

Уровень металлопротеинов антиоксидантной и прооксидантной активности крови пациентов при амилоидозе почек

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

*Институт биохимии им. Г.Х. Бунятына НАН РА, Гюмрийская областная больница
375014, Ереван, ул.П.Севака, 5/1*

Ключевые слова: кровь, металлопротеины, амилоидоз почек

Оксидативный стресс является характерной чертой патогенеза ряда заболеваний (амилоидоз почек, анемия, атеросклероз, уремия). При амилоидозе почек происходит изменение структуры и функции ряда белковых компонентов крови [13,17]. Оксидативное повреждение возникает в результате дисбаланса между анти- и прооксидантными системами крови и клеток почек при амилоидозе, вызывая усиление атеросклероза и анемии после гемодиализа, который снижает активность антиоксидантной защитной системы (витамины Е и С) и содержание кофакторов, ответственных за регулирование ферментативной активности [12]. При гемодиализ-зависимом амилоидозе происходит и карбонильный стресс, что выражается модифицированием белковых структур, окислением аминокислот, липидов, углеводов с образованием гликонированных и липидокисленных конечных продуктов [8]. При этом образуется бета-2-микроглобулин, который модифицируется с N (эпсилон)- (карбоксиметил) лизином (КМЛ), что используется как биомаркер гемодиализ-индуцированного амилоидоза почек. Одновременно происходит связывание КМЛ с гемоглобином [14]. При гемодиализ-индуцированном амилоидозе уровень активных форм кислорода (АФК) значительно повышается, увеличивается активность НАДРН-зависимых супероксид-продуцирующих оксидаз [11–13]. АФК вызывают оксидативное повреждение белков, биомембран и стимулируют образование амилоидного вещества [9]. В этом случае предлагается применение антиоксидантотерапии с использованием витаминов Е, С и N-ацетил цистеина, а также более безвредное и эффективное средство гемодиализа – полисульфолана [16].

Цель работы состоит в определении уровня и активности ряда металлопротеинов крови анти- и прооксидантной активности до и после гемодиализа у больных почечной недостаточностью, обостренной амилоидозом почек.

Материал и методы

Металлопротеины (МП) антиоксидантной активности (МАО) и металлопротеины прооксидантной активности (МПА) получали из крови (по 20 мл) пациентов с амилоидозом почек до и после гемодиализа (11 больных обоих полов, в возрасте 54–61 года и с давностью заболевания 6–7 лет). Гемодиализ осуществляли на диализаторе "Fresenius" (Англия), марки А-2008 С F6. В качестве контроля были использованы показатели донорской крови 8 человек обоих полов. МАО (Cu,Zn-СОД и каталаза из растворимой фракции эритроцитов, церулоплазмин (ЦП) и трансферрин (ТФ) – из сыворотки крови) и МПА (цитохром b5 из растворимой фракции эритроцитов, изоформы цитохрома b558 эритроцитарных мембран (ЭМ) – цитохром b558III, цитохром b558IV, а также O₂-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). Цитохром (цит) b558III и цит b558IV выделяли и очищали без использования детергента, заметно снижающего стабильность указанных гемопротеинов [5]. 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 супероксид-продуцирующую активность цит b558III и супрола определяли нитротетразолиевым синим (НТС) методом путем измерения процента ингибирования (для СОД) или увеличения (для супрола и цит b558III) образования формазана в результате восстановления НТС супероксидными радикалами (O₂⁻) [10]. 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, повышающих образование формазана на 50% [3]. 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 b558III в гетерогенной фазе (в ЭМ) к реакционной смеси добавляли 0,5 мл ЭМ, смешанных с 0,04 М калий фосфатного буфера (КФБ), рН 7,4. Метгемоглобин (метHb)-восстанавливающую активность цит b558III определяли путем измерения процента снижения плотности поглощения альфа-полосы (при 565 нм) мет Hb (ферриHb- Fe^{+3}) в течение 4–8 ч при 30° [6]. Такое снижение плотности поглощения альфа-полосы прямо пропорционально увеличению уровня образовавшегося ферроHb (Fe^{+2} -Hb) при 555 нм. За единицу метHb-восстанавливающей активности цит b558III принимали количество гемопротейна, 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 кюветках спектрофотометра к 2,5 мл свежеполученного метHb из эритроцитов донорской крови и крови больных амилоидозом почек 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 метHb при указанных выше условиях. Оптические спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре «Specord UV-VIS» (Германия) с длиной оптического пути 1 см. Статистическую обработку полученных результатов осуществляли методом вариационной статистики Стьюдента-Фишера с определением критерия достоверности (P).

