

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2010

УДК 616.517-085.262]07:616.5-018.1-008.9-074

Р. А. Грашин, В. Г. Антонов, А. И. Карпищенко, В. Р. Хайрутдинов

## СИСТЕМЫ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ И АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ КАК ИНДИКАТОРЫ АКТИВНОСТИ ПРОЛИФЕРАЦИИ КЕРАТИНОЦИТОВ ПРИ ПСОРИАЗЕ

Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова, Санкт-Петербург

*Изучено состояние систем свободнорадикального окисления и антиоксидантной защиты (АОЗ) в культурах кератиноцитов у больных псориазом до и после воздействия комбинаций липосомальных препаратов. Отмечено, что состояние гиперпролиферации кератиноцитов сопровождается угнетением процессов перекисного окисления липидов и высоким уровнем антиоксидантной активности клеток. Напротив, угнетение клеточной пролиферации под влиянием липосомальных лекарственных комбинаций характеризуется резким возрастанием прооксидантной активности относительно уровня АОЗ культур эпидермальных кератиноцитов.*

**Ключевые слова:** кератиноциты, липосомы, псориаз, свободнорадикальное окисление, глутатион, малоновый дикарбонат, пентоксифиллин, пролиферация, дифференцировка, культуры клеток

R. A. Grashin, V. G. Antonov, A. I. Karpishchenko, V. R. Khairutdinov

### THE FREE RADICAL OXIDATION AND ANTIOXIDANT DEFENSE SYSTEMS AS INDICATORS OF THE ACTIVITY OF KERATINOCYTIC PROLIFERATION IN PSORIASIS

*The free radical oxidation and antioxidant defense (AOD) systems in the keratinocyte cultures were studied in patients with psoriasis before and after the use of combinations of liposomal preparations. Hyperproliferation of keratinocytes was found to be attended by suppressed lipid peroxidation and high cell antioxidant activity. On the contrary, the liposomal combinations-induced suppression of cell proliferation was characterized by a drastic increase in prooxidant activity in reference to the AOD of epidermal keratinocyte cultures.*

**Ключевые слова:** кератиноциты, липосомы, псориаз, свободнорадикальное окисление, глутатион, малоновый дикарбонат, пентоксифиллин, пролиферация, дифференцировка, культуры клеток

Одной из важнейших составляющих псориаза как патологического процесса является подавление дифференцировки кератиноцитов. При этом клетки сохраняют способность дифференцироваться, однако это требует дополнительного воздействия, которым может быть и внешний фактор в виде средств терапии, включая те, что усиливают окислительное давление [21, 24]. Иными словами, кератиноциты при псориазе располагают комплексом регуляторных и метаболических возможностей для дифференцировки, однако в определенных условиях не способны или ограниченно способны к их инициации. В связи с этим закономерным является вопрос о молекулярных механизмах ингибирования дифференцировки кератиноцитов и возможности воздействия на них.

В последние годы появилось достаточно много публикаций, посвященных изучению про- и антиоксидантной систем, их регуляции и регулирующей функции при псориазе [1, 4, 5, 9, 10, 22–24]. Однако сформировать целостное представление о состоянии этих процессов, их роли в патогенезе псориаза и клинических проявлениях у больных с данной патологией пока не представляется возможным вследствие недостаточного количества результатов проводимых исследований. Кроме того, в подавляющем большинстве работ анализировались показатели крови, которые при эпидермаль-

ных поражениях кожи могут быть недостаточно информативны.

При псориазе, как и при большинстве нозологических форм, отмечено повышение содержания продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в крови. При этом исследователи отмечали адаптивное повышение активности антиоксидантных ферментов (СОД, каталаза и др.) [1, 9, 20]. Однако имеется ряд сообщений, в которых указано на низкую активность прооксидантных процессов в кератиноцитах и их микроокружении при псориазе [22–24]. В связи с этим исследования значений интегративных показателей про- и антиоксидантных процессов были выполнены не в крови, а в первичных культурах кератиноцитов, полученных от больных псориазом.

**Цель исследования.** Изучить интенсивность активности про- и антиоксидантных систем в первичных культурах псориатических кератиноцитов и характер их изменений при воздействии комбинаций лекарственных средств в липосомах, используемых для лечения псориаза.

