

Изменение уровня и активности металлопротеинов крови под влиянием зинацефа и капотена *in vitro* и у больных гломерулонефритом и пиелонефритом

А.С.Алексамян, С.С.Алексамян, Г.М.Симонян, М.А.Бабаян, М.А.Симонян

Институт биохимии им.Г.Х. Бунятыана НАН РА

375014, Ереван, ул. П.Севака, 5/1

Ключевые слова: зинацеф, капотен, гломерулонефрит, пиелонефрит, кровь

Почечная недостаточность при хроническом гломерулонефрите (ХГН) и хроническом пиелонефрите (ХПН) характеризуется нарушением физиологического равновесия между продуцирующими и утилизирующими активные формы кислорода (АФК) системами, вызывая оксидативное повреждение крови [2, 3]. При этом в большинстве случаев наблюдается снижение уровня антиоксидантной защитной системы в крови и других тканях млекопитающих [3–5, 10], а препараты антиоксидантной активности – витамин Е [14], мелатонин [12], а также лекарственные препараты – церивастин [11] и карведилол [13] оказывают противовоспалительный эффект. Однако применяемые при терапии почечных заболеваний некоторые лекарства – цефазолин, фуросемид, дексаметазон и другие вызывают заметное изменение свойств металлопротеинов (МП) антиоксидантной активности (МАО) и МП прооксидантной активности (МПО) крови, чем обусловлено снижение эффективности этих лекарственных средств [2]. Эффективность других лекарственных препаратов – зинацефа (цефуроксима натрия) компании Glaxo Smith Kline (Великобритания) и капотена компании Bristol – Myers Squibb (Великобритания) также не всегда удовлетворительна.

Целью работы являлось определение побочных эффектов зинацефа и капотена на МП крови больных ХГН и ХПН после 3-месячного курса лечения этими лекарствами, а также механизмы непосредственного влияния последних на МАО и МПО *in vitro*.

Материал и методы

Была обследована кровь больных ХГН (18 мужчин и женщин в возрасте 38–65 лет с давностью заболевания 3–6 лет) и ХПН (12 мужчин и женщин в возрасте 58–73 лет с давностью заболевания 2–4 года), получивших 3-месячный курс лечения зинацефом и капотеном с ежедневной дозой 100 мг. Для исследования

in vitro из таблеток капотена по 25 мг извлекали действующее вещество в растворимую фазу путем смешивания порошка с водой и центрифугирования. Супернатант является истинным раствором капотена, который был использован для воздействия на активность и оптико-спектральные характеристики МАО и МПО. Были использованы водные растворы электрофоретически гомогенных препаратов МАО и МПО (супрол имеет 97% чистоты) и по 10 мг/мл капотена или зинацефа (последний полностью растворяется в воде).

МАО и МПО получали из крови (по 15 мл) больных ХГН и ХПН биотехнологическим способом [8], без использования детергента для сольюбилизации цитохромов (цит) b558 из эритроцитарных мембран (ЭМ) [9]. МАО и МПО в соответствующих количествах (2–10 мг/мл) инкубировали с зинацефом и капотеном (по 10 мг/мл) в течение 24 ч при 4°, затем определяли характерные изменения свойств МП. Полученные результаты были сравнены с контрольными данными (показатели донорской крови).

Из 200 мл донорской крови получали МАО (Cu,Zn-СОД и каталаза – из растворимой фракции эритроцитов, церулоплазмин (ЦП) и трансферрин (ТФ) из сыворотки крови) и МПО (супрол, цит b5 и изоформы цит b558 ЭМ) биотехнологическим способом [8, 9], очищая их до электрофоретически гомогенного состояния (супрол очищается до 95–97%). При этом белковые фракции сыворотки, цитозоля эритроцитов и ЭМ подвергали ионообменной хроматографии на целлюлозах ДЕ-52 и КМ-52 (Whatman, Англия), сефадексе ДЕАЕ А-50 (Pharmacia, Швеция) и гель-фильтрации на сефадексах G-75 и G-150 (Pharmacia).

Количество МП определяли измерением плотности характерного максимального поглощения для изоформ цит b558III при 530 нм, супрола – 430, ТФ – 470, ЦП – 610, Cu,Zn-СОД – 680 и каталазы – 510 нм. Супероксиддисмутазную (СОД) активность Cu,Zn-СОД

и супероксид-продуцирующую активность супрола и цит b558III определяли с использованием нитротетразолиевого синего (НТС) путем вычисления процента подавления (в случае СОД) или стимулирования (в случае супрола и цит b558III) образования формазана (при 560 нм) при восстановлении НТС супероксидными радикалами (O_2^-). За единицу СОД активности принимали количество фермента, которое вызывает 50% ингибирование образования формазана. За единицу O_2^- -продуцирующей активности супрола или цит b558III принимали количество белка, способного стимулировать на 50% образование формазана.