Результаты и обсуждение

При амилоидозе почек наблюдается существенное

Таблица 1

Относительные изменения (%) уровня и активности МАА и МПА крови у пациентов с почечным амилоидозом до и после гемодиализа по сравнению с показателями донорской крови (P < 0,05, n = 8)

МП и их активность	До гемодиализа	После гемодиализа
Цит b5	-73,3 ± 8,1	-33,2 ± 4,0
Цит b558III	-35,3 ± 3,2	+ 56,8 ± 4,4
Цит b558IV	- 38,4 ± 4,1	- 23,5 ± 1,9
O_2^- -продуцир.активность цит b558III в гетерогенной фазе	+ 7,3 ± 0,5	+ 21,8 ± 2,1
O_2^- -продуцир.активность цит b558III в гомогенной фазе	+ 11,5 ± 0,2	+ 17,8 ± 1,3
МетHb-восстанавл.активность цит b558III в гетерогенной фазе	+ 88,9 ± 7,3	+ 45,4 ± 3,1
МетHb-восстанавл.активность цит b558III в гомогенной фазе	+ 50,0 ± 4,9	+ 15,1 ± 2,0
Нейтральный цит b558	+ 8,9 ± 1,7	+ 65,4 ± 4,3
Степень комплексообразов. цит b558III с Hb	+ 14,2 раз	+ 12,4 раз
Супрол	-55,6 ± 3,4	- 72,2 ± 6,0
O_2^- -продуцир.активность супрола	-14,3 ± 1,6	+ 4,4 ± 0,2
Cu,Zn-СОД	+ 2,1 ± 0,1	+ 2,8 ± 0,3
Каталаза	+ 202,4 ± 31,3	+ 5,7 ± 1,1
ЦП	+ 131,2 ± 13,4	+ 7,7 ± 1,0
ТФ	- 69,5 ± 4,1	+ 4,7 ± 1,2

изменение металлопротеинового состава крови. Заметные отклонения уровня и активности претерпевают как МПА, так и МАА. Эндогенный уровень МПА (цитохромы: b5, b558III и супрол) существенно снижен (табл.1), несколько снижена и супероксид-продуцирующая активность супрола, а НАДРН-зависимая супероксид-продуцирующая активность цит b558III в гомогенной и гетерогенной фазах (в ЭМ) понижена незначительно. С другой стороны, метHb-восстанавливающая активность цит b558III резко повышена, особенно в гетерогенной фазе. Таким образом, ключевой гемопротеин ЭМ – цит b558III претерпевает не только количественные, но и качественные изменения. Причем снижение уровня цит b558III компенсируется повышением его метHb-восстанавливающей активностью. К тому же часть кислого характера цит b558III ЭМ превращается в цит b558III нейтрального характера (табл.1). При амилоидозе почек резко возрастает комплексобразование между цит b558III и Hb непосредственно в ЭМ, поэтому при амилоидозе почек «очищенные» ЭМ имеют еще красноватый цвет по сравнению с ЭМ донорской крови. Проникновением в ЭМ Hb образует нестабильное комплексное соединение с цит b558III с характерным оптико-спектральным показателем. Этот комплекс образуется за счет NO[•], присутствующей в лигандном окружении цит b558III как пятый или шестой лиганд в лигандном окружении цит b558III [3]. Существует прямо пропорциональная зависимость между степенью формирования комплекса Hb с цит b558III и увеличением текучести ЭМ, что способствует проникновению Hb в ЭМ. Это новый механизм оксидативного повреждения и дестабилизации ЭМ. Эффект дестабилизации ЭМ и увеличения степени комплексобразования характерен для многих заболеваний [2], однако степень такого комплексобразования специфична для данного заболевания и может быть использована как новый чувствительный биомаркер дестабилизации ЭМ и гемодиализ-зависимого амилоидоза.

