

ОКИСЛЮВАЛЬНИЙ ГОМЕОСТАЗ ХВОРИХ НА СИСТЕМНІ ДЕРМАТОЗИ: КЛІНІКО-МОРФОЛОГІЧНА ОЦІНКА ЕФЕКТИВНОСТІ ЙОГО КОРЕКЦІЇ

Черкашина Л.В.^{1,3}, Піунов В.Т.², Біловол А.М.³

¹ Харківська медична академія післядипломної освіти МОЗ України

² Військово - медичний клінічний центр Північного регіону МО України

³ Харківський національний медичний університет МОЗ України

Існуючі методи оцінки ефективності комплексного лікування хворих на системні дерматози базуються на урахуванні стану ураженої шкіри, зокрема регресу морфологічних висипів. Розглядаючи хронічні дерматози як процес ураження сполучної тканини з переважним ураженням шкіри, останнім часом для оцінки ефективності лікування застосовують дані щодо імунного статусу хворих, стану перекисного окислення ліпідів (ПОЛ), активності колагеноутворення та деякі інші. Сучаною та такою, що інтегративно об'єднує попередні здобутки у вивченні патогенетичних механізмів псоріазу розглядається теорія вільнорадикального окислення (ВРО), як первісного механізму формування патологічного процесу (активація проліферативних процесів у епідермальному прошарку дерми) і його клінічної маніфестації. Водночас, з оглядом на системність ВРО, недостатньо вивченими залишаються взаємозв'язки між станом ПОЛ мембран клітин, окисною модифікацією білків (ОМБ) та нуклеїнових кислот, роль біоенергетичного стану та варіантів функціональних і метаболічних реакцій системи про-антиоксидантного захисту (АОЗ) на етапах лікування хворих на псоріаз.

Мета дослідження

Визначення індикаторів для оцінки клінічної, патогенетичної та метаболічної ефективності комплексного лікування хворих на системні дерматози із застосуванням антиоксидантних засобів (на прикладі псоріазу).

Методи дослідження

Оцінку клінічної ефективності патогенетичної корекції стану АОС виконано із застосуванням методів системного ана-

лізу шляхом порівняльного аналізу змін структурно-функціонального стану системи антиоксидантного захисту хворих на псоріаз під впливом антиоксидантної терапії. Ця багатокомпонентність потребувала виконання узагальненої характеристики ефективності патогенетичної корекції стану про-, антиоксидантної системи хворих на псоріаз з визначенням властивих для антиоксидантних засобів метаболічних ефектів, мішені антиоксидантної терапії та її впливу на стан АОС. Окрім того, вивчення клініко-морфологічної ефективності антиоксидантної терапії хворих на псоріаз виконано за методикою клінічного моніторингу з побудовою морфохронограм стадій процесу.

У системі клініко-біохімічного обстеження хворих на псоріаз до- та після комплексного лікування, окрім загальноклінічних методів лабораторної діагностики, виконано систематизоване дослідження стану окисно-відновних процесів на рівні трьох базових підсистем: ОМБ та НК, біоенергетики, ферментативного ланцюга та ПОЛ і NO-залежних метаболітів про-, антиоксидантного захисту. Стан ферментативного ланцюга АОС у 110 хворих на псоріаз та 20 осіб контрольної групи визначали за показниками вмісту супероксиддесмутази (СОД), глутатіонпероксидази (ГПР), каталази (Кат) у еритроцитах та α -токоферолу ацетату (α -ТФА) у сироватці крові хворих. Вміст СОД визначалася неферментним методом [1, 2], який заснований на здатності СОД інгібувати відновлення нітросинього тетразолу (NBT) в присутності NAD-H₂ та феназинметасульфату [3, 4]. Вміст каталази визначався спектрофотометрично [5, 6]. Визначення вмісту ендogenous α -ТФА виконано спектрофотометрично [7] при $\lambda=540$ нм. Вміст малонового діальдегіду (МДА), як індикатора ВРО в плазмі виз-

