

Биолог. журн. Армении, 3-4 (57), 2005

УДК 616.61:612.1:599.322.615.379

ИЗМЕНЕНИЕ АНТИ- И ПРООКСИДАНТНОГО СТАТУСА КРОВИ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТЕ, ОСЛОЖНЕННОМ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ

А.С. АЛЕКСАНЯН*, Г.М. СИМОНЯН*, Р.М. СИМОНЯН*, А.А. СТЕПАНЯН**,
С.С. АЛЕКСАНЯН*, М.А. СИМОНЯН*

*Институт биохимии НАН РА, 375014, Ереван

**Гюмрийская областная клиническая больница, 377510

При хроническом гломерулонефрите, осложненном сахарным диабетом, у пациентов наблюдаются неадекватные изменения уровней и активности металлопротеинов крови — регуляторов метаболизма активных форм кислорода. При этом прооксидантный статус сыворотки крови и эритроцитов выше антиоксидантного статуса, что создает определенный фон оксидативного повреждения компонентов крови.

Շաքարախտով բարդացված գլոմերուլոնեֆրիտով հիվանդների արյան մեջ դիտվում է թթվածնի ակտիվ միացությունների նյութափոխանակությունը կարգավորող մետաղապրոտեինների մակարդակների և ակտիվության անհամազոր փոփոխություններ: Ընդ որում առկա է արյան շիճուկի և էրիթրոցիտների պրոօքսիդանտային բարձր կարգավիճակ, հակաօքսիդանտային կարգավիճակի համեմատ, առաջացնելով արյան բաղադրամասերի օքսիդատիվ վնասման համապատասխան մակարդակ:

At chronic glomerulonephritis, complicated with diabetes, in the blood of patients non-identical changes of the levels and activity of metalloproteins, the regulators of metabolism of reactive oxygen species take place. At the same time, the prooxidant status of the blood serum and erythrocytes is higher than the antioxidant one. These effects cause an oxidative damage of blood components on a corresponding background.

Гломерулонефрит - сахарный диабет - кровь- оксидативное повреждение

При хроническом гломерулонефрите, осложненном инсулин-зависимым диабетом (ХГОС), наблюдается секреция в моче альбумина и церулоплазмينا (ЦП), что в основном связывается с нарушением селективности мембран клеток почечных клубочков [15]. В последних уровень лизосомального железа повышается и усиливается явление оксидативного повреждения этих клеток [11]. Одновременно происходит снижение экспрессии мРНК для Cu, Zn-СОД и глутатионпероксидазы [13]. При диабетической нефропатии происходит накопление амилоидного вещества — глюкозированных продуктов в почечной ткани, вызывая повреждение последних [14]. При «чистой» гипергликемии наблюдаются некоторые характерные отклонения от нормы уровней металлопротеинов антиоксидантной активности (МАО) и металлопротеинов прооксидантной активности (МПА), а также антиоксидантного статуса (АС) и прооксидантного

статуса (ПС) в сыворотке крови и эритроцитов [4]. Однако при ХГОС такие исследования отсутствуют.

Целью работы являлось определение молекулярно-биохимических механизмов оксидативного повреждения компонентов крови пациентов ХГОС.