**Материалы и методы.** Работа выполнена на первичных культурах кератиноцитов из пораженных участков. Воздействие на уровень внутриклеточных молекул, регулирующих интенсивность процессов как свободнорадикального окисления (СРО), так и антиоксидантной защиты (АОЗ), осуществляли комбинациями лекарственных препаратов, включенных в липосомы. Комбинации подбирали с учетом ранее проведенных исследований [7]. Изучали действие двух смесей, наиболее и наименее подавляющих пролиферацию кератиноцитов в культуре. Изготовление липосом и включение в них лекарственных субстанций производили по методу Г. Григориадиса и А. Аллисона (1983) в на-

#### Для корреспонденции:

Грашин Роман Арикович, канд. мед. наук, каф. клинической биохимии и лабораторной диагностики  
Адрес: 195273, Санкт-Петербург, Пискаревский пр., 56-3-33.  
Телефон: (7-921) 927-72-36.  
E-mail: Grashin62@mail.ru

шей модификации [8, 17]. Были приготовлены и использованы комбинации фармакологически активных субстанций в липосомах № 1 (пентоксифиллин, пирроксан и селенит натрия) и № 2 (пентоксифиллин и селенит натрия). Все препараты способны влиять на механизмы клеточной регуляции [18]. Липосомальные фракции фармакологических средств вводили в клеточную питательную среду в концентрации, оказывающей регуляторное воздействие.

Для выделения первичных культур кератиноцитов использовали лоскуты кожи, взятые в стерильных условиях у больных псориазом из очага поражения, и лоскуты кожи от здоровых людей для контроля. Одну часть клеток культур снимали на пике пролиферации, т. е. перед воздействием препаратов, другую изучали после внесения препаратов, т. е. после включения механизмов подавления пролиферации. Результаты исследований сравнивали с контролем.

Изучение значений показателей интенсивности реакций СРО и АОЗ проводили в интактных клетках и клетках после воздействия липосомальных препаратов.

Для определения значений показателей процессов СРО и АОЗ: малонового диальдегида (МДА), диеновых конъюгат (ДК), восстановленного глутатиона (ВГ), сульфогидрильных групп белков (СГ), общей антиокислительной активности (ОАА), глутатионредуктазы (ГР), глутатионпероксидазы (ГП), СОД и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Гл-6-ФДГ) — использовали биохимические методы [19]. Результаты статистически обрабатывали с помощью пакета прикладных программ Excel.

#### *Результаты и обсуждение.*

*Результаты изучения систем СРО и АОЗ в кератиноцитах до воздействия комбинациями лекарственных липосомальных препаратов.*

На пике пролиферации отмечается резкое угнетение прооксидантной системы, о чем свидетельствует концентрация ДК и МДА по сравнению с таковой у здоровых людей. Эти показатели уменьшены по сравнению с нормой почти в 3 раза, составляя  $27,65 \pm 5,79$  и  $62,16 \pm 5,33$  нмоль на 1 г

ткани соответственно ( $p < 0,001$ ) (см. таблицу). При этом многие аналиты, характеризующие антиоксидантную систему в этот период кератиноцитов, повышены, причем это касается как ферментов АОЗ, так и субстратов. Содержание восстановленного глутатиона повышенено в 4,41 раза ( $p < 0,001$ ), и в 2,2 раза повышена концентрация СГ. Мы считаем, что данные изменения свидетельствуют об изменении редокс-потенциала клеток в сторону восстановления и превалировании процессов биосинтеза над процессами катаболизма.

Изменения ферментов, обеспечивающих функционирование системы глутатиона, не подверглись столь значительным изменениям. Так, активность ГР и ГП не отличается от контроля. Наряду с ферментами системы глутатиона активность энзимов, которые принимают участие в дисмутации АФК и перекиси водорода, образующихся в процессах СРО в больших количествах, изменилась более значительно. Активность цитоплазматической СОД кератиноцитов на пике пролиферации возросла в 1,5 раза, зато активность каталазы оказалась достоверно уменьшенной на 48%. Уровень ОАА кератиноцитов в период активной пролиферации как суммарный показатель оказался ожидаемо высоким. Он превышал контрольную норму практически в 2 раза ( $p < 0,001$ ). Особое внимание обращает поведение Гл-6-ФДГ — фермента пентозофосфатного цикла, который, по данным многих исследователей [4], активируется при этой патологии. В наших исследованиях его активность повышена на 45% по сравнению с таковой кожи здоровых людей.

Полученные данные прежде всего свидетельствуют об усилении метаболизма пролиферирующих кератиноцитов, что подтверждается не только высокой активностью Гл-6-ФДГ, участвующей в прямом окислении глюкозы, но и в целом относительно спокойным поведением ферментов антиокислительной защиты. На наш взгляд, такое поведение системы СРО может быть обусловлено измененным редокс-потенциалом клеток, смещенным в сторону восстановления и поддерживающим высокую белковосинтетическую функцию кератиноцитов в период активной пролиферации.

