

# Шляхи активації перекисного окиснення ліпідів і білків при хронічній хворобі нирок

Л.В. Король

Державна установа «Інститут нефрології НАМН України», Київ; E-mail: lesyakorol@meta.ua

*Досліджували спонтанне та металіндуковане окиснення ліпідів та протеїнів при моделюванні in vitro шляхів перекисного окиснення за утворенням малонового діальдегіду (МДА) та карбонільних груп протеїнів (КГП) у пацієнтів з хронічними пієлонефритом (хПН) та гломерулонофритом (хГН) без порушення екскреторної функції нирок. Встановлено, що у хворих на хПН і хГН порівняно з групою практичноздорових осіб вміст МДА в сироватці крові збільшувався у 2 та 2,3 раза відповідно, в еритроцитах – на 14 та 29%, вміст КГП – в 1,5 та 2 рази. Відмічено більш виразне зростання продукції МДА та КГП в крові у пацієнтів з хГН. Стимуляція in vitro процесів пероксидації сприяла суттєвому зростанню цих показників порівняно з базовим рівнем до стимуляції. При моделюванні аскорбат- та НАДФН-залежного шляхів пероксидації ліпідів та протеїнів констатовано збільшення продукції МДА та КГП в обох групах пацієнтів, особливо при другому шляху, що необхідно враховувати при корекції окислативних порушень та призначенні антиоксидантної терапії.*  
*Ключові слова:* окислативний стрес; перекисне окиснення ліпідів; окисна модифікація протеїнів; хронічні захворювання нирок.

## ВСТУП

Останнім часом все більше досліджень присвячено вивченню механізмів розвитку окислативного стресу, що виникає як результат дисбалансу між окислативними та антиоксидантними процесами при запаленні в нирках [1–5]. Несвочасне блокування окислативних реакцій посилює негативну дію активних метаболітів кисню (АМК) на клітини нирок та призводить до переходу патологічного процесу в хронічний [3,5]. Відомо, що нормальний перебіг окиснення в організмі здійснюється двома шляхами: оксидазним та оксигеназним. Оксидазний шлях окиснення реалізується за допомогою ензимів з утворенням малоактивних продуктів та сприяє модифікації мембранних фосfolіпідів, виконуючи функції синтезу біологічно активних речовин, детоксикації, метаболізму ендогенних субстратів [6,7]. Оксигеназний шлях окиснення супроводжується утворенням вільних радикалів і

найчастіше ініціюється  $Fe^{2+}$  [8,9], має руйнівний характер, призводить до структурних порушень клітинних елементів і загибелі самих клітин [6,8]. У нормі ці процеси регулюються антиоксидантною системою. При розвитку запалення відбувається інтенсивне утворення  $Fe^{2+}$ , і внаслідок чого активується здебільшого неензимний шлях окиснення ліпідів та протеїнів [8,9].

Мета нашої роботи – дослідити шляхи активації перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) та протеїнів крові у пацієнтів при хронічній хворобі нирок без порушення їх екскреторної функції.

## МЕТОДИКА

Обстежено 57 хворих на хронічний пієлонефрит (хПН, I група), 42 – на гломерулонофрит (хГН, II група). До контрольної групи увійшли 30 практично здорових осіб. Після 12-годинного голодування в крові визначали активність процесів ПОЛ за накопиченням

