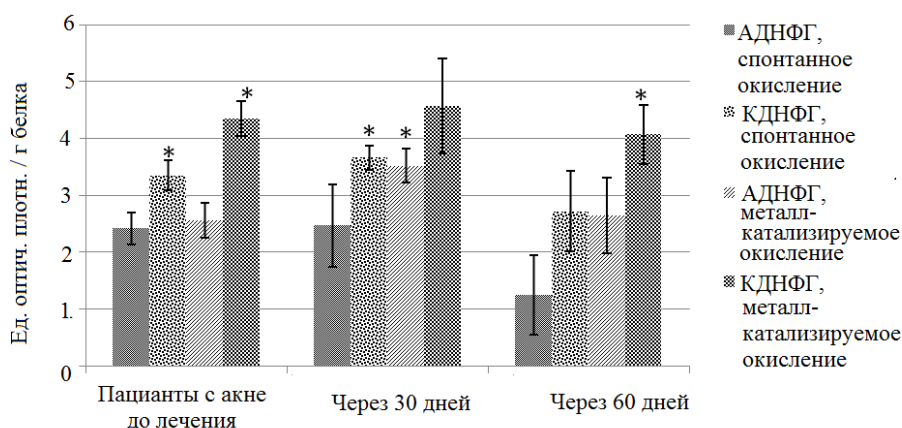


Рис. 3. Уровень карбонильных производных в динамике лечения роаккутаном.

* Статистически значимые различия с контрольной группой ($p < 0.05$)

считается показателем резервно-адаптационного потенциала в организме и отражает нарушения белкового метаболизма.

Таким образом, качественные и количественные характеристики ОМА можно рассматривать как информативные показатели при оценке эффекта влияния системных ретиноидов на организм пациента.

Выводы

Установлено, что концентрация эффективного альбумина у больных до начала лечения статистически значимо снижена относительно контрольной группы, что свидетельствует о качественных изменениях в альбуминовой фракции.

Обнаружено статистически значимое повышение уровня кетонных (370 нм) группировок при спонтанной и индуцированной окислительной модификации альбумина у больных с воспалительным процессом кожи (акне) относительно контрольной группы, что отражает

влияние окислительного стресса при данном заболевании.

Выявлено, что к концу лечения больных акне системными ретиноидами снижается уровень спонтанной окислительной модификации альбумина, а количество эффективного альбумина повышается.

Список литературы

1. Корчевая Т.А. Изотретиноин (роаккутан) в лечении угревой сыпи // Клиническая дерматол. и венерол. 2003. № 1. С. 42–44.
2. Кунгуров Н.В., Кохан М.М., Шабардина О.В. Опыт терапии больных среднетяжелыми и тяжелыми акне препаратом изотретиноин // Вестник дерматол. и венерол. 2013. № 1. С. 56–62.
3. Биткина О.А. Научное обоснование применения медицинской озono-кислородной смеси для лечения розовых и вульгарных угрей на основе динамики показателей перекисного окисления липидов, антиоксидантной защиты и окислительной модификации протеинов. Автореферат дис. ... д-ра мед. наук. М.: Московская мед. академия, 2010. 49 с.

4. Добротина Н.А., Ежова Г.П., Бабаев А.А., Новиков В.В. Белки. Н. Новгород: Изд-во ННГУ, 2002. 50 с.
5. Федоровский Н.М. Физико-химические свойства и функции альбумина // Биохимия. 2004. Т. 70. № 3. С. 65–68.
6. Peters T.J. All about Albumin: Biochemistry, Genetics and Medical Applications. SanDiego: Academic Press, 1996. 432 p.
7. Кожевников А.Д., Лешенкова Е.В., Сазонец Г.И. Способ обнаружения и метод количественного определения модифицированного или денатурированного сывороточного альбумина человека // Клиническая лаб. диагностика. 2004. № 2. С. 39–42.
8. Дубинина Е.Е., Бурмистров С.О., Ходов Д.А., Портов И.Г. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод ее определения // Вопр. мед. химии. 1995. Т. 41. № 1. С. 24–26.
9. Губский Ю.И., Беленичев И.Ф. Токсикологические последствия окислительной модификации белков при различных патологических состояниях // Совр. пробл. токсикол. 2005. № 3. С. 20–26.
10. Зубина И.М. Физико-химические свойства альбумина и его функциональная полноценность при хроническом гломерулонефрите. Автореферат дис. ... канд. биол. наук. СПб.: Всерос. центр экстрен. и радиац. медицины МЧС России, 2001. 21 с.
11. Назарова О.А. Эффективная концентрация альбумина – критерий эндогенной интоксикации при бронхиальной астме у детей // Матер. межрегиональной науч.-практ. конф. молодых ученых «Новые технологии в биологии и медицине», Воронеж, 2004. С. 159–160.
12. Казакова В.В., Ёлкина Н.М. Окислительная модификация и изменения внутримолекулярной гидрофобности гемоглобина А при инкубации эритроцитов человека в среде Фентона // Укр. біохім. журн. 2007. Т. 79. № 4. С. 34–38.