начено за методом Стальної І.Д. та Гаришвілі М.С. [8, 9]. Вміст дієнових кон'югатів (ДК) в плазмі; принцип методу [10, 11] полягає в екстрагуванні ДК сумішшю гептану та ізопропілового спирту і визначення їх вмісту у гептановій фазі (суміш сироватки крові гептаном гомогенізували у пристрої Поттера-Елвегейма) Після розшарування фаз відбирали гептанову фракцію та визначали оптичну щільність на спектрофотометрі «Perkin Elmelzambda – 20» при $\lambda=232$ нм. Вміст NO-залежних метаболітів (NOMET) в плазмі визначено за методикою Грисса [12, 13].

Дослідження закономірностей окисної модифікації білків та нуклеїнових кислот у хворих на псоріаз виконано до та після лікування за показниками вмісту білкових компонентів у сироватці крові – 2,4-динітрофенілгідрозонів (ДНФГ) та альдегідних і карбонільних продуктів окисної модифікації у спонтанних та індукованих залізом реакціях. Оцінка ОМБ базується на реакції взаємодії окислених амінокислотних останків з 2,4-динітрофенілгідразинном і утворенні ДФНГ [14]. При цьому для оцінки ступеня окисної деструкції визначали (залежно від довжини хвилі спектрофотометра) дрібні ($\lambda=254$ нм) ОМБ, виявлені в індукованих реакціях (ІД), середні ($\lambda=270$ нм) ОМБ, виявлені в індукованих реакціях (ІС), крупні ($\lambda=280$ нм) ОМБ, виявлені в індукованих реакціях (ІК) та аналогічні показники у спонтанних реакціях (СК, СС, СД). Для оцінки ступеня дефрагментації окислених білків плазми використовували надпадову рідину, в якій спектрофотометрично виявляли пептиди при визначених довжинах хвиль [15, 16].

Індуковану ОМБ забезпечено шляхом використання середовища Фентона (0,1М фосфатний буфер, рН=7,4, який містить один ммоль FeSO_4 та 40,3 ммоль H_2O_2) з подальшою процедурою підготовки та спектрофотометрії надпадової рідини [17]. Рівень вмісту окисно модифікованих нуклеїнових кислоти (НК) оцінювали за їх екскреторним (у сечі) індикатором – за вмістом 8-гідроксигуаніну у добовій сечі методом хроматографії на пластинках Силуфолф [18, 19].

Оцінку активності аеробного та анаеробного окислення виконано шляхом виз-

начення вмісту малату (М), пірувату (П), лактату (Л) у еритроцитах [20]. Рівень вмісту аденолових нуклеотидів визначали хроматографічним методом в системі діоксан-ізопропанол-вода-аміак (4:2:4:1), а ідентифікацію аденозиндифосфорної (АДФ), аденозинмонофосфорної (АМФ) та аденозинтрифосфорної (АТФ) кислот виконано в УФ-зоні на «УФС – 365» при $\lambda=260$ нм [21].

Результати та їх обговорення

Зважаючи на багафакторний характер антиоксидантного фармакотерапевтичного впливу ефективність комплексного лікування хворих на псоріаз із застосуванням препарату «Тіотриазолін» досліджена на рівні ферментативного ланцюга АОЗ та обміну NO-залежних і ПОЛ метаболітів, активності окисної модифікації нуклеїнових кислот та білків, а також за результатами оцінки впливу патогенетичної корекції біоенергетичного стану клітин і гліколізу.