малонового діальдегіду (МДА) при моделюванні *in vitro* Fe<sup>2+</sup>-індукованого неензимного (аскорбатзалежного) та ензимного (НАДФН<sub>2</sub>-залежного) шляхів окиснення. Для ініціації використовували: середовище 1 – 25ммоль/л тріс-НСІ-буфер (рН7,4) та 20мкмоль/л FeSO<sub>4</sub>; середовище 2 – 0,85 мл 0,1моль/л тріс-НСІ-буфера (рН7,4), по 0,05мл 1ммоль/л ЕДТА і FeSO<sub>4</sub> та 0,3 ммоль/л Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub>; середовище 3 – 25ммоль/л тріс-НСІ-буфер (рН7,4), 20мкмоль/л FeSO<sub>4</sub> та 0,35мг аскорбінової кислоти (для моделювання неензимного окиснення) та середовище 4 – 25ммоль/л тріс-НСІ-буфер (рН7,4), 0,5мкмоль/л НАДФН, 2 мкмоль/л нікотинамід, 4 мкмоль/л АДФ, 20мкмоль/л FeSO<sub>4</sub> (для моделювання шляху ензимного окиснення). Проби інкубували годину при 37°C, денатурували 20%-м розчином трихлороцтової кислоти та центрифугували при 3000g 20 хв. У супернатанті за реакцією з тіобарбітуровою кислотою визначали

вміст МДА на спектрофотометрі СФ-26 (λ=532нм), використовуючи коефіцієнт молярного поглинання 156000М<sup>-1</sup>. До денатурованих протеїнових осадів доливали 1,0мл 0,1моль/л розчину 2,4-динітрофенілгідразину для визначення вмісту карбонільних груп протеїнів (КГП) та інкубували 1 годину, потім центрифугували при 3000g 20 хв. Отриманий осад для екстракції ліпідів і 2,4-динітрофенілгідразину, що не прореагував з КГП, промивали сумішшю етанол:етилацетат (1:1) та надалі розчиняли в 8 моль/л сечовині. В супернатанті визначали вміст КГП на спектрофотометрі СФ-26 (λ=363нм) [2,10]. В роботі було використано реактиви: 2,4-динітрофенілгідразин, ЕДТА, НАДФН, АДФ, нікотинамід фірми “Sigma-Aldrich” (США), сечовина, тріс, трихлороцтова та тіобарбітурова кислоти фірми “Merck” (Німеччина), інші були вітчизняного виробництва. Статистичну обробку отриманих результатів проводили за

**Вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів та білків при моделюванні шляхів окиснення в крові у пацієнтів з хронічними запальними захворюваннями нирок (M±m)**

Середовище	Малоновий діальдегід, мкмоль/л				Карбонільні групи протеїнів, ум.од./мл	
	сироватка крові		еритроцити		протеїнів, ум.од./мл	
	I група	II група	I група	II група	I група	II група
До стимуляції (базовий рівень)	269±11	291±13	626±24	709±21	1,76±0,23	2,31±0,19
Інкубаційні середовища	P <sub>н</sub> <0,01	P <sub>н</sub> <0,01		P <sub>н</sub> <0,01	P <sub>н</sub> <0,01	P <sub>н</sub> <0,01
1	361±28	392±24	760±35	883±21	1,98±0,18	3,12±0,24
	P <sub>6</sub> <0,01	P <sub>6</sub> <0,001	P <sub>6</sub> <0,01	P <sub>6</sub> <0,001 P <sub>I-II</sub> <0,01		P <sub>6</sub> <0,02 P <sub>I-II</sub> <0,01
2	481±26	528± 21	”-----“	”-----“	3,66±0,21	6,1±0,23
	P <sub>6</sub> <0,001	P <sub>6</sub> <0,001			P <sub>6</sub> <0,001	P <sub>6</sub> <0,001 P <sub>I-II</sub> <0,01
3	370±11	469±18	699±41	888±35	2,31±0,15	3,24±0,21
	P <sub>6</sub> <0,001	P <sub>6</sub> <0,001 P <sub>I-II</sub> <0,01		P <sub>6</sub> <0,01 P <sub>I-II</sub> <0,01	P <sub>6</sub> <0,02	P <sub>6</sub> <0,01 P <sub>I-II</sub> <0,01
4	427±22	498±17	757±38	919±37	2,32±0,21	3,52±0,19
	P <sub>6</sub> <0,001	P <sub>6</sub> <0,001 P <sub>I-II</sub> <0,02	P <sub>н</sub> <0,01	P <sub>6</sub> <0,01 P <sub>I-II</sub> <0,01		P <sub>6</sub> <0,02 P <sub>I-II</sub> <0,01

P<sub>н</sub><0,01 – вірогідність при порівнянні з показниками у здорових осіб

P<sub>6</sub><0,01 – вірогідність при порівнянні з показниками базового рівня у групі

P<sub>I-II</sub><0,01 – вірогідність при порівнянні з показниками між групами I-II

допомогою програми “Excel-7” Вірогідність різниці оцінювали за критерієм t Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.

