

БИОХИМИЯ

УДК 577.616

А.С. Алексанян, Г.М. Симонян, С.С. Алексанян, М.А. Симонян

**Факторы оксидативного повреждения крови больных при хронической
почечной недостаточности**

(Представлено академиком А.А.Галояном 1/XI 2005)

Ключевые слова: *кровь, металлопротеины, хроническая почечная недостаточность, оксидативное повреждение*

Хроническая почечная недостаточность (ХПН) почти всегда сопровождается обострением других заболеваний (сердечно-сосудистые заболевания, тромбоз, хронический грануломатоз и др.) [1-4]. При этом наблюдается накопление конечных продуктов гликозилирования и дикарбоксильных соединений [5] и дефицит нитроксильных радикалов в эпителиальных клетках сосудов [6]. При ХПН, ассоциирующей со снижением экспрессии каталазы и глутатионпероксидазы в почечной ткани как факторами детоксикации перекиси водорода и органических гидроперекисей [7], происходит увеличение продуцирования активных форм кислорода (АФК) и снижение активности других антиоксидантных защитных систем [8]. Эти факторы вызывают оксидативное повреждение почечной ткани и в целом оксидативный стресс, чему несколько способствует внутривенно введенное железо (феррий глюконат) при терапии хронических почечных заболеваний [9]. В то же время в крови больных наблюдается увеличение насыщенности трансферрина железом и интенсификация перекисного окисления липидов (ПОЛ). При оксидативном стрессе клеточное повреждение, или дисфункция органов, включая и почки, имеет место при накоплении в них АФК. Причем АФК действуют как инактивирующие агенты ферментов митохондрий, повреждающие ДНК или вызывающие апоптоз клеток и их гипертрофию. На этом фоне нитроксил ($\text{NO}\cdot$) как энергичный релаксационный фактор, действуя с супероксидом, образует пероксинитрил ($\text{ONOO}\cdot$), который

является энергичным оксидантом. Это создает дефицит нитроксила и ведет к повышению активности НАДРН-зависимых супероксид-продуцирующих оксидоредуктаз как основных источников супероксидов в стенках сосудов почек [10,11]. Для снижения повреждающих эффектов оксидативного повреждения при ХПН часто используется антиоксидантотерапия с применением антиоксидантов (витамины Е и С, N-ацетилцистеин, восстановленный глутатион, селенат натрия) и соответствующих биомембран для ультра-чистого диализа крови и гемодиализа [8]. К настоящему времени внимание обращается в основном на выявление патогенических механизмов оксидативного повреждения клеток почек, а характерные изменения анти- и прооксидантных систем крови при ХПН остаются в тени.

Цель работы состоит в определении количественных и качественных изменений металлопротеинов (МП) крови больных ХПН.

Металлопротеины антиоксидантной активности (МАО) и металлопротеины прооксидантной активности (МПА), а также эритроцитарные мембраны (ЭМ) получали из крови (по 20 мл) пациентов с ХПН (14 больных обоих полов в возрасте 48-67 лет с давностью заболевания 2-5 лет). В качестве контроля были использованы показатели донорской крови 7 человек обоих полов. МАО (Cu,Zn-СОД и каталаза из растворимой фракции эритроцитов, церулоплазмин (ЦП) и трансферрин (ТФ) из сыворотки крови) и МПА (цитохром (цит) b5 из растворимой фракции эритроцитов, изоформы цит b558 ЭМ - цит b558III и цит b558IV, а также O_2^- -продуцирующий липопротеин сыворотки - супрола) 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). Цит b558III и цит b558IV выделяли и очищали без использования детергента, заметно снижающего стабильность указанных гемопротеинов [12,13]. Количество МП определяли путем измерения характерной для данного белка плотности максимального оптического поглощения: для цит b5 - 525, изоформ цит b558 - 530, супрола - 430, ЦП - 610 и ТФ - 470 нм. Активность супероксиддисмутазы и супероксид-продуцирующую активность цит b558III и супрола определяли методом нитротетразолиевого синего (НТС) [14], 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 [15] принимали количество белков, повышающее образование формазана на 50%. Удельная O_2^- -продуцирующая активность для цит b558III была рассчитана на 1 мл эритроцитов, а для супрола - на 1 мл сыворотки.