**Показатели системы СРО и АОЗ после воздействия липосомальных комбинаций № 1 и 2 на культуры кератиноцитов у больных псориазом**

Показатель	Контроль	До воздействия ( $n = 8$ )	После воздействия липосомальными комбинациями № 1, 2 на культуры кератиноцитов	
			№ 1 ( $n = 8$ )	№ 2 ( $n = 8$ )
ДК, нмоль на 1 г ткани	$68,16 \pm 9,74$	$27,65 \pm 5,79^*$	$84,28 \pm 3,49^{**}$	$79,16 \pm 4,19^{**}$
МДА, нмоль на 1 г ткани	$162,8 \pm 5,4$	$62,16 \pm 5,33$	$195,52 \pm 6,25^{**}$	$188,44 \pm 4,87^{**}$
ВГ, моль на 1 г ткани	$3,46 \pm 0,21$	$15,28 \pm 1,87^*$	$2,87 \pm 0,24^{**}$	$2,73 \pm 0,92^{**}$
СГ, ммоль на 1 г ткани	$10,34 \pm 0,33$	$22,76 \pm 1,36^*$	$6,33 \pm 1,86^{**}$	$7,24 \pm 0,87^{**}$
ГР, мкмоль/мин · 1 г белка	$96,12 \pm 6,85$	$111,67 \pm 5,72$	$84,76 \pm 4,36^{**}$	$89,24 \pm 4,61^{**}$
ГП, ммоль/мин · 1 г белка	$2,34 \pm 0,56$	$2,13 \pm 0,12$	$3,47 \pm 0,22^{***} (p < 0,05)$	$3,21 \pm 0,31^{**}$
СОД, мкмоль/мин · 1 г белка	$188,8 \pm 16,1$	$296,43 \pm 19,3^*$	$208,18 \pm 15,3^{**}$	$237,53 \pm 13,5^{**}$
Каталаза, мкмоль/мин · 1 г белка	$36,72 \pm 4,86$	$19,27 \pm 1,97^* (p < 0,05)$	$44,0 \pm 4,08^{**}$	$38,12 \pm 3,16^{**}$
ОАА, %	$36,72 \pm 4,86$	$73,45 \pm 4,16^*$	$33,29 \pm 3,87^{**}$	$41,25 \pm 5,19^{**}$
Гл-6-ФДГ, мкмоль/мин · 1 г белка	$34,19 \pm 4,22$	$61,76 \pm 4,74^*$	$24,72 \pm 2,95^{**}$	$27,82 \pm 4,56^{**}$

Примечание. \* — по сравнению с показателями в контроле ( $p < 0,001$ ), \*\* — до воздействия ( $p < 0,05$ ).

## *Результаты изучения систем СРО и АОЗ в кератиноцитах после воздействия смесями лекарственных липосомальных препаратов*

Липосомальные лекарственные комбинации, первая из которых вызывает наибольшее угнетение пролиферативной клеточной активности, а вторая — в меньшей степени, изменяли состояние СРО в культурах кератиноцитов следующим образом (см. таблицу).

Концентрация ДК повысилась в 3 раза по сравнению с таковой в период активной пролиферации как после применения комбинации с пирроксаном, так и без него, тем самым превысив уровень контрольных значений на 23 и 16% соответственно. Аналогичные изменения были отмечены при исследовании уровня МДА, концентрация которого также в обеих группах наблюдений достоверно повысилась более чем в 3 раза и превысила контрольные цифры. Значимых различий по результатам исследований этих двух анализов между группами мы не выявили.

Содержание СГ на пике пролиферации превышало аналогичный показатель в контроле более чем в 2 раза. После применения обеих липосомальных смесей его уровень достоверно снизился даже ниже контрольных значений в среднем на 35%.

Концентрация ВГ при этом снизилась очень значительно — более чем в 5 раз, составив  $2,87 \pm 0,24$  и  $2,73 \pm 0,92$  моль на 1 г ткани в группах № 1 и 2 соответственно. При этом различий между группами также нет.

Ферменты глутатиона вели себя следующим образом. После внесения в культуральную среду липосомальных комбинаций активность ГР значительно снизилась. Композиция № 1 вызвала падение активности на 24%, а № 2 — на 20% по отношению к периоду активной пролиферации.

Характер изменений активности ГП был иной. В период активной пролиферации активность ГП, как и в предыдущих исследованиях, не отличалась от контрольных данных. Однако под влиянием комбинации № 1 активность этого фермента повысилась на 63%, достоверно превышая данные группы контроля, а под действием смеси без пирроксана — на 39%.