Встановлено, що у пацієнтів при хронічних хворобах нирок зростає вміст МДА в сироватці крові в 2,17 раза (в контролі  $119 \pm 35$ ,  $P < 0,001$ ) та в еритроцитах – на 20% (в контролі  $549 \pm 31$ ,  $P < 0,01$ ) і збільшувалася спонтанна продукція КГП у сироватці крові у 1,76 раза (в контролі  $1,13 \pm 0,12$ ,  $P < 0,02$ ). При аналізі показників залежно від типу запального процесу та нозології первинного ураження нирок встановлено, що для I групи порівняно з показниками у здорових людей характерно зростання спонтанної продукції МДА в сироватці крові у 2 рази ( $P < 0,02$ ) та еритроцитах – на 14% ( $P > 0,05$ ); а для пацієнтів II групи – збільшення вмісту МДА в сироватці крові у 2,3 раза та еритроцитах – на 29% (таблиця).

Стимуляція іонами заліза процесів ПОЛ (середовище 1) сприяла суттєвому зростанню вмісту МДА в дослідних зразках порівняно з базовим рівнем (до стимуляції): в сироватці крові в обох групах на 34%, а в еритроцитах – на 21% та 24% відповідно (див. таблицю). При інкубації з компонентами середовища 2 встановлено більш суттєве зростання вмісту МДА в сироватці крові – до 80% в обох групах пацієнтів порівняно з показниками до стимуляції. У разі ініціації аскорбатзалежного ПОЛ (середовище 3) констатовано збільшення продукції МДА (порівняно з базовим рівнем) в сироватці крові у I групі – на 37% та у II групі – на 61%; а в еритроцитах вірогідно лише у II групі – на 25%. При аналізі результатів моделювання НАДФН-залежного ПОЛ (середовище 4) у I групі спостерігали зростання вмісту МДА в сироватці крові на 58% та еритроцитах – на 20% порівняно зі значеннями до стимуляції; у II групі цей показник у сироватці крові зростає на 71%, а в еритроцитах – на 31%. Отже, для обох груп пацієнтів характерна активація процесів

окиснення за аскорбат- та НАДФН-залежними шляхами, що підтверджується збільшенням вмісту МДА та окиснення ліпідів за умов моделювання цих процесів. Проте для пацієнтів II групи характерна найвиразніша активація обох шляхів окиснення.

При оцінці ступеня окиснення протеїнів встановлено зростання в 1,5 раза спонтанної продукції КГП у сироватці крові у I групі та вдвічі у II групі порівняно з показниками групи практично-здорових осіб. В умовах стимуляції окиснення протеїнів (інкубації зразків сироватки крові з компонентами середовища 2) вміст КГП зростає двічі у I групі та в 2,6 раза – у II групі порівняно зі спонтанним рівнем окиснення протеїнів в групах (див. таблицю). Оцінюючи ступінь окисної модифікації протеїнів в зразках крові, що були денатуровані після моделювання шляхів окиснення з компонентами середовищ 3 та 4, відмічено збільшення вмісту КГП у I групі – на 31% та II групі – на 40% (при моделюванні неензимного окиснення) і на 50% (при стимуляції ензимного окиснення). Отже, отримані результати свідчать про помірну активацію процесів окисної модифікації протеїнів при ініціації обох шляхів окиснення і характеризуються збільшенням вмісту КГП на тлі активації ПОЛ в обох групах пацієнтів. Слід відмітити, що найбільше накопичення МДА та КГП спостерігалось саме при моделюванні НАДФН-залежного окиснення та при наявності імунно-запального процесу в нирках (група II).

