

Характерные сдвиги эндогенного уровня металлопротеинов крови пациентов при хроническом гломерулонефрите

А.С. Алексанян, Р.М. Симонян, Г.М. Симонян, А.В. Багдасарян,
С.С. Алексанян, М.А. Симонян

*Институт биохимии НАН РА, Ереван, П.Севака, 5/1
Гюмрийская клиническая больница «Самаритер», г.Гюмри*

Ключевые слова: хронический гломерулонефрит, кровь, оксидативное повреждение

Оксидативное повреждение клеток почечной ткани активными формами кислорода (АФК) является одним из механизмов патогенеза хронического гломерулонефрита (ХГН). При этом повышается уровень NO^* и интенсивность липидной пероксидации с одновременным снижением активности СОД, каталазы, бетта-каротина, альфа-токоферола, аскорбиновой кислоты и глутатионпероксидазы в плазме крови и эритроцитах [17]. При экспериментальном ХГН у крыс наблюдается снижение уровня антиоксидантных защитных систем в клетках почек с повышением активности НАДН-зависимых оксидаз, хотя уровень ксантиноксидазы не повышается [10]. Не происходит компенсаторного увеличения уровней антиоксидантных ферментов, и нарушается физиологическое равновесие между антиоксидантными и прооксидантными системами в клетках почечных клубочков [10,15]. Однако имеется и противоположное мнение. Наблюдается периодическое увеличение экспрессии антиоксидантных ферментов (Cu,Zn-SOD , Mn-SOD и каталазы) в почечных клетках у пациентов в различные периоды ХГН [16,13]. Однако исследований с целью комплексного и одновременного определения характерных изменений эндогенных уровней известных металлопротеинов (МП) антиоксидантной активности (МАО) и новых типов МП прооксидантной активности (МПО) [5] при ХГН практически не проводилось. Цель данной работы состоит в определении характерных количественных и качественных изменений МАО и МПО как взаимосвязанных, одновременно функционирующих и регулирующих метаболизм АФК системы при ХГН.

Материал и методы

Была обследована кровь (по 15–20 мл) больных ХГН (21 человек обоего пола с давностью заболевания 2–5 лет в возрасте 35–67 лет). МАО (Cu,Zn-SOD и каталаза из растворимой фракции эритроцитов, церулоплазмин – ЦП и трансферрин – ТФ из сыворотки крови) и МПО (цит b5 из растворимой фракции эритро-

цитов, изоформы цитохрома b558 ЭМ – цит b558III и цит b558IV, а также супероксид (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 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 [12] путем измерения процента ингибирования (для СОД) или увеличения (для супрола и цит b558III) образования формазана в результате восстановления НТС супероксидными радикалами. 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 для супрола – на 1 мл сыворотки. Для определения O_2^- -продуцирующей активности цит b 558III в гетерогенной фазе (в ЭМ) к реакционной смеси добавляли 0,5 мл ЭМ, смешанных с 0,04 М калийфосфатным буфером, pH 7,4 (КФБ). Метгемоглобин (метHb)-восстанавливающую активность цит b 558III [14] определяли путем измерения процента снижения плотности поглощения α -полосы (при 565 нм) мет Hb (ферриHb- Fe^{+3} -Hb) в течение 4–8 ч при 30°. Такое снижение плотности поглощения α -полосы прямо