Антиоксидантний ефект на рівні ферментативного ланцюга АОЗ характеризується достовірною ($p<0,001$) зміною активності СОД, Кат, ГПР, а також рівня вмісту ендogenous α -ТФА. Найбільш виразний фармакотерапевтичний ефект ($p<0,001$) досягнуто за рахунок зростання активності каталази (з $(6,171\pm 0,035)$ до $(12,63\pm 0,246)$ у.о./хв), що забезпечило найбільшу (перше рангове місце) клінічну інформативність метаболічних змін, яка складає $(0,672\pm 0,031)$ біт та найбільш значимий внесок у загальну структуру АОЕ лікування – $(15,4\pm 0,6)\%$. Друге рангове місце за виразністю фармакотерапевтичного впливу ($p<0,001$) належить ендogenous α -ТФА, вміст якого зріс з $(1,060\pm 0,007)$ до $(2,050\pm 0,023)$ мкмоль/л. Антиоксидантний ефект (АОЕ) на рівні метаболічних процесів, пов'язаних з пероксидацією фосфоліпідів мембран клітин характеризується достовірною ($p<0,05$) зміною вмісту NO-залежних метаболітів, проміжних та кінцевих продуктів ПОЛ. АОЕ на рівні підсистеми ОМБ та нуклеїнових кислот досліджено у спонтанних та індукованих реакціях, що дозволило визначитись стосовно метаболічних резервів ОМБ у хворих на псоріаз. Спонтанна ОМБ під впливом лікування характеризується достовірними ($p<0,001$) змінами у

накопиченні як альдегідних так і карбонільних продуктів, а також у зміні ступеня (глибини) деструкції білків. Найбільш виразним у системі показників сОМБ є зменшення вмісту ($p < 0,001$) альдегідних продуктів з $(82,12 \pm 0,35)$ у.о./мг білка до $(66,67 \pm 0,77)$ у.о./мг білка, що пояснюється зменшенням загальної кількості спонтанно ОМБ з $(2,219 \pm 0,011)$ у.о./мг білка до $(1,990 \pm 0,013)$ у.о./мг білка та глибини окисної модифікації переважно за рахунок зменшення білкових фрагментів крупного розміру. Питома вага вкладу кожного із досліджених метаболічних показників до загального антиоксидантного ефекту коливається у межах $(0,841,5)\%$. ОМБ у індукованих реакціях також характеризується достовірними ($p < 0,05$) змінами у накопиченні як альдегідних так і карбонільних продуктів та у зміні ступеня (глибини) деструкції білків. Загальна кількість іОМБ під впливом лікування достовірно ($p < 0,05$) зменшилась з $(2,913 \pm 0,011)$ у.о./мг білка до $(2,504 \pm 0,018)$ у.о./мг білка, що свідчить про зменшення резервів спонтанної модифікації білків.

Виявлено, що в індукованих реакціях ОМБ зменшення ступеня деструкції білка відбувається за рахунок білкових фрагментів середнього розміру (з $(0,396 \pm 0,003)$ у.о./мг білка до $(0,303 \pm 0,007)$ у.о./мг білка) та достовірного збільшення питомої ваги фрагментів малого розміру, що є найбільш інформативною ознакою впливу АО терапії на метаболічні резерви окисної модифікації білків у хворих на псоріаз. Метаболічні показники індукованої реакції ОМБ характеризуються низькою питомою вагою в загальній ефективності антиоксидантного впливу, яка коливається у межах $(1,041,5)\%$. Вміст окисно модифікованих нуклеїнових кислот, оцінюваний за показником екскреції 8-гідроксигуаніну з сечею хворих під впливом застосованого антиоксидантного засобу достовірно ($p < 0,001$) зменшився з $(0,542 \pm 0,005)$ нмоль/л до $(0,224 \pm 0,012)$ нмоль/л. Наведене свідчить про зменшення проявів окисної модифікації та деструкції білків при одночасному зменшенні «резервів» цього процесу під впливом застосованої антиоксидантної терапії.

З'ясовано, що найбільш змінюваним під впливом антиоксидантної терапії по-

казником біоенергетичного забезпечення ОВП у хворих на псоріаз є рівень вмісту малату, який до початку лікування становив $(0,226 \pm 0,002)$ мкмоль/г (Hb), після – $(0,185 \pm 0,003)$ мкмоль/г (Hb), що характеризується достатньо високим індексом клінічної ефективності $(1,91 \pm 0,03)$; питомий вклад цього метаболічного фактора у загальний показник АОЕ становить $(10,6 \pm 0,3)\%$. Водночас, слід зазначити, що зниження окислювальної активності у циклі Кребса під впливом антиоксидантної терапії синхронізується з покращенням анаеробного окислення, що на рівні біохімічних механізмів забезпечення гліколізу проявляється достовірним ($p < 0,001$) зростанням вмісту пірувату та достовірним ($p < 0,001$) зменшенням вмісту лактату.

