

STUDII CLINICO-ȘTIINȚIFICE

Изучение состояния перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты при хронической почечной недостаточности

Ф. Э. Кулиева, Г. И. Азизова, А. М. Эфендиев

Кафедра биохимии, Азербайджанский Медицинский Университет, Баку

F. E. Quliyeva, G.I. Azizova, A. M. Efendiyev

Study of Lipid Peroxidation and Antioxidant System in Chronic Renal Insufficiency

This article looks at lipid peroxidation and the state of antioxidant system of patients with chronic renal insufficiency. Increases in the levels of conjugated dienes, malonic dialdehyde and lipid peroxidation were revealed. Changes in superoxide dismutasa activity, observed in blood of patients, depended on the stage of the disease. Content of lipid peroxidation products was also different in the first and second stages of disease. Estimation of superoxide dismutase activity and content of diene ketons were the most suitable methods of monitoring treatment of chronic renal disease.

Key words: lipid peroxidation, antioxidants, chronic renal insufficiency.

Реферат

Изучено состояние перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты у пациентов с хронической почечной недостаточностью. Возрастаение уровня диеновых конъюгатов, малонового диальдегида и перекисного окисления липидов было легко выявляемым. Изменение активности супероксиддисмутазы в крови у больных зависело от стадии заболевания. Содержание продуктов перекисного окисления определялось также в первой и второй стадии заболевания. Оценка активности супероксиддисмутазы и содержание диеновых кетонов является наиболее удобной формой наблюдения при лечении хронических почечных заболеваний.

Ключевые слова: перекисное окисление липидов, антиоксидантная защита, хроническая почечная недостаточность.

Введение

В последние годы большое внимание уделяют изучению дисбаланса в системе: перекисное окисление липидов (ПОЛ) – антиоксидантная защита (АОЗ), как фактору хронизации патологического процесса. Актуальность изучения нарушений системы ПОЛ – АОЗ при хронической почечной недостаточности (ХПН) определяется их связью с воспалением и деструкцией мембран, отрицательным воздействием продуктов перекисаации на почечные структуры (накопление в клубочках, инактивация ключевых ферментов гликолиза и др.), участием в иммунном конфликте, а также возможность развития «второй болезни» (атеросклероз, холестатический цирроз печени и др.). Взаимосвязь почечной дисфункции, липидных нарушений и процессов перекисаации на ранних этапах развития ХПН остается неясной [2, 5].

Целью данного исследования является изучение взаимосвязи между интенсивностью ПОЛ и состоянием АОЗ при хронической почечной недостаточности.

Материал и методы

Были проведены биохимические и иммунологические анализы у 97 больных ХПН. У 53 больных была начальная, у 44 больных терминальная стадия заболевания. Контрольную группу составили 20, практически здоровых, человек. Больные ХПН находились на лечении в

отделении нефрологии Центральной Больницы Нефтяников Нефтяной компании Азербайджана. Биохимические и иммунологические исследования проводились на кафедре биохимии Азербайджанского Медицинского Университета. Уровень креатинина и мочевины определяли с помощью набора реактивов «Lachema» (Чехия).

Процессы ПОЛ количественно исследовали спектрофотометрическим методом, определяли содержание в сыворотке крови диеновых конъюгатов – первичных продуктов ПОЛ и малонового диальдегида (МДА) – одного из вторичных продуктов.

Диеновые конъюгаты (ДК), образующиеся в результате миграции двойной связи в полиненасыщенных жирных кислотах, определяли по В. Б. Гаврилову. После экстракции в смеси гептан-изопропанол (2:1) и последующего наслаивания НСІ (рН 2,0), диеновые конъюгаты выявляли в гептановой фазе при 233 нм. Коэффициент молярной экстинкции ДК составлял $2,2 \pm 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$. Количество диеновых конъюгатов выражали в Д₂₃₂/мл сыворотки [3].

Принцип метода определения малонового диальдегида основан на образовании окрашенного триметинового комплекса с тиобарбитуровой кислотой при высокой температуре. Определение оптической плотности окрашенного комплекса, после его экстракции n-бутанолом, проводили при длине 532 нм в сравнении с контрольной

Таблица 1

Показатели перекисного окисления липидов у больных хронической почечной недостаточностью до и после проведения курса лечения ($X \pm m$)

Исследуемые показатели	Контроль-ная группа	Консервативная группа Начальная стадия ХПН		Терминальная группа Терминальная стадия ХПН	
		До лечения	После лечения	До лечения	После лечения
МДА, мкмоль/мл	2,85 ± 0,10	6,72 ± 0,13*	4,74 ± 0,19*##	7,91 ± 0,26*	6,38 ± 0,19#
ДК, E233/ мл	0,40 ± 0,010	0,70 ± 0,020*	0,53 ± 0,024#	0,75 ± 0,080*	0,66 ± 0,170

Примечание: достоверность статистического различия в сравнении с контрольной группой - * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$; достоверность статистического различия в сравнении с показателем до лечения для данной группы - # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$.

пробой. Молярная экстинкция МДА $1,56 \pm 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$. Концентрация малонового диальдегида выражалась в нмоль/мл сыворотки [6].