пропорционально увеличению уровня образовавшегося ферро Нб(Fe²⁺-Нб) при 555 нм. За единицу мет Нб-восстанавливающей активности цит b558Ш принимали количество гемопroteина, уменьшающее интенсивность плотности α -полосы (заштрихованная часть, рис.4) до 0,05 в течение 30 мин при 30°. Удельная метНб-восстанавливающая активность цит b558Ш была определена в расчете на 1 мл эритроцитов. При определении метНб-восстанавливающей активности цит b558Ш в гомогенной фазе величина плотности поглощения изолированного цит b558Ш (A530) в реакционной смеси (3 мл) составляла 0,02. Расчетный уровень добавленного к реакционной смеси цит b558Ш в гетерогенной фазе (в 0,5 мл ЭМ) ниже приблизительно в 10 раз по сравнению с содержанием цит b558Ш в гомогенной фазе. Процедура определения метНб-восстанавливающей активности такова: непосредственно в кварцевых кюветках спектрофотометра к 2,5 мл свежеполученного из эритроцитов метНб донорской крови добавляли 0,5 мл изолированного цит b558Ш (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 α -поглощения мет Нб при указанных выше условиях. Оптические спектральные измерения осуществляли на спектрофотометре «Спекорд UV-VIS» (Германия) с длиной оптического пути – 1 см. Статистическую обработку полученных результатов осуществляли методом вариационной статистики Стьюдента-Фишера с определением критерия достоверности «Р».

Результаты и обсуждение

По сравнению с 100%-ными показателями донорской крови при ХГН уровень МПА существенно повышается. Исключение составляют изоформы цит b558 ЭМ (табл.1). Происходит повышение O₂-продуцирующей активности супрола и НАДРН-зависимой O₂-продуцирующей активности цит b558Ш, особенно в гетерогенной фазе (в ЭМ). Одновременно наблюдается повышение метНб-восстанавливающей активности цит b558Ш (рис.1), особенно в гетерогенной фазе (рис.2,3), причем скорость (tg угла наклона кинетических кривых) образования ферроНб под воздействием цит b558Ш при ХГН превышает таковую в контроле (показатели донорской крови) как в гомогенной (в растворе), так и в гетерогенной фазах (в ЭМ). Наглядное изменение формы оптического спектра поглощения метНб (снижение плотности заштрихованной части α -поглощения при 565 нм с одновременным появлением поглощения ферроНб при 555 нм) в различные сроки показано на рис 4. Причем, наблюдается интересное явление – при азрации реакционной смеси даже легким ее перемешиванием происходит быстрое окисление образовавшегося ферроНб. Таким образом, восстановление цитохромом b558Ш ферриНб до ферроНб является обратимым процессом, причем, после покоя вновь перемешанной реакционной смеси восстановление ферриНб до ферроНб усиливается. Этот эффект цит b558Ш при ХГН более выраженный, чем у цит b558Ш из донорской крови.

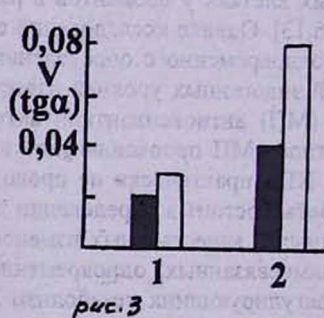
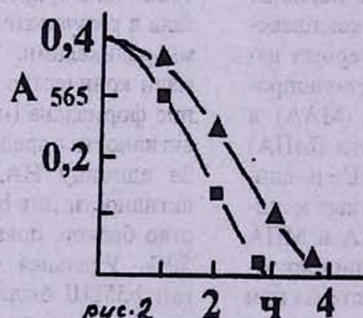
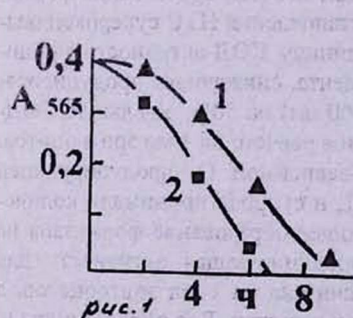


Рис.1. Кинетические кривые снижения плотности оптического поглощения α -полосы (при 565 нм) мет Нб под воздействием изолированного цит b558Ш в гомогенной фазе (в растворе): из ЭМ донорской крови (1) и из ЭМ пациентов ХГН (2). A530 цит b558Ш в реакционной смеси в обоих случаях составляет 0,02.