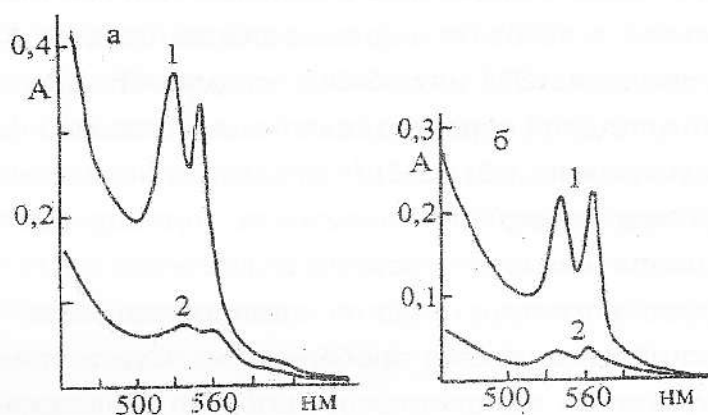


Рис.1. Оптические спектральные характеристики комплекса цит b558III с Hb: а - оптические спектры поглощения комплекса цит b558III с Hb у больных ХПН (1) и у доноров (2); б - отщепленный от этого комплекса Hb у больных ХПН (1) и у доноров (2).

Для определения O_2^- -продуцирующей активности цит b558III в гетерогенной фазе (в ЭМ) к реакционной смеси добавляли 0.5 мл ЭМ, смешанных с 0.04 М калий-фосфатным буфером, pH 7.4 (КФБ). Метгемоглобин (метHb)-восстанавливающую активность цит b558III [16] определяли путем измерения процента снижения плотности поглощения альфа-полосы (при 565 нм) метHb (ферриHb- Fe^{+3}) в течение 4-8 ч при 30°. Такое снижение прямо пропорционально увеличению уровня образовавшегося ферроHb (Fe^{+2} -Hb) при 555 нм. За единицу метHb-восстанавливающей активности цит b558III принимали количество гемопroteина, уменьшающее интенсивность плотности альфа-полосы до 0.05 в течение 30 мин при 30°. Удельная метHb-восстанавливающая активность цит b558III была определена в расчете на 1 мл эритроцитов. При определении метHb-восстанавливающей активности цит b558III в гомогенной фазе величина плотности поглощения изолированного цит b558III (A530) 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 5-10 раз по сравнению с содержанием цит b558III в гомогенной фазе. Процедура определения метHb-восстанавливающей активности такова: непосредственно в кварцевых кюветах спектрофотометра к 2.5 мл свежеполученного метHb из эритроцитов донорской крови и крови больных ХПН добавляли 0.5 мл изолированного цит b558III (гомогенная фаза) или 0.5 мл ЭМ, смешанных 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. Для определения степени релизинга (отщепления) цит b558III из ЭМ (по 10 мл, смешанных с КФБ при pH 8) доноров и больных ХПН ЭМ инкубировали при 4° в течение 4 суток в условиях перемешивания смеси. Далее определяли уровень отщепленного из ЭМ цит b558III, предварительно удаляя следы Нб. Уровень продукта липидной пероксидации (малоновый диальдегид-МДА) в ЭМ (по 0.5 мл) после релизинга цит b558III определяли оптическим спектральным методом [17], путем измерения плотности поглощения МДА, величина молярной экстинкции которого составляет $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Оптические спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре "Specord UV-VIS" (Германия) с длиной оптического пробега 1 см. Статистическую обработку полученных результатов осуществляли методом вариационной статистики Стьюдента-Фишера, с определением критерия достоверности.