Материал и методика. МАА и МПА, а также эритроцитарные мембраны (ЭМ) получали из крови (по 20 мл) у больных ХГОС (11 больных обоих полов, в возрасте 28-55 лет с давностью заболевания 2-3 г). В качестве контроля были использованы показатели донорской крови – 8 человек обоих полов, в возрасте 34-56 лет. МАА (Cu, Zn-СОД и каталаза из растворимой фракции эритроцитов, ЦП и трансферрин – ТФ из сыворотки крови) и МПА (цит b5 из растворимой фракции эритроцитов, изоформы цитохрома b558 ЭМ – цит b558III и цит b558IV, а также O_2^- -продуцирующий липопротеин сыворотки – супрол) выделяли и очищали биотехнологическим способом путем ионообменной хроматографии белковых фракций сыворотки, растворимой части эритроцитов и ЭМ на целлюлозах ДЕ-52 и КМ-52 ("Whatman", Англия), сефадексе ДЕАЕ А-50 ("Pharmacia", Швеция) и гель-фильтрации на сефадексах G -100 и G -150 (Pharmacia) [6]. Цит b558III и цит b558IV выделяли и очищали без использования детергента, заметно снижающего стабильность указанных гемопротеинов [8]. Количество металлопротеинов (МП) определяли путем измерения характерной для данного белка плотности максимального оптического поглощения: для цит b5 при 525 нм, для изоформ цит b558 при 530, супрола 430, ЦП-610 и ТФ-470 нм. Активность супероксиддисмутазы и O_2^- -продуцирующую активность цит b558III и супрола определяли нитротетразолиевым синим (НТС) методом [13], путем измерения процента ингибирования (для СОД) или увеличения (для супрола и цит b558III) образования формазана в результате восстановления НТС супероксидными радикалами (O_2^-). За единицу СОД-активности принимали количество фермента, снижающее продуцирование формазана (при 560 нм) на 50%. Удельную СОД-активность определяли в расчете на 1 мл эритроцитов. За единицу НАДРН-зависимой O_2^- -продуцирующей активности цит b558III и супрола принимали количество белков, повышающее образование формазана на 50%. Удельная O_2^- -продуцирующая активность для цит b558III была рассчитана на 1 мл эритроцитов, а супрола – на 1 мл сыворотки. Для определения O_2^- -продуцирующей активности цит b558III в гетерогенной фазе (в ЭМ) к реакционной смеси добавляли 0,5 мл ЭМ, смешанные с 0,04 М калий фосфатным буфером, pH 7,4 (КФБ). Метгемоглобин (метНб)-восстанавливающую активность цит b558III [9] определяли путем измерения процента снижения плотности поглощения альфа-полосы (при 565 нм) мет Нб (ферриНб- Fe^{+3}) в течение 4-8 ч при 30°. Такое снижение плотности поглощения альфа-полосы прямо пропорционально увеличению уровня образовавшегося ферро Нб (Fe^{+2} - Нб) при 555 нм. За единицу мет Нб-восстанавливающей активности цит b558III принимали количество гемопротейна, уменьшающее интенсивность плотности альфа-полосы (плотность заштрихованной части этого поглощения, как показано на рис.4) до 0,05 в течение 30 мин при 30°. Удельная метНб-восстанавливающая активность цит b558III была определена в расчете на 1 мл эритроцитов. При определении метНб-восстанавливающей активности цит b558III в гомогенной фазе величина плотности поглощения изолированного цит b558III (А530) в реакционной смеси (3 мл) составляла 0,02. Расчетный уровень добавленного к реакционной смеси цит b558III в гетерогенной фазе (в 0,5 мл ЭМ) ниже приблизительно в 10 раз, по сравнению с содержанием цит b558III в гомогенной фазе. Процедура определения метНб-восстанавливающей активности такова. Непосредственно в кварцевых кюветах спектрофотометра к 2,5 мл свежеполученного метНб из эритроцитов донорской крови добавляли 0,5 мл изолированного цит b558III (гомогенная фаза) или 0,5 мл ЭМ, смешанные с 0,04 М КФБ (гетерогенная фаза). После быстрого смешивания реакционной смеси, ее оставляли в покое и осторожно (без перемешивания) регистрировали снижение плотности альфа-поглощения метНб при указанных выше условиях. Оптические спектральные измерения осуществляли на спектрофотометре «Specord UV-VIS» (Германия), с длиной оптического пути – 1 см. Статистическую обработку полученных результатов осуществляли общеизвестным методом вариационной статистики Стьюдента-Фишера, с определением критерия достоверности «р».

Результаты и обсуждение. По сравнению с 100%-ными показателями донорской крови при ХГОС происходит существенное повышение

эндогенного уровня цит 5, видимо, для компенсации потери уровня изоформ цит b558 ЭМ (табл.1).