Отримані на етапах аналізу стандартизовані дані щодо клінічної інформативності окремих метаболічних ефектів антиоксидантної терапії хворих на псоріаз дозволили покомпонентно узагальнити закономірності впливу лікування та окремі метаболічні ефекти і опрацювати стандартизований профіль антиоксидантного впливу: (наведені у ранговій послідовності): зростання активності каталази, вмісту ендogenous α -ТФА та малату, які можна розглядати у якості клініко-метаболічних індикаторів ефективного (патогенетично - адекватного) впливу на ферментативний ланцюг АОЗ, механізми гліколізу та біоенергетичне забезпечення метаболізму клітин.

Враховуючи визначені за результатами дослідження метаболічні ефекти та їх вклад у загальний показник ефективності антиоксидантної терапії хворих на псоріаз, нами визначена компонентна структура ефективності клінічного застосування препарату «Тіотриазолін» та мішень антиоксидантного впливу цього препарату серед хворих на псоріаз. Ефективність антиоксидантної терапії на 47,3% визначається впливом на функціональний станом ферментативного ланцюга АОЗ, на 36,6% - на процеси гліколізу та біоенергетичного забезпечення клітинного метаболізму та лише на 14,8% - на покращення (нормалізацію) процесів ОМБ і нуклеїнових кислот. Ці закономірності формування фармакотерапевтичного впливу

можуть бути враховані при індивідуалізації антиоксидантної терапії у хворих на псоріаз з різними клінічними варіантами функціональної та метаболічної компенсації.

За результатами клініко-морфологічного моніторингу 26 хворих (вік – $(37,4 \pm 3,4)$ р., давність хвороби – $(11,0 \pm 1,5)$ р.; PASI= $(15,6 \pm 0,7)$ од.) у стаціонарній стадії псоріатичного процесу з'ясовано, що із використаних у морфохронограмі клінічного моніторингу хворих у стаціонарній стадії псоріазу чотири індикатори (наявність та активність утворення лусочок, виразність еритеми, інфільтрація шкіри) достовірно ($p < 0,05$) зменшуються на п'яту та 15 добу лікування, сягаючи рівня статистичної похибки на 20 добу. На тлі цих процесів, мали місце патогномонічні прояви затухання псоріатичного осередку («ободки» Воронова з максимальною частотою на 10 добу, зменшення свербіжу та поодиноких свіжих висипних елементів). Уцілому, максимальна клініко-морфологічна ефективність лікування у стаціонарній стадії псоріазу досягнута у всіх хворих на момент вибуття зі стаціонару; середня тривалість лікування (перебування у стаціонарі) склала – $(19,9 \pm 0,8)$ діб. За результатами клініко-морфологічного моніторингу 84 хворих (вік – $(38,7 \pm 1,7)$ р., давність хвороби – $(16,5 \pm 1,7)$ р.; PASI= $(18,4 \pm 0,3)$ од.) у прогресуючій стадії псоріатичного процесу з'ясовано, що із використаних у морфохронограмі клінічного моніторингу хворих у прогресуючій стадії псоріазу чотири базові індикатори (наявність та активність лускоутворення, виразність еритеми, інфільтрація шкіри) достовірно ($p < 0,05$) зменшуються у кожному із наступних періодів моніторингу та сягають мінімальних значень частоти на 20 добу лікування (окрім ознаки – «черепицеподібне накопичення лусочок», яка зареєстрована у $(10,7 \pm 3,4)\%$ хворих у вигляді незначної кількості осередків), сягаючи рівня статистичної похибки на момент вибуття зі стаціонару.