Рис.2. Кинетические кривые снижения плотности оптического поглощения α -полосы (при 565 нм) мет Нб под воздействием цит b558Ш в гетерогенной фазе: в ЭМ донорской крови (обозначения как на рис. 1).

Рис.3. Скорости (tg угла наклона) снижения интенсивности альфа-полосы оптического спектра поглощения метНб (заштрихованная часть) под воздействием цит b558Ш из ЭМ донорской крови (1) и из ЭМ пациентов ХГН (2) в гомогенной (■) и гетерогенной фазах (□)

Можно предположить, что снижение удельного содержания изоформ цит b558 ЭМ (они являются новыми структурно-функциональными элементами ЭМ [4]) компенсируется усилением O_2^- -продуцирующей и метНб-восстанавливающей активности ключевого изоформа цит b558 ЭМ – цит b558III при ХГН. Из МАА заметно повышается уровень ЦП и СОД, однако уровень ТФ и особенно каталазы существенно снижен. Соответственно расчетный суммарный уровень МАА (антиоксидантный статус – АС) и МПА (прооксидантный статус – ПС) сыворотки крови и

эритроцитов изменяется неодинаковым образом (табл.2). Происходит повышение ПС, особенно в сыворотке крови. Каковы возможные механизмы приведенных изменений при ХГН? Повышение уровня цит b5 (это переносчик электронов для метНб-редуктазы в растворимой фракции эритроцитов [9]), скорее всего, связано со снижением подвижности больных при ХГН (что происходит при гипокинезии крыс с повышением уровня цит b5 в 5–6 раз [1], при этом α -аминомасляная кислота и пирролидон-2 оказывают регулируемую роль [2]).

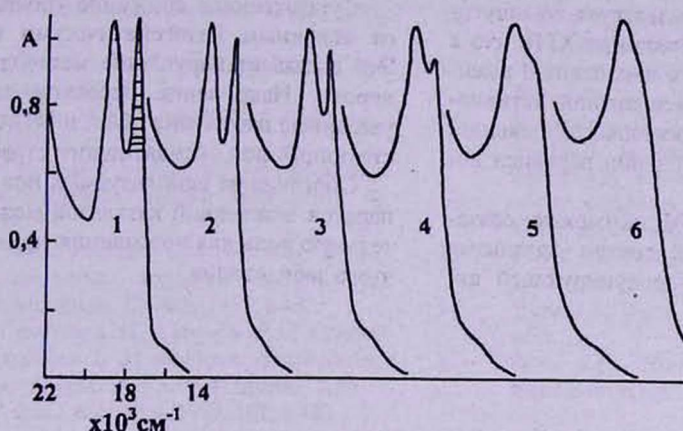


Рис.4. Оптические спектры поглощения мет Нб (ферриНб) под воздействием цит b558III в гомогенной фазе в различные сроки реагирования при 30°C: 10 мин (1), 1,5 ч(2), 2 ч(3), 2,5 ч(4), 3 ч(5) и 3,5 ч (6). Аналогичные изменения формы спектра мет Нб под воздействием ЭМ (гетерогенная фаза) происходят более интенсивно. ЭМ после удаления цит b558III не проявляют метНб-восстанавливающей активности в приведенных условиях

Таблица 1

Относительные изменения (%) эндогенных уровней МАА и МПА крови и их активности при ХГН по сравнению с 100%-ми показателями донорской крови ($P < 0,05$, $n = 10$)

Металлопротеины и их активность	ХГН
Цит b5	+50,5 +/- 6,1
Цит b558III	-12,5 +/- 1,8
Цит b558IV	-21,5 +/- 1,3
Супрол	+118,5 +/- 7,4
Удельная O_2^- -продуцир. активн. супрола	+181,5 +/- 14,3
Удельная O_2^- продуц. активн. цит b558III в гомогенной фазе	+15,5 +/- 2,4
Удельная O_2^- -продуц. активн. цит b558III в гетерогенной фазе	+58,1 +/- 3,9
ЦП	+65,0 +/- 3,8
ТФ	25,2 +/- 2,3
Cu, Zn-СОД	+32,2 +/- 1,6
Каталаза	-95,1 +/- 4,7