Активность СОД также наибольшим образом изменилась под влиянием липосомальной комбинации № 1, где ее активность уменьшилась на 30% и не отличалась от таковой в группе контроля. Под влиянием смеси № 2 активность этого фермента снизилась только на 20% ( $p < 0,05$ ).

Каталаза резко и достоверно повысила свою активность под влиянием обеих комбинаций на 128 и 97% соответственно и в обеих группах не отличалась от контрольных данных.

Несмотря на некоторые различия в антипролиферативном действии, комбинация № 1 и комбинация № 2 достоверно снижают ОАА, в культурах кератиноцитов в среднем в 2 раза, также приводя ее значения к уровню контроля.

Гл-6-ФДГ значительно снизила свою функциональную активность по сравнению с таковой в период пролиферации. Так, в группе наблюдения, в которой использовали смесь с пирроксаном, — на

60%, что ниже контрольной в 1,4 раза. Под влиянием комбинации № 2 активность этого фермента также достоверно снизилась на 55%.

Полученные результаты достаточно трудно поддаются трактовке, и пути внутриклеточных превращений под влиянием липосомальных композиций не укладываются в цепь стандартных и хорошо известных биохимических реакций, способных объяснить механизмы поведения систем СРО и АОЗ, поэтому мы сделали попытку подойти к объяснению полученных результатов с позиций комплексообразующих соединений и регуляции вне- и внутриклеточного окислительно-восстановительного статуса.

Изменения, полученные при определении значений параметров систем СРО и АОЗ в кератиноцитах в период их активной пролиферации до применения лекарственных препаратов в составе липосом, свидетельствуют о трансформации реакций в сторону преобладания антиокислительной компоненты. Подобные изменения активности про- и антиоксидантных систем предопределяют смещение редокс-потенциала, делая его более восстановленным и характерным для активно пролиферирующих клеток.

Окислительно-восстановительное состояние клетки — баланс между эквивалентным уровнем окисления и восстановления. Определяется суммарным соотношением концентрации восстанавливающих и окисляющих агентов. Этот баланс часто связывается с метаболизмом и выживанием, однако наряду с этим необходим и окислительно-восстановительный дисбаланс, так как он является регулятором и индикатором для многих нуклеиновых факторов транскрипции. Например, активатор протеина 1 (AP 1), нуклеиновый фактор-кВ (NF-кВ) и тирозинфосфатаза белка 1-В (PTP-1В) являются лишь некоторыми из известных молекул, для которых изучена окислительно-восстановительная модуляция их активности. При этом система главного редокс-буфера глутатиона моделирует ответ клетки на окислительно-восстановительные изменения, вызванные внешними или внутриклеточными стимулами [26, 31, 32, 39].

От чего зависит внутриклеточная окислительно-восстановительная среда? Внутриклеточное окислительно-восстановительное состояние определено вкладом различных окислительно-восстановительных пар (редокс-пар). Каждая пара способна обменивать электроны таким образом, что может представлять необходимые в каждом конкретном случае кофакторы в окислительно-восстановительных ферментативных реакциях. Относительное количество восстановленной и окисленной формы каждой пары может определять изменения в клеточном окислительно-восстановительном состоянии, смещающая его как в одну, так и в другую сторону [31]. В клетках, включая и кератиноциты, существуют три самые важные окислительно-восстановительные системы: никотинамидадениндинуклеотид фосфатная (НАДФН/НАДФ<sup>+</sup>), тиоредоксина-вая (TRXred/TRXox) и глутатиона (ВГ/ОГ). Среди них последняя является самой важной, так как концентрация глутатиона приблизительно в 500—1000 раз выше, чем TRX и НАДФН [11—13, 15, 16].

Таким образом, изменения в ВГ/ОГ-буфере глутатиона непосредственно отражают внутриклеточное окислительно-восстановительное состояние и его изменения. При физиологических условиях уровень ВГ в 10–100 раз превышает концентрацию ОГ [13, 15, 28, 29]. Экспериментальные наблюдения прошлого десятилетия демонстрируют, что изменения в этом отношении могут управлять различными клеточными реакциями, вовлечеными в трансдукцию сигналов, регуляцию клеточного цикла и многими другими процессами, включая пролиферацию и дифференцировку, а также влиять на работу мембранных структур, деятельность цитоскелета, клеточное деление, регуляцию активности гормонов пептидной природы [10, 11, 13, 15, 27, 29].