Отже, при розвитку запальних захворювань нирок в крові пацієнтів процеси ПОЛ активуються двома шляхами: аскорбатзалежним (аскорбінова кислота регенерує іони за рахунок зворотного відновлення  $Fe^{3+}$  до  $Fe^{2+}$ ) і НАДФН-залежним (де донорами електронів є молекули НАДФН<sub>2</sub>). Особливість неензимного окиснення полягає в тому, що воно практично не відбувається за відсутності металів зі змінною валентністю, зокрема  $Fe^{2+}$ , які ініціюють ланцюгові вільнорадикальні реакції [9]. Відомо, що оксидази здатні генерувати АМК, котрі в свою чергу

або утилізуються антиоксидантною системою, або зумовлюють неензимне окиснення ліпідів. Також показано, що деякі оксигенази, для яких субстратами є жирні кислоти, здатні активувати одночасно обидва шляхи окиснення [2,8]. Доведено, що НАДФН-залежний шлях ПОЛ пов'язаний з участю ліпоксигеназ і циклооксигеназ, що каталізують окиснення арахідонової, лінолевої та ліноленової кислот з утворенням циклічних та аліфатичних пероксидів [7]. Циклооксигенази запускають реакції утворення вільних радикалів (неензимним шляхом) і також впливають на синтез простагландинів і тромбоксанів. Простагландини в свою чергу впливають на проникність клітинних мембран і на процеси реабсорбції в нирках, а тромбоксани регулюють функції тромбоцитів, стимулюючи їх агрегацію, особливо при розвитку запальних реакцій [4,6]. Ліпоксигенази окиснюють жирні кислоти, перетворюючи їх на лейкотрієни, що продукуються лейкоцитами, регулюють хемотаксис гранулоцитів і стимулюють фагоцитоз. Фагоцитуючі клітини, маючи низьку активність НАДФН-оксидази, проявляють слабку бактеріцидну здатність [7]. До того ж, активація утворення АМК лежить в основі апоптозної і некрозної загибелі клітин, захисної функції нейтрофілів при запальних реакціях [4,6].

Зазвичай, реакції неензимного окиснення блокуються аскорбатом, а окиснені форми аскорбінової кислоти відновлюються глутатіоном за рахунок атомів водню від НАДФН<sub>2</sub>, який утворюється при ензимному окисненні, а каталізують ці реакції – глутатіонпероксидаза, глутатіонредуктаза та каталаза, підтримуючи таким чином ПОЛ на надзвичайно низькому рівні [8,10]. Водночас тривала інтенсифікація процесів окиснення призводить до виснаження антиоксидантного резерву (дефіциту вітамінів Е, С, В-каротину, глутатіону, селену, зниження активності каталази, глутатіонпероксидази), що й було описано при хГН та хПН раніше [2,3]. У сироватці крові вільні радикали нейтралізуються церулоплазміном, який зменшує пул

Fe<sup>2+</sup> і блокує ланцюгові реакції неензимного окиснення [6]. Зниження активності церулоплазміну сприяє ініціації реакцій неензимного окиснення ліпідів, що й доведено нашими результатами (накопичення МДА і активізація неензимного шляху ПОЛ) та узгоджено з даними попередніх досліджень щодо змін (зниження активності і вмісту) цього ензиму на фоні гіперактивації процесів ПОЛ у хворих з хГН та рецидивуючим хПН [3,10].