Снижение уровня изоформ цит b558 ЭМ при ХГН, очевидно, связано со снижением уровня каталазы соответственно с повышением уровня перекиси водорода (как продукта ферментативной дисмутации O_2^-), которая необратимо деградирует эти гемопротеины [7]. Фактически это приводит к изменению состава ЭМ, снижению их текучести и повышению агрегации эритроцитов. Это оказывает отрицательное воздействие на гемодинамику и гомеостаз кислорода. Видимо, для некоторого «смягчения» этого эффекта повышается O_2^- -продуцирующая и метНб-восстанавливающая активности цит b558III (метНб не способен перенести молекулярный кислород, как это делает оксиНб in vivo, а уровень метНб повышается при анемии, например, при канцерогенезе [9]).

Повышение уровня ЦП может быть связано с повышением уровня и O_2^- -продуцирующей активности супрола, снижая этим иницирование супероксидными радикалами воспалительных процессов и агрегацию супрола. Последний эффект также может отрицательно влиять на гемодинамику, повышая вязкость сыворотки при ХГН.

Относительные изменения (%) АС и ПС сыворотки крови и эритроцитов при ХГН по сравнению с 100%-ми показателями донорской крови ($P < 0,05$, $n=10$)

Компоненты крови	ХГН	
	АС	ПС
Сыворотка	+41,4 +/-3,0	+259,6 +/-31,4
Эритроциты	-62,6 +/- 4,1	+74,6 +/-5,3

Снижение уровня ТФ свидетельствует об остром нарушении метаболизма железа при ХГН, что в данном случае может привести к накоплению высокоактивных ионов Fe^{+2} с проокислительной активностью, способствующих продуцированию гидроксильных радикалов ($HO^{\cdot}$) при расщеплении перекиси водорода [11].

Повышение уровня Cu,Zn-SOD, возможно, связано с действием адаптационных систем организма против увеличения уровня $O_2^{\cdot-}$ -продуцирующей активности цит b558III в ЭМ.

Существенное снижение уровня каталазы является основным патогенетическим механизмом ХГН. Это вызывает нарушение метаболизма перекиси водорода. Накопление перекиси водорода вызывает указанные изменения МАО и МПА, создавая соответствующий фон оксидативного стресса крови.

Обогащение используемых при терапии ХГН препаратов экзогенной каталазой может играть положительную роль для повышения эффективности лечения этого заболевания.

Поступила 27.05.05

Խրոնիկական գլոմերուլոնեֆրիտով հիվանդների արյան մեղադրապրոպեդիկ փոփոխությունների բնութագրական փոփոխությունները

Ա. Ս. Ալեքսանյան, Ռ. Ս. Սիմոնյան, Գ. Ս. Սիմոնյան, Ա. Վ. Բաղդասարյան,
Ս. Ս. Ալեքսանյան, Ս. Ա. Սիմոնյան

Դոմորական արյան ցուցանիշների համեմատ, Խրոնիկական գլոմերուլոնեֆրիտով (ԶԳՆ) հիվանդների արյան մեջ ցիտոքրոմ (ցիտ) b5-ի, սուպրոլի, ցերուլոպլասմինի և Cu,Zn-SOD-ի էնդոգեն մակարդակների աճման ֆոնի վրա դիտվում է էրիթրոցիտների թաղանթային ցիտ b-558-երի իզոմերների, տրանսֆերինի և հատկապես, կատալազի մակարդակների նվազում: Բարձրանում է սուպրոլի $O_2^{\cdot-}$ -ի գոյացման ինչպես մակ ցիտ b-558 III-ի՝ NADPH-կախյալ $O_2^{\cdot-}$ -