Активная пролиферация сопровождается синтезом ферментов, в том числе и факторов антиокислительной системы, например СОД. При этом процессы аэробного окисления в клетках из псориатических бляшек развиты достаточно сильно, гораздо сильнее, чем в нормальных кератиноцитах [4, 20, 21, 24]. АФК могут образовываться и подавляться с высокой скоростью, следовательно, соотношение аэробных и анаэробных процессов может быть практически одинаковым, что также подтверждается высокой активностью Гл-6-ФДГ. В этот период синтезируются восстановленные формы НАДФН<sup>+</sup>, принимающие участие в биосинтетических анаболических процессах. Накопление сульфогидрильных групп белков в данном случае также является прямым подтверждением двух позиций: активно анаболизирующую, пролиферирующую клеточной единицы и смещения редокс-потенциала в сторону большей восстановленности, что согласуется с результатами других авторов [11, 32, 37]. При этом глутатион рассматривается в качестве основного компонента редокс-буфера клетки, устойчиво поддерживающего характерную для нее восстановленную среду [11–13, 15, 16]. При падении концентрации ВГ клетка меняет свой восстановленный статус на окисленный, что в итоге приводит к повышению интенсивности СРО.

Одно из возможных объяснений схожего действия различных по химической природе и фармакологической активности соединений, содержащих азот, окси- и гидроксигруппы, может быть связано с их способностью образовывать комплексные координационные соединения (КС) с переходными биометаллами (железо, медь и некоторые др.), обладающими свойством в ультрамалых количествах в присутствии кислорода и его производных или активных форм азота катализировать окислительные реакции в физиологических условиях [3, 14]. В этом аспекте объяснимы эффекты сelenита натрия, который способен координироваться с эндогенными азот- и серосодержащими органическими молекулами в комплексное соединение с каталитическим действием. Лигандом для селена может выступать молекула ВГ, комплексные соединения которой катализируют окислительно-восстановительные процессы [3].

Не исключено, что каталитическая активность КС приводила к снижению уровня восстановительных эквивалентов в цитозоле и, соответству-

но, их экспорта в микроокружение клетки. Наличием подобного действия препаратов в составе липосом можно объяснить характер изменения прооксидантных процессов, а именно активацию СРО, приводящую в итоге к повышению концентрации ДК и МДА. Мягкое окислительное воздействие на сульфогидрильные группы изучаемых внутриклеточных ферментов также объясняет изменение их активности.

Повышение окислительной активности в цитозоле приводит к снижению уровня внутриклеточной концентрации ВГ. Так, в период активной пролиферации он достаточно высок. Величина снижения концентрации ВГ при каталитическом действии ультрамалой концентрации координационных соединений лекарственных препаратов, введенных в состав липосом, вероятно, определяется стабильностью образующихся КС. Так, пентоксифиллин, способный образовывать более устойчивые КС, будет отличаться более сильным воздействием на уровень ВГ. Пирроксан в совокупности с селенитом натрия значительно усиливают его действие. Особенности влияний селенита натрия обусловлены молекулярной массой координируемых молекул, возможностью их перемещения в различные клеточные компартменты, его возможным непосредственным воздействием на активность селен-зависимых ферментов.

Так, Se-зависимая ГП — высокочувствительна к O<sub>2</sub>,зывающему угнетение ее активности. Наиболее выраженное повышение ее активности при добавлении в среду селенита натрия, вероятно, связано с его активирующим влиянием на этот фермент. Известно, что дефицит селена приводит к снижению активности ГП более чем в 65 раз. Однако существуют данные, свидетельствующие о том, что неорганический селен не включается в состав данного энзима [15, 16, 38]. Не исключено, что в условиях эксперимента повышение активности ГП определялось оптимально выбранной концентрацией селена в составе селенита натрия, благоприятной для действия ГП на свои субстраты [40].

ГР и Гл-6-ФДГ являются ферментами, поддерживающими высокий уровень глутатиона в клетке. Установлено, что ГР и Гл-6-ФДГ проявляют активность на пике пролиферации, а затем теряют ее под воздействием вводимых в среду веществ, что может быть объяснено окислительной модификацией сульфогидрильных групп с участием КС, образуемых вводимыми лекарственными препаратами.

Так, скорость НАДФ·Н-зависимого восстановления ОГ в ВГ под действием ГР намного превосходит возможности его синтеза *de novo* в тканях [13]. Необходимым условием для осуществления глутатионредуктазной реакции является наличие в тканях достаточного уровня НАДФ·Н, так как его расходование при этом в 6 раз выше, чем на биосинтез жирных кислот и обеспечение процессов микросомального окисления [15]. Основным источником восстановленной формы НАДФ является ключевая реакция пентозофосфатного пути метаболизма углеводов — глюкозо-6-фосфатдегидрогеназная, которая и лимитирует возможности редокс-циклирования глутатиона [11, 13, 15]. Актив-

ность Гл-6-ФДГ достоверно снижается под влиянием всех вводимых препаратов, что может свидетельствовать об ингибировании механизма восстановления глутатиона вследствие недостаточного количества восстановленного НАДФ. Этим можно объяснить низкий уровень ВГ во всех группах наблюдения после воздействия липосомальных комбинаций. Активность данного энзима может быть подавлена возросшим прооксидантным статусом и окислением сульфидильных групп ГР.