Активізація ензимного окиснення окрім циклогеназно-ліпоксигеназного комплексу також пов'язана і з імунологічними реакціями, що розвиваються при запальному процесі в нирках, та супроводжуються звільненням медіаторів запалення; активацією протеаз крові та активацією комплементу. Показано, що при хГН спостерігається відкладення в мембранах ниркового епітелію похідних компонента С3, а у плазмі крові хворих виявляється фактор, що його активує [5]. Збільшення вмісту медіаторів запалення, підвищене утворення АМК нейтрофілами і макрофагами активує каспази, що стимулюють апоптоз. Формування запальної реакції у відповідь на проникнення в тканини патогенів відбувається за участі прозапальних цитокінів-інтерлейкінів (ІЛ-1, ІЛ-6, ІЛ-23), що активно синтезуються при запаленні і посилюють спрямовану міграцію лейкоцитів у вогнище запалення, фагоцитоз і продукцію АМК (це є активним захисним механізмом та основою неспецифічного імунітету) [4,6]. Також АМК стимулюють рецептори клітин, що індукують продукцію прозапальних цитокінів та експресію адгезивних молекул. Однак надмірне їх утворення призводить до швидкого руйнування клітин нирки та є основою патогенезу хГН та хПН [1,4,5,9]

Отже, з одного боку, переокиснене окиснення є нормальним фізіологічним процесом, а його роль полягає у відновленні біологічних мембран, іонного транспорту, регуляції активності ензимів; з іншого – підвищення рівня ПОЛ чи окиснення протеїнів спостерігається при багатьох патологіях, а їх про-



дукти є відповідальними за пошкодження клітин і тканин. До того ж, пошкоджені тканини схильні до перекисного окиснення більшою мірою, ніж здорові, а причиною цього є інактивація деяких антиоксидантів, витік їх з пошкоджених клітин і виділення іонів металів (особливо заліза і міді) з місць їх накопичення в клітинах [6,9]. Утворені продукти ПОЛ також здатні впливати на процеси окиснення протеїнів, при цьому ліпідні радикали та АМК, атакуючи протеїнові компоненти, забезпечують фізіологічну відповідь на активацію ПОЛ. За фізіологічних умов може відбуватися металіндуковане окиснення протеїнів за допомогою впливу металів перемінної валентності, зокрема  $Fe^{2+}$ , на пероксид водню, що призводить до утворення більш агресивного  $^{\circ}OH$ , який надалі реагує з функціональними групами амінокислотних залишків та модифікує їх, утворюючи карбонільні похідні. Окисненням протеїнам притаманна підвищена чутливість до протеолізу. Модифіковані протеїни частіше атакуються протеазами [4,6]

Таким чином, при розвитку запальних захворювань нирок у крові пацієнтів активація ПОЛ відбувається неензимним та ензимним шляхами, при цьому більше ушкоджуються ліпідні компоненти та утворюються ліпідні пероксида, що слід враховувати при корекції оксидативних порушень у пацієнтів з хПН та хГН при призначенні відповідних антиоксидантних препаратів, що здатні блокувати їх розвиток. Встановлено, що наявність запального процесу в нирках призводить до активації ПОЛ та окисної модифікації протеїнів крові з виникненням помірного синдрому ендогенної інтоксикації їх продуктами.

**Л.В. Король**

#### **ПУТИ АКТИВАЦІЇ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕННЯ ЛІПІДІВ І БЕЛКІВ ПРИ ХРОНИЧЕСКИХ БОЛЕЗНЯХ ПОЧЕК**

Исследовали спонтанное и металлиндуцированное окисление липидов и белков при моделировании *in vitro* путей перекисного окисления по образованию малонового

диальдегида (МДА) и карбонильных групп протеинов (КГП) у пациентов с хроническим пиелонефритом (хПН) и гломерулонефритом (хГН) без нарушения экскреторной функции почек. Установлено, что в крови пациентов при хПН и хГН по сравнению с практически здоровыми особами возрастало содержание МДА в сыворотке крови в 2 и 2,3 раза, в эритроцитах – на 14 и 29%, уровень КГП – в 1,5 и 2 раза соответственно. Более значительное повышение содержания МДА и КГП отмечено у пациентов с хГН. Стимуляция *in vitro* процессов перекисной окисления способствовала существенному росту продукции МДА по сравнению с базовым уровнем до стимуляции. При моделировании *in vitro* аскорбатзависимого и НАДФН-зависимого путей перекисного окисления липидов и белков констатировано увеличение продукции МДА и КГП у обеих групп пациентов, особенно при инициации НАДФН-зависимого пути, что необходимо учитывать при коррекции оксидативных процессов и назначении антиоксидантной терапии.