Таблица 1. Относительные изменения (%) эндогенных уровней МАА и МПА крови и их активности при ХГОС по сравнению с 100%-ными показателями донорской крови ($p < 0,05$, $n = 10$)

МП и их активность	ХГОС
Цит b5	$+137,8 \pm 5,2$
Цит b558Ш	$-34,2 \pm 3,4$
Цит b558	$-8,3 \pm 1,1$
O_2^- - продуц. актив. супрола	$+205,4 \pm 15,1$
O_2^- - продуц. актив. цит b558Ш в гомогенной фазе	$-22,3 \pm 1,6$
O_2^- - продуц. актив. цит b558Ш в гетерогенной фазе	$+72,7 \pm 4,4$
ЦП	$+12,5 \pm 1,1$
ТФ	$-33,4 \pm 1,9$
Cu, Zn-СОД	$+45,0 \pm 2,6$
Каталаза	$-52,3 \pm 3,0$

При этом НАДРН-зависимая O_2^- -продуцирующая активность цит b558Ш снижается в гомогенной фазе, но значительно повышается в гетерогенной фазе (непосредственно в ЭМ). Уровень другого МП с прооксидантной активностью – супрола повышается при ХГОС, с резким увеличением его O_2^- -продуцирующей активности. Одновременно происходит небольшое повышение уровня ЦП и существенное увеличение Cu, Zn-СОД активности. На фоне этих изменений происходит снижение уровня ТФ и особенно каталазы (табл. 1). Расчетный суммарный уровень МАА (антиоксидантный статус – АС) в сыворотке крови пациентов снижается на $20,9 \pm 2,4\%$ ($p < 0,05$, $n=10$), а расчетный суммарный уровень МПА (прооксидантный статус – ПС) резко повышается ($293,6 \pm 21,2\%$, $p < 0,03$, $n=10$). Иная картина в эритроцитах при ХГОС. АС эритроцитов претерпевает

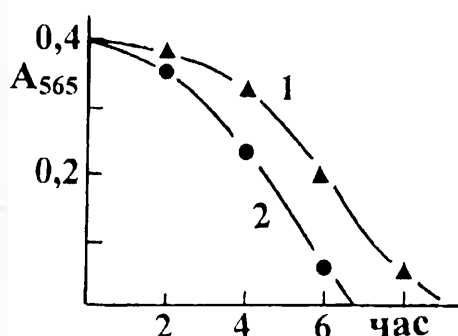


Рис.1. Кинетические кривые снижения альфа-полосы метHb (гомогенная фаза) под действием изолированного цит b558Ш из ЭМ донорской крови (1) и из ЭМ пациентов ХГОС (2), при 30° в аэробных условиях *in vitro*.

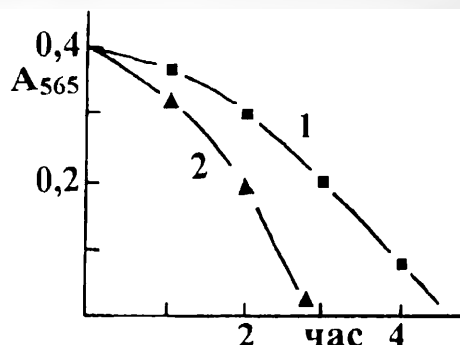


Рис.2. Кинетические кривые снижения альфа-полосы метHb под действием ЭМ (гетерогенная фаза) донорской крови (1) и ЭМ пациентов ХГОС (2), при 30° в аэробных условиях *in vitro*. ЭМ после удаления цит b558 не оказывают аналогичного эффекта.