Доказано, что активность основного фермента антиоксидантной защиты СОД прогрессивно уменьшается в соответствии с повышением степени тяжести повреждения клеток и развития гипоксии [6]. Возможно, угнетение активности СОД развивается по механизму обратной связи — ингибирование избытком субстрата, являющегося в свою очередь продуктом ксантинооксидазной и пероксидазной реакций [6]. Такими субстратами являются супeroxидный анион-радикал и перекись водорода. В нашем случае возрастание их концентрации в системе можно предположить с большой долей вероятности, так как на фоне повышения активности ГП, каталазы и роста концентрации продуктов ПОЛ накопление перекисей и АФК вполне очевидно. Рост активности каталазы, вероятно, носит компенсаторный характер в связи с предполагаемым  $H_2O_2$  во внутриклеточной среде.

При воздействии окислительных стимулов отношение ВГ/ОГ имеет тенденцию к уменьшению, однако в ответ на окислительное напряжение глутатион поддерживает окислительно-восстановительное состояние клетки через различные механизмы. Так, активность ГР должна повышаться, или избыток ОГ, сформированный в ответ на атаку окислительных эквивалентов, должен быть вытеснен во внеклеточную среду. В наших исследованиях отмечено падение активности ГР, что, по-видимому, связано с механизмами ингибирования этого энзима, каким образом это происходит, пока не ясно. В тех случаях, когда окислительное напряжение становится длительным и массивным, а клеточные системы более не способны противодействовать генетически установленным для них дозам АФК, вероятно, как в случае воздействия пентоксифиллином и пирроксаном, количество ВГ уменьшается, что приводит к остановке пролиферации и последующему запуску апоптоза клетки. Уменьшение содержания ВГ считается доказанным звеном запуска митохондриально-зависимых апоптотических сигнальных путей [33].

Химическое и физическое воздействие (УФО, лекарственные препараты) или взаимодействие лиганд/рецептор — лишь некоторые из процессов, в которых окислительное напряжение должно быть фактором трансдукции, приводящим к апоптозу, пролиферации, дифференцировке и регуляции клеточного цикла. Доказано, что АФК являются посредниками в передаче клеточных сигналов. Ряд исследователей выдвигали гипотезу относительно роли окислительно-восстановительного состояния окружающей среды в регуляции многих сигнальных путей [26, 37, 39]. Экспериментально доказано, что тирозинкиназные рецепторы, например,

эпидерmalного фактора роста могут быть активированы окислением молекул, приводящих к активации внутриклеточных сигнальных систем [36]. Кроме того, многие тирозинкиназы активируются смещением потенциала в сторону окисления [31, 32].

Окисление, приводящее к истощению ВГ, вызывает формирование межмолекулярных дисульфидов и, как следствие, конформационные изменения, увеличивающие сродство и специфику глутаматного участка ОГ к различным лигандам. Такие изменения способствуют повышению чувствительности рецепторного аппарата клетки, который может быть заблокирован при излишней восстановленности как наружной, так и внутриклеточной среды псoriатического кератиноцита [27, 34]. Этим можно объяснить эффективность действия препаратов и методов лечения, которые смещают редокс-потенциал в сторону окисления. Активные молекулы, способные изменять окислительно-восстановительный фон, непосредственно изменяют внутриклеточную среду, входя в клетку и действуя на функциональные белки. Известно о том, что взаимодействие лиганд/рецептор вызывает клеточный ответ по механизму, который может произвести активацию нескольких процессов без прямой коммуникации с внутренней частью клетки [31].