Каталазную активность определяли перманганатометрическим титрованием раствора перекиси водорода, рассчитывая количество белка, которое расщепляет 0,1 М перекиси водорода за 1 мин при 20°. Удельная активность СОД, каталазы, а также O_2^- -продуцирующая активность супрола или цит b558III была определена в расчете на 1 мг белка.

Метгемоглобин (метНб)-восстанавливающая активность цит b558III (с A_{530} в реакционной смеси 0,03) была определена кинетическим методом путем измерения снижения величины плотности максимального оптического поглощения альфа-полосы метНб при 565 нм в течение 2–3ч при 30° после 15–20 ч инкуби-

рования реакционной смеси в отсутствие и присутствии определенного количества цит b558III. За единицу метНб-восстанавливающей активности принимали количество цит b558III, снижающего плотность максимального оптического поглощения альфа-полосы метНб в размере 0,05 в течение часа при 30°.

Оптические спектральные измерения осуществляли на спектрофотометре «Specord UV/VIS» (Германия) с длиной оптического пути 1 см. Ионообменную хроматографию и гель-фильтрацию белковых фракций осуществляли в стеклянных колонках размерами: 3 x 20 см, 2 x 20 см, 1 x 20 см и 2,5 x 95 см.

Статистическую обработку полученных результатов осуществляли методом вариационной статистики Стьюдента-Фишера с определением критерия достоверности P.

Результаты и обсуждение

В результате трехмесячного курса лечения больных ХГН и ХПН зинацефом и капотеном наблюдается резкое увеличение уровня цит b5, переносчика электрона для НАДРН-метНб редуктазы в цитозоле эритроцитов особенно при ХГН (табл. 1). Это может быть

Таблица 1

Относительное изменение (%) уровня и активности МПА и МПА в крови больных ХГН (1) и ХПН (2) после прохождения трехмесячного курса лечения зинацефом и капотеном, по сравнению со 100% контрольными показателями (донорская кровь), P < 0,05, n = 6

МП, активность	1	2
Цит b5	+ 122,4±17,4	+48,7±3,8
Сумма цит b558 ЭМ	-22,3±1,4	-61,2 ±4,9
Цит b 558III	-43,2±4,0	-77,9 ±8,4
Цит b558 нейтр.характер	+ 36,4±3,4	+41,0 ±3,2
Супрол	+18,3±2,6	+26,4±3,1
Супероксид-продуцир. активность цит b558III в гомогенной фазе	+20,7±3,2	+29,4±5,1
Супероксид-продуцир. активность цит b558III в гетерогенной фазе (в ЭМ)	-30,9±3,4	-35,7±4,1
МетНб-восстанавл. активность цит b558III в гомогенной фазе	-9,1±1,3	-18,6±2,4
МетНб-восстанавл. активность цит b558III в гетерогенной фазе	-15,3±1,8	-61,4±4,4
ЦП	+50,2±3,1	+4,9±0,5
ТФ	+31,4±3,0	+34,7±2,9
Cu,Zn-СОД	-14,7±2,1	-1,2±0,07
Каталаза	+320,6±37,4	+410,0±51,3
Супероксид.продуцир.активность супрола	-40,0±2,4	-9,4±2,1
Цит b558IV	-35,2 ±3,3	-38,9 ±2,7

связано с определенным ослаблением подвижности эритроцитов (гиподинамия) [1]. Существенно изменяется гемопротеиновый состав ЭМ особенно при ХПН. Это обусловлено снижением уровня ключевой изоформы цит b558 ЭМ – цит b558III и повышением уровня нейтрального характера изоформы цит b558. Снижение уровня цит b558III может быть обусловлено повышением степени агрегации этого гемопротеина в гетерогенной фазе (в ЭМ). В пользу этого предположения свидетельствует то обстоятельство, что в гетерогенной фазе как НАДРН-зависимая супероксид-продуцирующая, так и метНб-восстанавливающая активность цит b558III более подавлена, чем в гомогенной фазе. Этим путем зинацеф и капотен изменяют (снижают) текучесть ЭМ, что может отрицательно влиять на гемодинамику и гомеостаз кислорода у больных ХГН и ХПН. Положительным фактором лечения этими лекарствами можно считать увеличение уровня супрола – НАДРН-зависимого супероксид-продуцирующего липопротеина сыворотки высокой плотности со снижением его супероксид-продуцирующей активности (особенно при ХГН). Фактически наблюдается стабилизация супрола и сохранение вязкости сыворотки, что является существенным фактором нормализации гемодинамики.