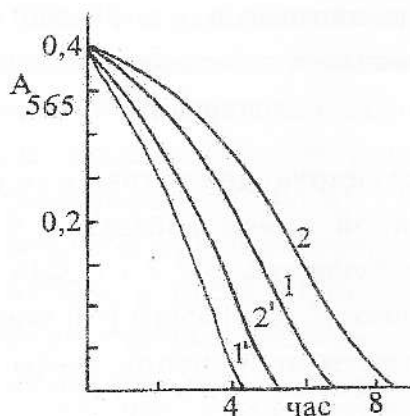


Рис.2. Кинетические кривые снижения плотности максимального оптического поглощения ферриНб (Fe^{+3} -Нб) при 565 нм (альфа-полосы поглощения) под воздействием цит b558III доноров (1) и цит b558III у больных ХПН (2) в гетерогенной фазе (в ЭМ); то же (1' и 2') в гомогенной фазе.

При ХПН состав МП сыворотки крови и эритроцитов существенно изменяется (табл.1). На фоне заметного повышения эндогенного уровня МПА (цит b58III, цит b558 IV ЭМ), а также цит b5 растворимой фракции эритроцитов происходит увеличение НАДРН-зависимой супероксид-продуцирующей активности цит b558III в гетерогенной и особенно гомогенной фазе. Повышается и степень релизинга цит b558 из ЭМ, со снижением супероксид-продуцирующей активности последних и уменьшением в них ПОЛ. Эти результаты свидетельствуют о том, что при ХПН компенсаторно-адаптационные системы организма увеличивают уровень и активность цит b558III ЭМ, тем самым усиливая метаболические процессы с участием O_2^- , продуцируемых этим

гемопротеином. Однако это вызывает и увеличение ПОЛ в ЭМ при ХПН [18], инициированного супероксидными радикалами, продуцируемыми цитохромом b558III в гетерогенной фазе (в ЭМ). Действительно, в результате повышения степени релизинга цит b558III из ЭМ наблюдается снижение в последних уровня МДА (табл.1). В свою очередь, НАДРН-зависимая супероксид-продуцирующая активность цит b558III в гомогенной фазе выше, чем в гетерогенной. Видимо, это связано с повышением уровня перекиси водорода в ЭМ (перекись водорода является продуктом ферментативного дисмутирования супероксидных радикалов [19]), которая снижает активность этого гемопротеина и деградирует его [20]. Увеличение уровня цит b558III в ЭМ, его O_2^- - продуцирующей активности вызывает увеличение текучести ЭМ и существенное увеличение степени проникновения Hb в ЭМ, что действительно наблюдается при ХПН (рис.1). Цит b558III фактически является рецептором Hb в ЭМ и образует с ним нестабильное комплексное соединение. Основным фактором такого комплексообразования является нитроксильный радикал, локализованный в лигандном окружении железа в активном центре цит b558III [21]. Такое комплексообразование цит b558III с метHb *in vivo* наблюдается и при злокачественных новообразованиях [21], разница состоит только в степени такого комплексообразования, которое несколько выше при ХПН (рис.1). Однако при ХПН подавляется метHb-восстанавливающая активность цит b558III (рис.2) как в гомогенной, так и гетерогенной фазе (в ЭМ). Фактически при ХПН цит b558III претерпевает не только количественные, но и качественные изменения. Возможно, эти изменения связаны со сдвигами уровня нитроксила, ФАД и сахарных остатков в составе молекулы цит b558III [20]. Однако эти изменения практически не отражаются на оптико-спектральных характеристиках цит b558III (рис.3).

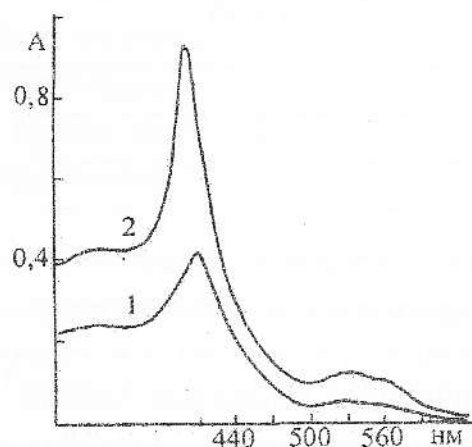


Рис.3. Оптические спектры поглощения цит b558III из ЭМ доноров (1) и больных ХПН (2).