При амилоидозе почек существенно снижены уровень и супероксид-продуцирующая активность другого МПА сыворотки – супрола. Это свидетельствует о существенном изменении состава супрола скорее всего из-за перекисного окисления его фосфолипидных остатков. Происходит снижение стабильности супрола и увеличение степени необратимого агрегирования

через 1–1,5 ч после выделения. Это может изменить вязкость сыворотки и в целом крови и изменить не только гемодинамику, но и стимулировать тромбообразование, особенно в бляшках сосудов, вызывая атеросклероз, что в действительности наблюдается при гемодиализ-зависимом амилоидозе почек [13]. Резкое увеличение уровня белка острой фазы – ЦП свидетельствует о наличии воспалительных процессов при атеросклерозе [2]. Однако заметное снижение уровня ТГФ в сыворотке крови пациентов с амилоидозом почек свидетельствует об осязательном нарушении метаболизма железа, что может вызывать и анемию [17]. Об оксидативном стрессе крови свидетельствует и тот факт, что расчетные суммарные уровни МАА (антиоксидантный статус – АС) и МПА (прооксидантный статус – ПС) в сыворотке крови и эритроцитах при амилоидозе почек существенно различаются. Наблюдается повышение АС по сравнению с ПС. При этом уровень супероксид-продуцирующих систем (цит b558III и супрол) существенно снижен. К тому же уровень каталазы повышен почти в 2 раза, факт, свидетельствующий о том, что при амилоидозе почек существенно изменяется метаболизм перекиси водорода, а увеличение АС обусловлено повышением уровня каталазы (табл.2). Снижение уровня цит b558III ЭМ, а также цит b5 может быть результатом непосредственного воздействия перекиси водорода на эти гемопротеины, которые деградируются этой перекисью [1]. С другой стороны, повышение уровня перекиси водорода (продукта ферментативного дисмутирования супероксидных радикалов [7]) может быть связано с увеличением уровня супероксидов, продуцируемых другими ферментными системами клеток плазмы (НАДРН-зависимые супероксид-продуцирующие оксидоредуктазы), что действительно имеет место при гемодиализ-зависимом амилоидозе почек [11, 13, 16]. Другим источником продуцирования супероксидов может быть перекись водорода, расщепляющаяся при pH 7.4 и выше [15]. Таким образом, механизм оксидативного повреждения крови при амилоидозе почек до диализа может быть связан с нарушением физиологического равновесия между АС и ПС, усилением процесса продуцирования перекиси водорода и супероксидов, а также с количественно-качественными изменениями МПА и МАА и дестабилизацией ЭМ.

Таблица 2

Относительные изменения (%) АС и ПС сыворотки крови и эритроцитов у пациентов с амилоидозом почек до и после диализа по сравнению со 100% контрольными показателями

Компоненты крови	До диализа		После диализа	
	АС	ПС	АС	ПС
Сыворотка крови	+ 61,7 ± 4,2	-68,9 ± 3,6	+ 12,4 ± 1,7	-68,4 ± 3,9
Эритроциты	+ 202,4 ± 31,3	-128,1 ± 17,4	+ 5,7 ± 0,3	= 30,5 ± 2,4

После гемодиализа картина несколько изменяется. Резко повышается уровень МПА эритроцитов, особенно цит b558III (табл.1), несколько увеличивается супероксид-продуцирующая активность цит b558III, а его метHb-восстанавливающая активность, хотя почти снизилась наполовину, однако остается выше нормы. Выход нейтрального цит b558 резко повышается, что свидетельствует о существенном изменении состава цит b558III после гемодиализа. Остается выше и степень комплексообразования Hb с цит b558III в ЭМ. Нетрудно заметить, что на фоне повышения уровня цит b558 происходит повышение его НАДРН-зависимой супероксид-продуцирующей активности. В результате гемодиализа уровень супрола продолжает падать, хотя продуцирование супероксидов имеет тенденцию к повышению. Можно констатировать,

что гемодиализ практически не вызывает регулирования уровня МПА и повышения стабильности ЭМ. Однако этот гемодиализ практически регулирует уровень МАА (каталаза, ТФ, ЦП), хотя уровень Cu,Zn-СОД не изменяется в результате гемодиализа. Эти изменения отражаются на АС и ПС сыворотки крови и эритроцитов. АС имеет тенденцию к регулированию, ПС сыворотки крови снижается (из-за снижения уровня супрола), а в эритроцитах несколько повышен по сравнению с показателями донорской крови.