Переходя к МАА можно констатировать, что приведенное лечение положительно влияет на уровень

ЦП, практически регулируя его уровень у больных ХПН, в отличие от больных ХГН, у которых наблюдается существенное повышение эндогенного уровня ЦП. Это свидетельствует о том, что при ХГН в организме имеются воспалительные процессы, против чего вырабатывается ЦП – белок острой фазы с противовоспалительной активностью [6]. Уровень другого МАА – ТФ практически одинаково повышен как при ХГН, так и при ХПН. Уровень же Cu,Zn-СОД в цитозоле эритроцитов практически нормализуется при ХПН и еще несколько снижен при ХГН. Резкое повышение уровня каталазы наблюдается особенно у больных при ХПН. Это свидетельствует о стимуляции продуцирования перекиси водорода, которая в свою очередь может быть причиной снижения (деградирования) уровня цит b558 ЭМ [7], что в действительности наблюдается у больных при ХПН.

Для решения вопроса, какими механизмами действуют зинацеф и капотен на состояние МАА и МПА *in vivo*, необходимо определить характер их воздействия на эти МП *in vitro*. В результате 24-часового инкубирования с этими лекарствами уровень цит b5 не изменяется. Зинацеф в небольших количествах снижает плотность максимального оптического поглощения цит b558III (при 530 нм), а капотен не изменяет его (табл.2).

Таблица 2

Относительное изменение (%) уровня и активности МАА и МПА после 24ч инкубирования с зинацефом (1) и капотеном (2), по сравнению с 100% контрольными показателями (показатели в отсутствие лекарств), $P < 0,05$, $n=8$

МП, активность	1	2
Цит b5	+3,2 ±0,2	+2,4 ±0,6
Цит b558III	-12,3 ±1,6	-26,1 ±3,3
Супероксид-продуцир. активность цит b558III в гомогенной фазе	+8,5 ±1,1	+20,9 ±1,6
Супероксид-продуцир. активность цит b558III в гетерогенной фазе	+15,3 ±2,2	+12,9 ±1,4
МетНб-восстанавл.активность цит b558III в гомогенной фазе	+21,3 ±2,6	-12,2 ±1,3
МетНб-восстанавл. активность цит b558III в гетерогенной фазе	+15,3 ±2,8	-6,8 ±0,7
Степень агрегации супрола	+15,1 ±2,5	+10,9 ±1,1
Супероксид-продуцир. активность супрола	-17,3 ±2,4	-21,7 ±2,6
ЦП	-12,3 ±1,2	-21,5 ±3,0
ТФ	+4,4 ±0,3	+2,3 ±0,6
Cu,Zn-СОД	-28,1 ±4,2	-52,3 ±6,1
Каталаза	+18,6 ±3,1	22,2 ±1,7

Зинацеф практически мало изменяет НАДРН-зависимую супероксид-продуцирующую и метНб-восстанавливающую активность цит b558III как в гомогенной, так и гетерогенной фазах (в ЭМ), а капотен снижает метНб-восстанавливающую активность супрола и его супероксид-продуцирующую активность *in vitro*. Относительно в небольших количествах они необратимо снижают и плотность максимального оптического поглощения ЦП (при 610 нм) и практически не влияют на состояние ТФ. Однако они снижают активность Cu,Zn-СОД (особенно капотен) и несколько увеличивают активность каталазы в приведенных условиях *in vitro*. Можно констатировать, что изменения

уровня и активности МАА и МПА *in vitro* и *in vivo* в большинстве случаев схожи по своей направленности, но отличаются по диапазону, особенно в случае каталазы. Побочные эффекты этих лекарств связываются с резким увеличением активности каталазы, увеличением уровня нейтрального характера цит b558 ЭМ и снижением уровня остальных изоформ цит b558 ЭМ. Эти МП играют ключевую роль в процессе регулирования кислородного гомеостаза и гемодинамики. Их нерегулируемость является новым и чувствительным маркером невысокой эффективности зинацефа и капотена.