На тлі цих процесів, мали місце патогномонічні прояви динамічних змін морфологічної картини псоріатичного осередку: прояви свіжих висипів (зареєстровані на 10 добу лікування у $(10,7 \pm 3,4)\%$ хворих) «ободки» Воронова з максимальною

частотою у $(85,7 \pm 3,8)\%$ на 20 добу, зменшення частоти скарг на свербіж лише до 15 доби). Клініко-морфологічна ефективність лікування у прогресуючій стадії псоріазу досягнута у всіх хворих на момент вибуття зі стаціонару; середня тривалість лікування склала – $(24,6 \pm 0,5)$ діб. При цьому, у $(7,1 \pm 2,8)\%$ хворих на момент вибуття зі стаціонару залишались виразні ознаки подальшого регресу елементів висипів.

Висновки

1. Клінічна ефективність патогенетичної корекції метаболічних порушень із застосуванням антиоксидантної терапії характеризується зростанням кількості ($p < 0,05$) та виразності функціональних взаємозв'язків між метаболічними компонентами, які визначають стан АОС за рахунок збільшення їх загальної кількості та питомої ваги взаємозв'язків середньої сили; уцілому поліпшилась структурно-функціональна організація підсистеми ферментативного забезпечення АОЗ.

2. У системі клініко-морфологічного моніторингу, за єдиною програмою виконано статистичний аналіз ефективності антиоксидантної терапії хворих зі стаціонарною та хворих з прогресуючою стадією псоріазу. За його результатами в 26 хворих у стаціонарній стадії псоріатичного процесу з'ясовано, що чотири індикатори (наявність та активність утворення лусочок, виразність еритеми, інфільтрація шкіри) достовірно ($p < 0,05$) зменшуються на п'яту та 15 добу лікування, сягаючи рівня статистичної похибки на 20 добу.

3. У хворих з прогресуючою стадією псоріазу мали місце патогномонічні прояви динамічних змін клініко-морфологічної картини псоріатичного осередку: прояви свіжих висипів (зареєстровані на 10 добу лікування у $(10,7 \pm 3,4)\%$ хворих) «ободки» Воронова з максимальною частотою у $(85,7 \pm 3,8)\%$ на 20 добу, зменшення частоти скарг на свербіж лише до 15 доби).

Література

1. Гуревич В.С., Конторицинова К.Н., Шапилина С.В. Сравнительный анализ двух методов определения активности супероксиддисмутазы. // Лабораторное дело 1990. №4. С.44-47.

2. Костюк В.А., Потапович А.И., Ковалёва Ж.В. Простой и чувствительный метод определения супероксиддисмутазы, основанной на реакции окисления

кверцетина // Вопр. мед. химии. 1990. №32. С.88-91.

3. Лемешко В.В., Никитченко Ю.В., Евич И.В. Глутатионпероксидаза и глутатионтрансфераза // Український біохімічний журнал. 1987. №8. С.59-57

4. Гаврилов Б.В., Мишкорудная М.И. – СФ – метрическое определение содержания ГПР в плазме крови. Лабораторное дело. 1983. №3. С.33-36.

5. Арутюнян А.В., Дубинина Е.Е., Зыбина Н.Н. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма. СПб, 2000. С.44-49

6. Dillard C.J., Tappel A.L., Lipid peroxidation products in biological tissues // J. Free Radic. Biol. Med. 1989. Vol.7. P.193-196

7. Щербань Н.Г., Горбач Т.И., Гусева Н.Р. Лабораторные методики для изучения состояния антиоксидантной системы организма и уровня перекисного окисления липидов: Метод. рекомендации для докторантов, аспирантов, магистрантов. исполнителей НИР. Харьков: ХДМУ, 2004. 36 с.

8. Гаврилов Б.В., Гаврилова А.Р., Мажуль Л.М. Анализ методов определения продуктов ПОЛ в сыворотке крови по тесту с ТБК // Вопросы медицинской химии. 1987. Т.33, №1. С.118-123.

9. Якушев В.С. Влияние гистидина на содержание МДА в тканях при экспериментальном инфаркте миокарда // Вопр. мед. химии, 1979. № 4. С. 476-478.