Следовательно, тиол/дисульфидный обмен может быть представлен как новый способ преобразования и передачи сигналов из внеклеточной среды до внутриклеточных процессов и отдельных реакций [31, 32]. С этой точки зрения тиолсодержащие молекулы могут быть сигнальными, когда акт передачи происходит на определенных трансмембранных белках. В то же время богатые цистеином мембранные белки могут представлять предполагаемые рецепторы, особенно если они вовлечены в активацию некоторых известных путей трансдукции сигнала [27]. Так, богатое цистеином семейство рецепторов фактора некроза опухоли  $\alpha$  (ФНО $\alpha$ ) — хороший тому пример. Даже если взаимодействия между окислительно-восстановительно активными молекулами и этими рецепторами и не столь эффективны, то при связывании физиологически важных эффекторных элементов структура и функция мембранных рецепторов могут быть изменены взаимодействием с этими лигандами и таким способом начинают сигнальный путь [37]. Мы считаем, что в этом также заключается ответ на вопрос о механизме действия применяемых нами препаратов в культурах псoriатических кератиноцитов. Известно о том, что десенсибилизация поверхностно-клеточных рецепторов в числе прочих причин может быть обусловлена избыточной восстановленностью среды, формируемой за счет экспорта восстановительных эквивалентов из клеток в свое микроокружение [31]. С участием этих соединений осуществляется процесс восстановления дисульфидных связей целого ряда поверхностно-клеточных рецепторов. Рецептор при отсутствии дисульфидных сшивок приобретает функционально неактивную конформацию, что означает неспособность клеток физиологически адекватно отвечать на регуляторные внеклеточные воздействия [37].

Таким образом, обобщенные данные могут предложить новый подход в объяснении действия

внеклеточного окислительно-восстановительного фона и передаче клетке различных сигналов, влияющих в том числе на ее цикл. Внеклеточный окислительно-восстановительный фон ведет к возникновению перекрестных связей с клеточными рецепторными системами и вызывает ответ по механизмам, которые не являются основными, но используют прямое действие окислительно-восстановительных эквивалентов во внутриклеточных процессах.

В частности, внеклеточные окислительно-восстановительные сигналы могут действовать через системы вторичных посредников, которые в свою очередь могут быть представлены или трансмембранными богатыми цистеином рецепторами или специализированными низкомолекулярными веществами. Данная гипотеза подтверждена недавно полученными данными, которые продемонстрировали, что антигены представляющие клетки повышают внеклеточную концентрацию цистеина, стимулирующую быстрое увеличение количества активированных Т-лимфоцитов [25]. Т-лимфоциты рассматриваются как клетки, обусловливающие воспалительный процесс при псориазе и обеспечивающие основной цитокиновый сигналинг, ведущий в том числе к усилению пролиферации кератиноцитов. Основными цитокинами активных Т-лимфоцитов являются  $\gamma$ -интерферон и ФНО $\alpha$  [2, 35]. Фактически большинство внеклеточных эквивалентов цистеина, необходимых для активации пролиферации и роста, существует как окисленная форма цистина, который Т-лимфоциты неспособны усвоить. Представляющие антиген клетки — клетки Лангерганса и дендритные — поглощают цистин из внеклеточной среды, восстанавливают его до цистеина и вытесняют цистеин во внеклеточное пространство, снабжая им Т-клетки. Кроме того, дендритные клетки имеют TRX, который может непосредственно преобразовать внеклеточный цистин в цистеин [25, 29, 30]. Таким образом, дальнейший механизм, которым внеклеточная окислительно-восстановительная окружающая среда вовлечена в передачу сигналов внутрь клетки, становится достаточно понятным.

**Выводы.** 1. Состояние гиперпролиферации кератиноцитов сопровождается резким угнетением процессов СРО и высоким уровнем антиокислительной активности клеток, о чем свидетельствуют низкая концентрация ДК и МДА, высокий уровень ВГ и сульфогидрильных групп, а также активность ферментов, участвующих в регуляции АОЗ.

2. Угнетение клеточной пролиферации, вызванное комбинациями различных по фармакологическим свойствам препаратов, которые включены в липосомы, характеризуется резким возрастанием прооксидантной активности и угнетением АОЗ культур эпидермальных кератиноцитов.