Поступила 27.09.06

Արյան մետաղապրոտեինների մակարդակի փոփոխությունը զինացեֆի և կապոտենի ազդեցության ներքո *in vitro* և գլոմերուլոնեֆրիտով ու պիելոնեֆրիտով հիվանդների մոպ

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

Արյան հակա- և պրոօքսիդանտային ակտիվությամբ օժտված մետաղապրոտեինների մակարդակի և ակտիվության փոփոխությունների ուղղությունները զինացեֆ և կապոտեն դեղամիջոցների ազդեցության ներքո *in vitro* և գլոմերուլոնեֆրիտով ու պիելոնեֆրիտով հիվանդների՝ այդ դեղամիջոցներով բուժում ստանալուց հետո հիմնականում մոտ են, տարբերվում են այդ փոփոխությունների ամպլիտուդները: Նշված դեղամիջոցների կողմնակի ազդե-

ցություններն առնչվում են կատալազի ակտիվության կտրուկ աճի, էրիթրոցիտների թաղանթային ցիտոքրոմ (ցիտ) b558-երի մակարդակի կտրուկ նվազման և չեզոք ցիտ b558-ի մակարդակի աճման հետ: Այդ մետաղապրոտեինները ունեն կարևոր դեր թթվածնային հոմեոստազի և հեմոդինամիայի կարգավորման գործում և դրանց մակարդակների չկարգավորումը հանդիսանում է զինացեֆի և կապոտենի արդյունավետության նվազման նոր գործոն:

Alteration of the blood metalloprotein levels under the influence of zinacef and capoten *in vitro* and in patients with glomerulonephritis and pyelonephritis

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

The directions of alteration of the level and action of the metalloproteins of anti- and prooxidative activity under the influence of pharmaceuticals Zinacef and Capoten *in vitro* and after the therapy by these pharmaceuticals during 3 months of patients with chronic glomerulonephritis and chronic pyelonephritis on the whole are similar and differ only by their amplitude. The secondary effects of Zinacef and Capoten are connected with the decrease in the level of isoforms of cytochrome (cyt)

b558 from erythrocyte membranes (EM), sharp elevation of the catalase activity, and the level of neutral cyt b558 EM. These metalloproteins have an important role in regulation of the oxygen homeostasis and hemodynamics. The degree of non-regulation of their levels is a new factor causing decrease in the effectiveness of these pharmaceuticals.

Литература

- Акопян В.П., Симосян М.А., Манукян А.А., Симосян Р.М., Акопян А.А. Бюлл.эксперим.биол.мед., 2001, 1321 (5), с.1062.
- Алексян А.С. Вopr.теорет.клин.мед., 2006, 9(3), с.42.
- Алексян А.С., Симосян Г.М., Алексян С.С., Симосян М.А. ДНАН РА, 2006, 106(2), с.169.
- Алексян А.С., Симосян Г.М., Симосян Р.М., Степанян А.А., Алексян С.С., Симосян М.А. Биол.ж.Армении, 2005, 3-4, с.170.
- Алексян А.С., Симосян Р.М., Симосян Г.М., Багдасарян А.В., Алексян С.С., Симосян М.А. Мед.наука Армении. 2006, XLVI, с.81.
- Мжельская Т.И. Бюлл.эксперим.биол.мед., 2000, 130, с.124.
- Симосян Г.М., Симосян Р.М., Симосян М.А. В кн.: Актуальные вопросы военной медицины. ЕрГМУ им. М.Гераци, Ереван, 1999, с.48.
8. Симосян М.А., Симосян Г.М. Способ получения металлопротеинов крови. Лицензия изобрет. No 341 Армпатента. Ереван, 1997.
9. Симосян М.А., Симосян Г.М., Симосян Р.М. Способ получения цитохромов b из мембран эритроцитов. Лицензия изобрет.No 908 Армпатента. Ереван, 2001.
10. Dubey N.K., Yadav P., Dutta A.K. et.al. Indian Pediatr., 2000, 37, p.153.
11. Nakamura T., Ushiyama C., Hirokawa K. et al. Nephrol.Dial.Transplant., 2002,17, p.798.
12. Sener G., Paskaloglu K., Toklu H. et al. J.Pineal Res., 2004, 36, p.232.
13. Singh D., Chander V., Chopra K. Am. J. Nephrol., 2003, 23, p.415.
14. Van der Branden C., Deman C., Ceyskens B. Nephron., 2002, 91, p.129.