10. Косухин А.Б., Ахметова Б.С. Экстракция липидов смесью гептан изопропанол для определения ДК // Лаб. дело. 1987. №5. С.335-337.

11. Dormandi T.I., Wickens D. The experimental and clinical pathology of diene conjugation // Chem. Phys. Lipids. 1987. Vol.45. P.353-364.

12. Горбунов Н.В. Активация образования окиси

азота, опосредованная метаболитными глутаматными рецепторами в первичных культурах клеток – зёрен мозжечка // Бюлл. экспериментальной биологии и медицины. 1995. №7. С.40-48.

13. Hevel S.M., White K.A. Purification of the inducible murine macrophage nitric oxide syntase // J. Biol. Chem. 1991. Vol. 266, №11. P. 789-791.

14. Дубинина Е.Е. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека. Методы ее определения // Вопр. мед. химии. 1995. Т.42, №1. С.24-26

15. Абакумова Ю.В. Физиологическое и патологическое свободнорадикальное окисление: сущность, методика распознавания, теоретическое и практическое значение. / Врачевание и его методология Саратов 1996. С.33.

16. Беленічев І.Ф. Продукти вільнорадикального перекисного окислення та їх ідентифікація // Совр. пробл. токсикол. 2002. №4. С. 9 –18.

17. Гунський Ю.І., Дунаев В.В., Беленічев І.Ф. та ін. Методи оцінки антиоксидантних властивостей фізіологічно активних сполук при ініціюванні вільнорадикальних процесів у дослідях in vitro // Метод, реком. Київ: ДФЦ, 2002. 26с.

18. Ардаматский Н.А. Методика определения физиологического и патологического перекисного окисления // Экоген 1994. №4. С.9

19. Sarsunova M., Schwarz V., Michalec C. Chromatografia na tenrych vrstvach vo farmacii a v klinicrej biochemii. Pragma: Vydavatelstvo Osveta, 1980. 621 p.

20. Методы биохимических исследований / Под ред. М.И. Прохоровой. Л.:ЛГУ, 1982. 278.

21. Лабораторные исследования в клинике: Справочник / Под ред. Меньшикова В.В. М.: Медицина, 1987. 368с.

Поступила в редколлегию 20.03.2009

Окислительный гомеостаз больных системными дерматозами: клинико – морфологическая оценка эффективности его коррекции / Черкашина Л.В., Пиунов В.Т., Беловол А.М. // Медицина и... 2009. № 1(23). С. 93-97.

Исследована клиническая эффективность патогенетической коррекции метаболических нарушений окислительного гомеостаза с применением антиоксидантной терапии и определены морфологические индикаторы, а также патогномоничные проявления динамики клинико – морфологической картины у больных псориазом.

Ключевые слова: окислительный гомеостаз, дерматозы, эффективность терапии.

Окислювальний гомеостаз хворих на системні дерматози: клініко-морфологічна оцінка ефективності його корекції / Черкашина Л.В., Піунов В.Т., Біловол А.М. // Медицина і... 2009. № 1(23). С. 93-97.

Досліджена клінічна ефективність патогенетичної корекції метаболічних порушень окислювального гомеостазу із застосуванням антиоксидантної терапії та визначені її морфологічні індикатори та патогномонічні прояви змін клініко - морфологічної картини у хворих на псориаз.

Ключові слова: окислювальний гомеостаз, дерматози, ефективність терапії

Oxidizing homoeostasis of patients with system dermatosis: Clinical - morphological assessment of its correction effectiveness / Cherkashyna L.V., Piunov V.T., Belovol A.M // Medicine and... 2009. № 1(23). P. 93-97

Clinical effectiveness of nosotropic correction by using antioxidant therapy of metabolic violations of oxidizing homoeostasis is investigated; morphological indicators and also pathognomonic clinical-morphologic manifestations for patients with psoriasis are determined.

Keywords: oxidizing homoeostasis, dermatosis, therapy effectiveness.