3. Процессы СРО и АОЗ принимают самое непосредственное участие в регуляции пролиферативно-дифференцировочной активности клеток кожи при псориазе таким образом, что повышение интенсивности СРО ведет к остановке пролиферации, а высокий уровень АОЗ ее поддерживает.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Акулов Ю. С. и др. // Современные вопросы дерматовенерологии: Юбилейный сборник науч. трудов, посвящ. 70-летию Обл. кож.-венерол. диспансера г. Курск. — Курск, 1999. — С. 9–11.
2. Антонов В. Г. Физиологические и биохимические аспекты действия альфа-фетопротеина на гепатоциты и иммунокомпетентные клетки: Дис. ... д-ра мед. наук. — СПб., 1997.
3. Басоло Ф., Пирсон Р. Механизмы неорганических реакций. Изучение комплексов металлов в растворе. — М., 1971.
4. Беляев Г. М., Рыжков П. П. Псориатическая артрапатия (этиология, патогенез, диагностика, лечение, профилактика). — Киев, 2005.
5. Вартазарян Н. Д. // Экспер. клин. мед. — 1991. — № 4. — С. 335–342.
6. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. — М., 1972.
7. Грашин Р. А. и др. // Вестн. Рос. воен.-мед. акад. — 2008. — № 4 (24). — С. 125–130.
8. Грегориадис Г. — Липосомы в биологических системах. — М., 1983.
9. Дикова О. В., Сосунов А. А. // Рос. морфол. Ведомости. — 1996. — № 2. — С. 76–80.
10. Калмагамбетов Г. Ж. Влияние стероидных гормонов на процессы перекисного окисления липидов в нормальной и патологически измененной коже: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — М., 1996.
11. Колесниченко Л. С., Манторова Н. С. // Биохимия. — 1987. — Т. 52, вып. 5. — С. 743–749.
12. Колесниченко Л. С., Кулинский В. И., Екимов Е. Н. // Вопр. мед. химии. — 1994. — Т. 40, вып. 5. — С. 10–12.
13. Корнеев А. А., Комиссарова И. А. // Изв. РАН. — 1993. — № 4. — С. 542–549.
14. Костромина Н. А., Кумок В. Н., Скорик Н. А. Химия координационных соединений. — М., 1990.
15. Кулинский В. И., Колесниченко Л. С. // Успехи соврем. биол. — 1990. — Т. 110, вып. 1. — С. 20–37.
16. Кулинский В. И., Колесниченко Л. С. // Успехи соврем. биол. — 1993. — Т. 113, вып. 1. — С. 107–122.
17. Марголис Л. Б., Бергельсон А. Д. Липосомы и их взаимодействие с клетками. — М., 1986.
18. Машковский М. Д. Лекарственные средства. — Харьков, 1998. — Т. 1–2. — С. 249; 452–457; 376–378; 441; 708–709.
19. Методы клинической биохимии: Медицинские лабораторные технологии и диагностика / Под ред. А. И. Карпиченко. — СПб., 2002.
20. Псориаз (иммуномеханизмы патогенеза и методы лечения) / Шарапова Г. Я. и др. — М., 1989.
21. Суханова Н. М. // Вестн. дерматол. — 1997. — № 1. — С. 4–6.
22. Тарасенко Г. Н., Хышктуев Б. С., Корнилов А. Б. // Воен.-мед. журн. — 2002. — № 2. — С. 61–62.
23. Хышктуев Б. С., Тарасенко Г. Н., Корнилов А. Б., Фалько Е. В. // Воен.-мед. журн. — 2000. — № 7. — С. 40–43.
24. Шилов В. Н., Сергиенко В. И. // Бюл. экспер. биол. — 2000. — № 4. — С. 364–369.
25. Angelini G. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2002. — Vol. 99. — P. 1491–1496.
26. Biukse T. M., Sandstrom P. A. // Immunol. Today. — 1994. — Vol. 15, N 1. — P. 7–10.
27. Colgreade J. A., Gerdes R. G. // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 1998. — Vol. 242. — P. 1–9.
28. Deneke S., Fanburg B. // Am. J. Physiol. — 1989. — Vol. 257, N 1. — P. 163–173.
29. Droege W., Hack V., Breitkreutz R., Holm E. // Bio Factors. — 1998. — N 8. — P. 97–102.
30. Edinger A. L., Thompson C. B. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2002. — Vol. 99. — P. 1107–1109.
31. Filomeni G., Rotilio G., Ciriolo M. R. // Biochem. Pharmacol. — 2002. — Vol. 64. — P. 1057–1064.
32. Filomeni G., Aquilano K., Civitareale P. et al. // Free Rad. Biol. Med. — 2005. — Vol. 39. — P. 345–354.
33. Ghibelli L., Coppola S., Fanelli C. et al. // FASEB J. — 1999. — Vol. 13. — P. 2031–2036.
34. Jordan P. A., Gibbins J. M. // Antioxidants and Redoxsignaling. — 2006. — Vol. 8, N 3–4. — P. 312–324.
35. Krueger J. G. // J. Acad. Dermatol. — 2002. — Vol. 46. — P. 1–23.

36. Pawson T. // *Nature*. — 1995. — Vol. 373. — P. 573—580.
37. Schulze-Osthoff K., Ferrari D., Los M. et al. // *Eur. J. Biochem.* — 1998. — Vol. 254. — P. 439—459.
38. Simmons T. // *Biochemistry*. — 1988. — Vol. 251, N 3. — P. 913—917.
39. Wang X., Martindale J. L., Liu Y., Holbrook N. J // *Biochem. J.* — 1998. — Vol. 333. — P. 291—300.
40. Ziegler D. // *Ann. Rev. Biochem.* — 1985. — Vol. 54. — P. 305—329.

Поступила 01.06.09