Относительное изменение (%) уровня МАА и МПА при ХПН по сравнению со 100% показателями донорской крови ($P < 0.05$, $n = 8$)

МП и активность	ХПН
Цит b5	+ 7.8 +/- 1.1
Цит b 558III	+ 62.3 +/- 4.8
Цит b 558IV	+ 87.4 +/- 9.5
Цит b 558 (рилизинг)	+ 45.8 +/- 7.1
O ₂ ⁻ - продуцирующая активность ЭМ после рилизинга цит b 558III	- 20.1 +/- 2.2
МДА в ЭМ, после рилизинга цит b 558III	- 31.8 +/- 2.9
O ₂ ⁻ - продуцирующая активность цит b 558III в гомогенной фазе	+ 77.3 +/- 6.1
O ₂ ⁻ - продуцирующая активность цит b 558III в гетерогенной фазе (в ЭМ)	+ 45.5 +/- 4.6
Супрол	- 56.9 +/- 5.0
O ₂ ⁻ - продуцирующая активность супрола	+ 155.8 +/- 21.4
Церулоплазмин	+ 61.4 +/- 3.7
Трансферрин	- 30.2 +/- 2.1
Cu,Zn-СОД	+ 28.6 +/- 1.9
Каталаза	+ 50.4 +/- 3.3

Таблица 2

Относительные изменения (%) АС и ПС в сыворотке крови и эритроцитов у больных ХПН по сравнению со 100% контрольными показателями ($P < 0.05$, $n = 8$)

Компоненты крови	АС	ПС
Сыворотка	+ 31.4 +/- 2.0	+ 93.1 +/- 8.7
Эритроциты	+ 78.6 +/- 4.1	+ 157.5 +/- 14.9

Другим характерным фактором ХПН является существенное снижение уровня супероксид-продуцирующего липопротеина высокой плотности - супрола [17] на фоне резкого увеличения его супероксид-продуцирующей активности (табл.1). Причиной снижения уровня супрола, несомненно, является усиление процесса перекисного окисления собственных фосфолипидных остатков при ХПН, что может вызывать самоагрегацию супрола и повышение вязкости сыворотки, а также стимулировать тромбообразование и в целом нарушение гемодинамики при ХПН [21,20,15]. Переходя от МПА

к МАА, можно констатировать, что при ХПН вырабатывается адекватное повышение эндогенного уровня МАА за исключением ТФ, и это вызывает некоторое нарушение метаболизма железа в крови. Однако расчетный суммарный уровень МАА (антиоксидантный статус (АС)) существенно ниже расчетного суммарного уровня МПА (прооксидантный статус (ПС)) сыворотки крови и эритроцитов (табл.2). Это свидетельствует о значительном нарушении физиологического равновесия между продуцирующими и утилизирующими АФК МП в крови пациентов при ХПН. Таким образом, при ХПН основные механизмы оксидативного повреждения компонентов крови (МП и ЭМ) связаны с резким повышением степени комплексообразования цит b558III и Hb, усилением продуцирования супероксидов супролом и цит b558III, а также снижением метHb-восстанавливающей активности этого гемопротейна и созданием характерного дисбаланса между МП - регуляторами метаболизма АФК.

Институт биохимии им.Г.Х. Бунятыана НАН РА

Ա.Ս. Ալեքսանյան, Գ.Մ. Միմոնյան, Ս.Ս. Ալեքսանյան, Մ.Ա. Միմոնյան

Քրոնիկ երիկամային անբավարարությամբ հիվանդների արյան օքսիդարիվ վնասման գործոնները

Քրոնիկ երիկամային անբավարարությամբ հիվանդների արյան օքսիդարիվ վնասման մեխանիզմները առնչվում են ցիտ b558 III-ի և մետHb-ի միջև կոմպլեքսագոյացման խթանման, սուպրոլի և ցիտ b558 III-ի O_2^- - գոյացման ակտիվության աճի, ցիտ b558III-ի՝ մետHb-ի վերականգնման ակտիվության ընկճման՝ հոմոգեն և հեպերոգեն փուլում (երիթրոցիտների թաղանթներում), արյան շիճուկի և երիթրոցիտների պրոօքսիդանտային կարգավիճակի աճման, ինչպես նաև երիթրոցիտների թաղանթներից ցիտ b558-ի արտազատման ասպիճանի նվազման հետ:

A.S. Alexanyan, G.M. Simonyan, S.S. Alexanyan, M.A. Simonyan

Factors of Oxidative Damage of Blood of the Patients with Chronic Renal Failure

The mechanisms of blood's oxidative damage at the patients with chronic renal failure are connected with the sharp stimulation of formation of the complex compound between cyt b558III and Hb., the increase of the superoxide-producing activity of suprol and cyt

b558III., the decrease of metHb-reducing activity of cyt b558III in homogenous and heterogeneous phases (in EM), the elevation of the prooxidative status of blood serum and erythrocytes, as well as, the decrease of the releasing degree of cyt b558III from EM.

Литература

1. D'Elia J.A., Weinrauch L.A., Gleason R.E. - Int.J.Cardiol. 2005. V. 101. P. 19.
2. Caimi G., Carollo C., Lo Presti R. - Clin. Nephrol. 2004. V. 62. P. 331.
3. Cassrely L.F., Dember L.M. - Semin. Dial. 2004. V. 17. P. 71.
4. Kimpen J., Van Damme-Lombaerts R., Van den Berghe G., Proesmans W. - Eur. J. Pediatr. 1991. V. 150. P. 325.
5. Lapolla A., Reitano R., Seraglia R. - Mol.Nutr.Food.Res. 2005. V. 49. P. 685.
6. Passauer J., Pistrosch F., Bussemaker E. - Kidney Int. 2005. V. 67. P. 1665.
7. Sindhu R.K., Edhaie A., Farmond F. - Biochim.Biophys Acta. 2005. V. 1743. P. 86.
8. Luciak M. - Roczn. Akad.Med.Bialy. 2004 V. 49. P. 157.
9. Leehev D.J., Palubiak D.J., Chebrolu S, Agarwal R. - Nephrol. Dial. Transplant. 2005. V. 20. P. 135.
10. Modlinger P.S., Wilcox C.S., Aslan S. - Semin Nephrol. 2004. V. 24. P. 354.
11. Percy C., Pat B., Poronnik P., Gobe G. - Adv.Chronic Kidney Dis. 2005. V. 12. P. 78.
12. Симонян М.А., Симонян Г.М. - Лицензия изобрет. N341 Армпатента. Ереван. 1997.
13. Симонян М.А., Симонян Г.М., Симонян Р.М. - Лицензия изобрет. № 908 Армпатента. Ереван. 2001.
14. Nishikimi M., Rao N.A., Jagi K. - Biochem.Biophys.Res.Communs. 1972. V. 62. P. 849.
15. Симонян Г.М., Бабаян М.А., Симонян Р.М., Симонян М.А. - Биол. ж.Армении. 1999. Т. 52. С. 18.
16. Симонян Р.М., Симонян Г.М. - Мед.наука Армении. 2004. Т. 44. С. 43.
17. Симонян Р.М., Симонян Г.М., Бабаян М.А., Симонян М.А. - Мед. наука Армении. 2003. Т. 43. С. 13.
18. Lim C.S., Vaziri N.D. - Am.J.Nephrol. 2004. V. 24. P. 569.
19. Fridovich I. - Annu Rev.Biochem.1995. V. 64. P. 97.
20. Симонян Г.М., Симонян Р.М., Бабаян М.А., Карапетян А.В., Симонян М.А. - Мед. наука Армении. 2003. Т. 43. С. 30.
21. Симонян Г.М. - Автореф. канд. дис. Оксидативный стресс при злокачественных новообразованиях. Институт биохимии НАН РА. Ереван. 2003.