OXIDATIVE MODIFICATION OF HUMAN SERUM ALBUMIN IN INFLAMMATORY SKIN DISEASES

T.V. Kopytova, E.V. Kotkova, N.A. Dobrotina

32 patients with inflammatory skin diseases have been examined to study the degree of oxidative modification of serum albumin. The quantitative content of modified and effective serum albumin and its carbonyl derivatives were evaluated. We have found out a statistically significant decrease in the effective albumin concentration and an increase in the level of ketone carbonyl groups (370 nm) during spontaneous and induced oxidative modifications of protein in patients with inflammatory skin processes relative to the control group. It has been revealed that by the end of treatment with systemic retinoids the level of spontaneous oxidative modification of albumin decreases and the content of effective albumin increases.

Keywords: acne, oxidative modification of albumin, albumin, systemic retinoids.

References

1. Korchevaya T.A. Izotretinoin (roakkutan) v lechenii ugrevoy sypi // Klinicheskaya dermatol. i venerol. 2003. № 1. S. 42–44.
2. Kungurov N.V., Kohan M.M., Shabardina O.V. Opyt terapii bol'nyh srednetyazhelymi i tyazhelymi akne preparatom izotretinoin // Vestnik dermatol. i venerol. 2013. № 1. S. 56–62.
3. Bitkina O.A. Nauchnoe obosnovanie primeneniya medicinskoj ozono-kislorodnoj smesi dlya lecheniya rozovyh i vul'garyh ugrej na osnove dinamiki pokazatelej perekisnogo okisleniya lipidov, antioksidantnoj zashchity i okislitel'noj modifikacii proteinov. Avtoreferat dis. ... d-ra med. nauk. M.: Moskovskaya med. akademiya, 2010. 49 s.
4. Dobrotina N.A., Ezhova G.P., Babaev A.A., Novikov V.V. Belki. N. Novgorod: Izd-vo NNGU, 2002. 50 s.
5. Fedorovskij N.M. Fiziko-himicheskie svojstva i funkcii al'bumina // Biohimija. 2004. T. 70. № 3. S. 65–68.
6. Peters T.J. All about Albumin: Biochemistry, Genetics and Medical Applications. SanDiego: Academic Press, 1996. 432 p.
7. Kozhevnikov A.D., Leshenkova E.V., Sazonec G.I. Sposob obnaruzheniya i metod kolichestvennogo opredeleniya modifitsirovannogo ili denaturirovannogo syvorotochnogo al'bumina cheloveka // Klinicheskaya lab. diagnostika. 2004. № 2. S. 39–42.
8. Dubinina E.E., Burmistrov S.O., Hodov D.A., Portov I.G. Okislitel'naya modifikaciya belkov syvorotki krovi cheloveka, metod ee opredeleniya // Voпр. med. himii. 1995. T. 41. № 1. S. 24–26.
9. Gubskij Yu.I., Belenichev I.F. Toksikologicheskie posledstviya okislitel'noj modifikacii belkov pri razlichnyh patologicheskikh sostoyaniyah // Sovr. probl. toksikol. 2005. № 3. S. 20–26.
10. Zubina I.M. Fiziko-himicheskie svojstva al'bumina i ego funkcional'naya polnocennost' pri hronicheskom glomerulonefrite. Avtoreferat dis. ... kand. biol. nauk. SPb.: Vseros. centr ehkstre. i radiac. mediciny MCHS Rossii, 2001. 21 s.
11. Nazarova O.A. Ehhfektivnaya koncentraciya al'bumina – kriterij ehndogennoj intoksikacii pri bronhial'noj astme u detej // Mater. mezhregional'noj nauch.-prakt. konf. molodyh uchenyh «Novye tekhnologii v biologii i medicine», Voronezh, 2004. S. 159–160.
12. Kazakova V.V., Yolkina N.M. Okislitel'naya modifikaciya i izmeneniya vntrimolekulyarnoj gidrofobnosti gemoglobina A pri inkubacii ehritroцитов cheloveka v srede Fentona // Ukr. biohim. zhurn. 2007. T. 79. № 4. S. 34–38.