О состоянии АОЗ судили по уровню в сыворотке крови больных супероксиддисмутазы (СОД), (ГП) и церулоплазмину (ЦП)[1].

Статистическую обработку данных проводили непараметрическим методом с помощью критерия Уилкоксона (Манна-Уитни).

Результаты и обсуждение

У больных ХПН установлено закономерное возрастание содержания МДА и ДК в сыворотке крови с максимальными значениями у больных с терминальной стадией заболевания до лечения (табл. 1).

Данные изменения имели место на фоне нарушения основных биохимических показателей функции почек – увеличение уровня креатинина и мочевины в сыворотке крови. Так, уровень МДА у больных с начальной стадией ХПН до лечения увеличивается в 2,4 раза, после лечения показатель снижается: в первой группе (ХПН в начальной стадии) снижается приблизительно на 30% по сравнению с исходным уровнем при поступлении с стационар. У больных с терминальной стадией ХПН применяемые методы лечения (в основном диализ) достоверно снижают концентрацию МДА в сыворотке крови, однако, нормальные показатели не устанавливаются. Почти такая же динамика изменения наблюдается для диеновых конъюгатов (ДК), когда у всех больных ХПН при поступлении с стационар регистрируется увеличение ДК в 1,8-1,9 раза по сравнению с нормой. У больных с начальной стадией болезни, которых лечили консервативно, наблюдается достоверное снижение ДК на 24%; в группе же с терминальной формой ХПН, в результате лечения, показатели ДК улучшаются (рис. 1).

Эти данные показывают, что у всех больных с ХПН резко возрастает концентрация первичных и вторичных продуктов свободнорадикального окисления - ГПЛ и МДА не только в пораженной ткани почек, о чем свидетельствуют данные литературы [5], но и в крови, что может быть следствием дисбаланса антиоксидантной системы организма, различных ее звеньев.

Действительно, при исследовании состояния системы АОЗ в сыворотке крови больных с начальной стадией ХПН была выявлена статистически достоверная

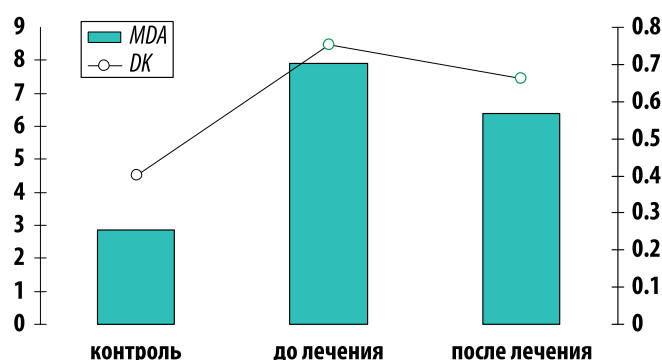


Рис. 1. Перекисное окисление липидов в группе больных с терминальной стадией ХПН.

Примечание: левая шкала – МДА, мкмоль/мл; правая шкала – ДК, E_{233/мл}

активация СОД (табл. 2). Увеличение активности СОД, по-видимому, объясняется компенсаторной реакцией организма на усиление ПОЛ и/или утечки ее из тканей вследствие повышения проницаемости и разрушения клеточных мембран.

Представленные в табл. 2 и на рис. 2 данные свидетельствуют о том, что у больных с ХПН в терминальной стадии при поступлении в стационар активность СОД была существенно снижена, лечение же способствовало улучшению этого параметра, но не приводило к его нормализации.

Снижение интенсивности ПОЛ в результате лечения может объясняться влиянием антиоксидантных систем организма, в том числе действием СОД - фермента, разрушающего супероксид-анион радикалы - инициаторы свободнорадикальных реакций в организме.

В контроле процессов ПОЛ в организме важнейшее место занимает глутатионовая система, в частности ее компоненты – ГПО и восстановленный GSH обеспечивают детоксикацию H_2O_2 - чрезвычайно ядовитого продукта, который образуется в результате интенсификации свободно-радикальных реакций в организме. Поэтому мы сочли целесообразным определить в сыворотке крови у больных ХПН активность ГПО и содержание GSH.

Как видно из табл. 2, в обеих группах обследованных пациентов при поступлении в стационар было выявлено статистически достоверное снижение активности ГПО и содержания

Таблица 2

Показатели системы антиоксидантной защиты у больных хронической почечной недостаточностью до и после проведения курса лечения ($X \pm m$)

Исследуемые показатели	Контрольная группа	Начальная стадия ХПН		Терминальная стадия ХПН	
		До лечения	После лечения	До лечения	После лечения
СОД, МЕ/мг	0,94 ± 0,03	1,37 ± 0,03*	1,34 ± 0,02	0,63 ± 0,03*	0,78 ± 0,21**
ГПО, мкмол/мин.	279,4 ± 5,66	190,9 ± 3,33*	207,7 ± 4,01*	211,22 ± 5,47*	203,5 ± 5,46*
ГSH, мкмол/мл	0,55 ± 0,02	0,40 ± 0,01	0,48 ± 0,02	0,41 ± 0,021*	0,47 ± 0,02***
Церулоплазмин, мг/дл	27,85 ± 0,45	15,49 ± 0,55**	16,16 ± 0,57*	15,18 ± 0,48**	16,85 ± 0,83*#

Примечание: достоверность статистического различия в сравнении с контрольной группой - * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$; достоверность статистического различия в сравнении с показателем до лечения для данной группы - # $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

восстановленного ГSH. Проведенное традиционное лечение сопровождалось тенденцией повышения активности фермента и восстановления уровня ГSH. Однако, нормализация этих параметров после окончания курса лечения не отмечена.