Ключевые слова: оксидативный стресс; перекисное окисление липидов; окислительная модификация белков; хронические заболевания почек

**L.V. Korol**

#### **MODELING IN VITRO PATHWAYS OF ACTIVATION OF LIPID PEROXIDATION AND PROTEIN IN CHRONIC KIDNEY DISEASE**

We studied the spontaneous and metal induced oxidation of lipids and proteins in *in vitro* modeling ways of lipid peroxidation and blood proteins in the formation of malondialdehyde (MDA) and protein carbonyl groups (PCG) in 86 patients with chronic pyelonephritis (cPN) and 64 patients chronic glomerulonephritis (cGN) without prejudice excretory function of the kidneys. Installed the increase in the blood of patients with cPN MDAs 2 times, MDAe –14%, PCG 1.5 times; and cGN – MDAs 2.3 times, MDAe –29%, PCG – 2 times. Found increased MDA content and PCG in the blood of patients with cPN and more expressive when cGN. Stimulation of *in vitro* peroxidation processes contributed significantly increased of production of MDA compared with baseline. In the modeling *in vitro* ascorbate-dependent and NADPH-dependent lipid peroxidation ways and the increase in protein production of MDA and PCG in both groups of patients, especially in the NADPH-dependent way, which must be considered in the correction of oxidative processes and antioxidant therapy appointment.

Key words: oxidative stress; lipid peroxidation; oxidative modification of proteins; chronic kidney disease

*SI «Institute of Nephrology of NAMS of Ukraine», Kyiv*

#### **REFERENCES**

1. Driyanska VE, Stepanova NM, Haysenyuk FS, Rudenko MU. The impact on performance Nucleinat immunity

- and lysosomal enzymuriy in patients with pyelonephritis. Immunol and Allergol: Science and Practice. 2013; 4 : 4-9. [Ukrainian].
2. Romadanova AI. Features of cellular metabolic mechanisms of oxidative homeostasis in the progression of CKD stages. Vist Probl Biol and Med. 2011; 89(3):107-13. [Ukrainian].
  3. Stepanova NM, Korol LV, Kundin VY, Myhal LA, Romanenko OA Oxidative processes in patients with recurrent pyelonephritis and how their relationship with areas of sclerosis of the renal parenchyma. Ukr J Nephrol. and Dial. 2012; 3: 12-7. [Ukrainian].
  4. Cachofeiro V, Goicochea M, Garcia de Vinuesa, Oubina P, Lahera V Luno J. Oxidative stress and inflammation, a link between chronic renal disease and cardiovascular disease. Kidney Int.2008;74:4-9.
  5. Kao MP, Ang DS, Pall AD. Struthers Oxidative stress in renal dysfunction: mechanisms, clinical sequelae and therapeutic options. J Hum Hypertens. 2010; 24(1): 1–8.
  6. Klenowa NA Biochemistry of pathological conditions. Samara: Publishing house «Samara University»; 2006. [Russian].
  7. Roberts C.K. Oxidative stress and dysregulation of NAD(P)H oxidase and antioxidant enzymes in diet-induced metabolic syndrome. Metabolism. 2006; 55: 928-34.
  8. Vladimirov YA, Archakov AI. Lipid peroxidation in biomembranes, Moscow : Nauka, 2003.[Russian].
  9. Halliwell B. Oxygen toxiciti, oxygen radicals, transition metals and disease. Biochemistry. 2004; 215: 1-14.
  10. Korol LV, Myhal LY, Nikulina GG, Kolesnik MO Biochemical methods for assessing oxidative status in patients with chronic kidney disease: Guidelines. Kyiv; 2013. [Ukrainian].
  11. Jones Dean P. Radical-free biology of oxidative stress Am J Physiol Cell Physiol. 2008; 295: 849-68.

*Матеріал надійшов  
до редакції 10.02.2015*