Таким образом, после гемодиализа дисбаланс между АС и ПС «смягчается», хотя стабильность ЭМ и супрола остается еще пониженной. Этим двум факторам необходимо придавать особое значение для повышения эффективности гемодиализа.

Поступила 12.12.05

Երիկամային ամիլոիդոզով հիվանդների արյան հակաօքսիդանտային և պրոօքսիդանտային ակտիվությունը մետաղապրոտեինների մակարդակները

Ա.Ս. Ալեքսանյան, Ռ.Ս. Միմոնյան, Ա.Վ. Բաղդասարյան, Ա.Ա. Ստեփանյան, Մ.Ա. Միմոնյան

Երիկամային ամիլոիդոզով հիվանդների արյան մեջ դիտվում է հակա- և պրոօքսիդանտային ակտիվությունը մետաղապրոտեինների էնդոգեն մակարդակների միջև առկա հաշվեկշռի որոշակի շեղում: Հետազոտվել է հետո արյան շիճուկի և էրիթրոցիտ-

ների հակաօքսիդանտային և պրոօքսիդանտային կարգավիճակների միջև առկա հաշվեկշռի շեղումը նվազում է, սակայն սուպրոլի և էրիթրոցիտների քաղամբների կայունությունը դեռևս մնում է ցածր:

The level of blood metalloproteins of antioxidative and prooxidative activities in patients with renal amyloidosis

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

In patients with renal amyloidosis a characteristic disbalance between the endogeneous levels of blood metalloproteins anti- and prooxidative activities takes place. After hemodialysis the disbalance between antioxidative

and prooxidative statuses of the blood serum and erythrocytes reduces. However, the stability of suprol and erythrocytes membrane is still low.

Լիտերատուրա

1. Սիմոնյան Գ.Մ., Գրիգորյան Գ.Գ., Սիմոնյան Ր.Ա., Սիմոնյան Մ.Ա. В кн.: Актуальные вопросы военной медицины. Гос.мед. университет, Ереван, 1999, с.48.
2. Սիմոնյան Գ.Մ., Ներսեսյան Ա.Կ., Սիմոնյան Ր.Մ., Բաբայան Մ.Ա., Սիմոնյան Մ.Ա., Գալոյան Ա.Ա. Нейрохимия, 2005, 22, с.125.
3. Սիմոնյան Գ.Մ., Սիմոնյան Ր.Մ., Բաբայան Մ.Ա., Կարապետյան Ա.Վ., Սիմոնյան Մ.Ա. Мед. наука Армения, 2003, XLIII, 1 с.30.
4. Սիմոնյան Մ.Ա., Սիմոնյան Գ.Մ. Лицензия изобрет. № 341 Армпатента. Ереван, 1997.
5. Սիմոնյան Մ.Ա., Սիմոնյան Գ.Մ., Սիմոնյան Ր.Մ. Лицензия изобрет. № 908 Армпатента. Ереван, 2001.
6. Սիմոնյան Ր.Մ., Սիմոնյան Գ.Մ., Բաբայան Մ.Ա., Սիմոնյան Մ.Ա. Мед. наука Армения, 2004, XLIV, 1, с. 43.
7. Fridovich I. Ann. Rev.Biochem., 1995, 64, p.97.
8. Inagi R., Miyata T. Blood Purif., 1999, 17, p.95.
9. Nakamura M., Ando Y. Rinsho Byori, 2003, 51, p.140.

10. *Nishikimi M., Rao N.G., Jagi K.* Biochem.Biophys.Res.Communs, 1972, 62, p.849.
11. *Morena M., Delbosc S., Dupuy A.M., Canaud B., Cristol J.P.* Hemodial.Int., 2005, 9, p.37.
12. *Morena M., Cristol J.P., Canaud B.* Blood Purif., 2000, 18, p.191.
13. *Morena M., Cristol J.P., Senecal L. et al.* Kidney Int.Suppl., 2002, 80, p.109.
14. *Motomiya Y., Oyama N., Iwamoto H., Uchimura T., Marujama I.* Kidney Int., 1998, 54, p.1357.
15. *Simonyan M.A.* Biochem.Biophys.Res.Communs, 1982, 108, p.1751.
16. *Tomo T., Matsuyama K., Nasu M.* Blood Purif., 2004, 22, p.72.
17. *Wratten M.L., Tetta C., Ursini F., Sevanian A.* Kidney Int.Suppl., 2000, 76, p.S126.