գոյացման և մետհեմոգլոբինի վերականգնման ակտիվությունները, հատկապես հետերոգեն ֆազում (էրիթրոցիտների թաղանթներում): Միաժամանակ առկա է արյան շիճուկի և էրիթրոցիտների հակաօքսիդանտային կարգավիճակի աճում, պրոօքսիդանտային կարգավիճակի համեմատ, առաջ բերելով թթվածնի ակտիվ միացությունների մակարդակի աճ (հատկապես ջրածնի պերօքսիդի) և արյան համապատասխան մակարդակի օքսիդատիվ սթրես:

The characteristic changes of endogenous levels of metalloproteins in blood of patients with chronic glomerulonephritis

A.S.Alexanyan, R.M.Simonyan, G.M.Simonyan, A.V.Baghdasaryan, S.S.Alexanyan, M.A.Simonyan

In comparison with the data of donor's blood, on the background of the increased levels of cytochrome (cyt) b5, suprol, ceruloplasmin and Cu,Zn-SOD, a decrease in the levels of isoforms of erythrocytes membranes cyt b558, transferrin and catalase, in particular, is observed.

The suprol's $O_2^{\cdot-}$ -producing activity, as well as the NADPH-dependend $O_2^{\cdot-}$ -producing and methemoglobin-reducing activity of cyt b558III, increases particularly in the heterogen phase (in erythrocytes membranes). In comparison with the prooxidant status, the antioxidant status

of blood serum and erythrocytes simultaneously decreases, causing a rise in the levels of reactive oxygen spe-

cies (hydrogen peroxide) on the corresponding background of blood oxidative stress.

Литература

1. Акопян В.П., Симосян М.А., Манукян А.А. и др. Бюлл.эксп.биол.мед., 2001, 132(11), с.527.
2. Манукян А.А., Симосян М.А., Симосян Р.М., Симосян Г.М. Эксп.клин.мед., 2004, 67(1), с.28.
3. Мжельская Т.И. Бюлл.эксп.биол.мед., 2000, 130, с.124.
4. Симосян Г.М., Симосян Р.М., Бабаян М.А. и др. Мед.наука Армении, 2003, 2, с.31.
5. Симосян М.А., Бабаян М.А., Симосян Г.М. Биохимия, 1995, 60(12), с.1977.
6. Симосян М.А., Симосян Г.М. Способ получения металлопротеинов. Лицензия изобрет.Армпатента № 341. Ереван, 1997.
7. Симосян М.А., Симосян Г.М., Симосян Р.М. В кн.: Актуальные вопросы военной медицины. Гос.мед.унт. им. М.Гераци. Ереван, 1999, с.48.
8. Симосян М.А., Симосян Г.М., Симосян Р.М. Способ получения цитохромов b из мембран эритроцитов. Лицензия изобрет.Армпатента № 908. Ереван, 2001.
9. Abe K., Sugita Y. Eur.J.Biochem., 1979, 101, с.423.
10. Gaertner S.A., Janssen U., Ostendorf T. et al. J.Am.Soc.Nephrol., 2002, 13(12), p.2930.
11. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. Methods Enzimol., 1984, 105, p.47.
12. Nishikimi M., Rao N.A., Jagi K. Biochem. Biophys.Res.Communs, 1972, 46, p.849.
13. Podracka L., Sosinka M., Racz O. et al. Cas.Lek.Cesk., 1996, 135(10), p.313.
14. Simonyan G.N., Simonyan R.M., Babayan M.A., Simonyan M.A., Galayan A.A. Intern.Conf. The role of the biologically active substances in the integrative activity of the organism. Collect.articles,Yerevan, State Med. Univ., 2003, p.148.
15. Turi S., Nemeth I., Tokos A. et al. Free Radic.Biol.Med., 1997, 22(1-2), p.161.
16. Wang J.S., Ger L.P., Tseng H.H. Nephron, 1997, 76(1), p.32.
17. Zhou J.F., Chen J.X., Shen H.C., Cai D. Bio-med.Envirn.Sci., 2002, 15(3), p.233.