В работе впервые, у больных ХПН, определение активности ГПО сыворотки крови производилось с использованием пероксида водорода и 5,5'-дитиобис (2-нитробензойной кислоты). Преимущество данного метода состоит в том, что он дает возможность определить истинную селензависимую активность ГПО, поскольку в состав ферментов данной группы входит селеноцистеин, что делает их чувствительными к содержанию селена в тканях и, в связи с чем, селеновые ГПО могут быть использованы для оценки функционального «селенового статуса» организма. Не исключено, что отмеченное нами снижение активности ГПО у больных с ХПН может быть следствием дефицита данного микроэлемента, которое как известно вызывает снижение уровня определяемой глутатионпероксидазной активности во многих органах и тканях.

Ферментативное звено АОЗ изучали также по уровню медьсодержащего фермента церулоплазмينا (ЦП). Нами отмечено выраженное снижение уровня ЦП у всех обследованных больных, лечение же не приводило к его нормализации. Учитывая важную защитную роль ЦП как ингибитора перекисных процессов, можно полагать, что достоверное снижение его уровня свидетельствует об истощении сывороточного звена АОЗ и неблагоприятном течении патологического процесса. Таким образом, уровень ЦП может выступать в роли прогностического показателя у больных с ХПН.

Выводы

1. При хронической почечной недостаточности наблюдается закономерное повышение содержания малонового диальдегида и диеновых конъюгатов в сыворотке крови и снижение уровня основных компонентов антиоксидантной защиты – глутатионпероксидазы, восстановленной формы глутатиона и церулоплазмينا, которые коррелировали в зависимости от степени тяжести заболевания и глубины патологического процесса.

2. На консервативной и терминальной стадиях заболевания на фоне высокого уровня продуктов перекисного окисления липидов наблюдается дефицит антиоксидантной защиты организма.

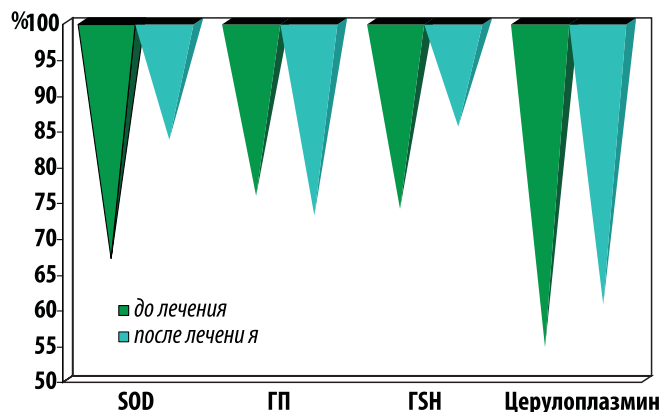


Рис. 2. Изменения антиоксидантного статуса у больных с терминальной стадией ХПН по сравнению с контролем (в %).

Литература

1. Азизова ГИ, Кулиева ФЭ, Эфендиев АМ. Биохимические и иммунологические исследования крови больных хронической почечной недостаточностью. *Биомедицина*. 2007;2:19-22.
2. Владимиров ЮА, Арчаков АИ. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. Москва: Наука. 1972:72.
3. Гаврилов ВВ, Гаврилова АР, Хмара ИФ. Измерение диеновых конъюгатов в плазме крови по УФ-поглощению гептановых и изопропанольных экстрактов. *Лаб. дело*. 1988;2:60-64.
4. Камышников ВС. Справочник по клинико-биологической лабораторной диагностике. Минск. 2000;1:213.
5. Куликова АИ, Тугушева ФА, Зубина ИМ. Показатели перекисного окисления липидов и факторы системы антиоксидантной защиты крови больных с хроническим гломерулонефритом. *Нефрология*. 2001;3:134.
6. Коробейников ЭН. Модификация определения продуктов перекисного окисления липидов в реакции с тиобарбитуровой кислотой. *Лаб. Дело*. 1986;12:725-728.
7. Разыграев АВ, Арутюнян АВ. Определение глутатионпероксидазной активности в сыворотке крови человека с использованием пероксида водорода и 5,5'-дитиобис (2-нитробензойной кислоты). *Клин. Лаб. Диагн*. 2006;6:13-16.

Corresponding author

Azizova, Gulnara Ibragim kizi, M.D., Ph.D., Associate Professor
Department of Biochemistry
Azerbaijan Medical University
98, Mardanov kardashlari Street
Baku, 370010
Tel.: 4953953
E-mail: gulib18@mail.ru

Manuscript received March 29, 2010; revised manuscript May 03, 2010