небольшое снижение ($-7,3 \pm 0,5 \%$, $p < 0,01$, $n = 8$), а ПС значительно увеличивается ($95,3 \pm 7,1$, $p < 0,05$, $n = 10$). В гомогенной фазе, наряду со снижением уровня и O_2^- -продуцирующей активности цит b558III, происходит повышение его метHb-восстанавливающей активности (рис. 1). В гетерогенной фазе наблюдается повышение O_2^- -продуцирующей и метHb-восстанавливающей активности цит b558III (табл. 1, рис. 2, 3). В ходе восстановления метHb (ферриHb) цитохромом b558III в гомогенной и гетерогенной фазах, форма спектра метHb постепенно приближается к форме спектра ферроHb, с соответственным снижением плотности альфа-полосы (заштрихованная часть спектра) при 565 нм. Постепенно появляется единственный максимум поглощения, характерный для ферроHb (Fe^{+2} - Hb) при 555 нм (рис.4). Интересно, что и при цит b558III донорской крови и при цит b558, взятых из ЭМ больных ХГОС, в результате небольшого перемешивания реакционной смеси происходит обратимое окисление ферроHb, с превращением его в ферриHb (Fe^{+3} - Hb), с характерным оптическим спектром поглощения. При дальнейшем инкубировании этой реакционной смеси в покое снова происходит образование ферроHb с характерным оптическим спектром поглощения. Однако скорость повторного восстановления МетHb цитохромом b558III (после повторного перемешивания) выше. Это свидетельствует об образовании в инкубационном периоде этого процесса неопределенного пока соединения. Скорее всего, это соединение кислорода, образовавшегося при повторном перемешивании (аэрации) реакционной смеси. Не исключается и роль NO^- в лигандном окружении цит b558III [11], как переносчика электрона от группы ФАД в составе этого гемопroteина к Fe^{+3} метHb (мет Hb образует нестабильное комплексное соединение с цитохромом b558III) [5]. Эти предположения требуют более детального обоснования в дальнейшем.

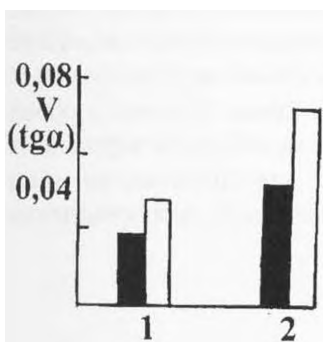


Рис.3. Скорость снижения (tg угла наклона) интенсивности альфа-полосы метHb под действием изолированного цит b558III из ЭМ пациентов ХГОС (1) и доноров (2) в гомогенной (n) и гетерогенной (o) фазах.

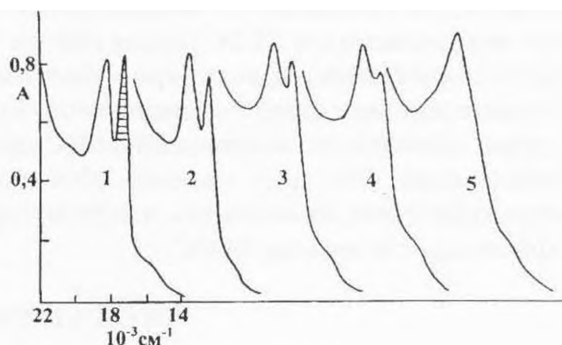


Рис. 4. Оптические спектры поглощения метHb донорской крови (1) под действием цит b558III ($A_{530} = 0,02$) из ЭМ пациентов ХГОС в гомогенной фазе: через 2,5 ч (2), 3,5 ч (3), 4 ч (4) и 6 ч (5) при 30° in vitro. Аналогичные изменения более интенсивно наблюдается под действием 0,5 мл ЭМ пациентов ХГОС (гетерогенная фаза).

Каковы возможные молекулярно-биохимические механизмы наблюдаемых изменений? Повышение уровня цит b5- переносчика электрона для метHb –

редуктазы в растворимой фракции эритроцитов, видимо, связано с определенным снижением подвижности организма больных при ХГОС. Аналогичное явление наблюдается у крыс при гипокинезии [1], а альфа-аминомасляная кислота и пирролидон-2 оказывают протективный эффект [2].

Снижение уровня изоформ цит b558 ЭМ при ХГОС, возможно, связано с накоплением в эритроцитах перекиси водорода из-за снижения активности каталазы. Перекись водорода необратимо деградирует гемопротейны, включая и цит b558 ЭМ [7], вызывая повышение агрегации эритроцитов и цит b558III, с соответствующей потерей текучести ЭМ. Это может отрицательно влиять на гемодинамику при ХГОС. В ответ на это, организм усиливает метHb -восстанавливающую и O_2^- -продуцирующую активность цит b558III, особенно в гетерогенной фазе, положительно влияя на кислородный гомеостаз (метHb не переносит молекулярный кислород к клеткам).

Повышение уровня и O_2^- -продуцирующей активности супрола нежелательное явление, так как это стимулирует агрегацию супрола, что может вызвать изменение вязкости сыворотки и в целом гемодинамики. Против этого явления происходит некоторое повышение уровня ЦП. Видимо, такое изменение уровня ЦП связано с большим его расходом при нейтрализации стехиометрических количеств O_2^- [3].

Ощутимое снижение уровня ТФ может вызывать накопление высокоактивных ионов Fe^{+2} как стимулятора образования HO - радикалов [10].

Увеличение уровня Cu,Zn-СОД в эритроцитах может быть ответом повышенного продуцирования O_2^- цитохромом b558III в ЭМ.

Наконец, приведенные нежелательные факторы являются производными оксидативного повреждения перекисью водорода из-за существенного снижения уровня каталазы в эритроцитах. С другой стороны, механизмы оксидативного повреждения при «чистой» гипергликемии [4] существенно отличаются от таковых при ХГОС. Это свидетельствует о том, что гипергликемию и ХГОС нельзя считать болезнями с приближенными патогеническими молекулярно-биохимическими механизмами с соответствующим фоном оксидативного стресса крови. Однако в обоих случаях снижение АС по сравнению с ПС является характерной чертой этих заболеваний. Это даст научное обоснование для повышения доли антиоксидантных компонентов, в первую очередь каталазы, для повышения эффективности терапии ХГОС.

ЛИТЕРАТУРА

1. Акопян В.П., Симонян М.А., Манукян А.А. и др. Бюлл. эксп. биол. мед., 132, 11, 527-529, 2001.
2. Манукян А.А., Симонян М.А., Симонян Р.М., Симонян Г.М. Эксп. клин. мед., 67, 1, 28-31, 2004.
3. Мжельская Т.И. Бюлл. эксп. биол. мед., 130, 8, 124-133, 2000.
4. Варданян А.Р., Геворкян Д.Н., Агаджанов М.И., Симонян М.А. Мед. наука Армении, 40, 2, 20-22, 2000.
5. Симонян Г.М., Симонян Р.М., Бабаян М.А., Карапетян А.В., Симонян М.А. Мед.

- наука Армении, 43, 1, 30-37, 2003.
6. Симосян М.А., Симосян Г.М., Симосян Р.М. Лицензия изобрет. № 908 Армпатента, Ереван, 2001.
 7. Симосян М.А., Симосян Г.М., Симосян Р.М. В кн.: Актуальные вопросы военной медицины. Гос. мед. унив., Ереван, 48-51, 1999.
 8. Симосян М.А., Симосян Г.М., Симосян Р.М. Лицензия изобрет. № 908 Армпатента, Ереван, 2001.
 9. Симосян Р.А., Секоян Э.С., Хачатрян К.К., Симосян Г.М., Симосян М.А. Мед. наука Армении, 44, 3, 15-23, 2004.
 10. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. Biochem. J., 219, 1, 1-14, 1984.
 11. Karapetian A.V., Simonyan G.M., Miller A.F., Linn B., Babayan M.A., Simonyan R.M., Simonyan M.A. 227-th AGS National Meeting, Anaheim, Canada, march 28, 2004.
 12. Nankivell B.J., Tay Y.C., Badle R.A., Harris D.C. Ren-Fail, 16, 3, 367-381, 1994.
 13. Nishikimi M., Rao N.A., Jagi K. Biochem. Biophys. Res. Commun., 46, 849-856, 1972.
 14. Reddi A.S., Bollineni J.S. Biochem. Biophys. Res. Commun., 235, 3, 598-601, 1997.
 15. Suzuki D., Miyata T., Saotome N. et al. J. Am. Soc. Nephrol., 10, 4, 822-832, 1999.
 16. Yamazaki M., Ito S., Usami A. et al. Eur. J. Endocrinol., 132, 6, 681-687, 1995.

Поступила 30.VIII.2005