

© И.М.Зубина, А.И.Куликова, Ф.А.Тугушева, 2002
УДК 616.611-002.2:[547.962+661.52]

И.М.Зубина, А.И.Куликова, Ф.А.Тугушева

ОСОБЕННОСТИ РАСТВОРИМОСТИ СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТОМ ПРИ ЕГО ВЫДЕЛЕНИИ ПУТЕМ ВЫСАЛИВАНИЯ С СУЛЬФАТОМ АММОНИЯ

I.M.Zubina, A.I.Kulikova, F.A.Tugusheva

PECULIARITIES OF SOLUBILIZATION OF SERUM ALBUMIN IN PATIENTS WITH CHRONIC GLOMERULONEPHRITIS IN THE COURSE OF ALBUMIN PURIFICATION WITH THE HELP OF A SALTING-OUT PROCEDURE USING AMMONIUM SULPHATE

Научно-исследовательский институт нефрологии Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П.Павлова, Россия

РЕФЕРАТ

Целью настоящего исследования был подбор оптимальных условий для выделения альбумина (АЛБ) сыворотки крови больных хроническим гломерулонефритом с помощью метода высаливания. Установлено, что для выделения АЛБ из образцов цельной сыворотки крови целесообразно использовать сернокислый аммоний (СКА) в конечной концентрации 17,2%, так как в этих условиях достигается разумный компромисс между количеством выделяемого АЛБ и степенью его очистки. Показано незначительное уменьшение растворимости АЛБ в СКА у больных в фазе ремиссии. Наименее устойчив в солевых растворах АЛБ больных на фоне обострения и при хронической почечной недостаточности. В группе пациентов, получавших лечение гемодиализом, не обнаружено достоверных отличий от доноров в растворимости АЛБ в солевом растворе. Делается вывод о том, что снижение растворимости АЛБ в СКА может свидетельствовать о нарушении нативной конформации и о ковалентном связывании с лигандами.

Ключевые слова: хронический гломерулонефрит, альбумин, высаливание.

ABSTRACT

The aim of the present study was to select the optimal conditions of serum albumin (ALB) purification. Serum samples of patients with chronic glomerulonephritis were used for an analysis and ammonium sulphate was chosen as a salting-out agent. It was stated that the 17.2% final concentration of ammonium sulphate was optimal for the ALB purification because it allowed to get a sufficient yield of ALB and to achieve a relatively high degree of its purification. The solubility of ALB in ammonium sulphate was insignificantly lower in patients without an acute attack of the disease when compared with that of healthy people. In patients with an acute attack of the disease and in patients suffering from chronic renal insufficiency the solubility of ALB in the ammonium sulphate solutions was the least. There were no significant differences between the ALB properties in healthy people and in patients on chronic hemodialysis. It is concluded that the decreased serum ALB solubility can be a result of disturbances of native conformation and of covalent binding of ligands with protein.

Key words: chronic glomerulonephritis, albumin, salting-out procedure.

ВВЕДЕНИЕ

Альбумин (АЛБ) - это простой глобулярный белок, который является самым распространенным белком в природе и одним из наиболее хорошо растворимых белков плазмы, что объясняется большим количеством способных к ионизации групп на поверхности его молекулы [6, 17]. Изoeлектрическая точка человеческого сывороточного альбумина (ЧСА) имеет более низкое значение, чем у большинства белков плазмы – pI 4,7-5,5 – в зависимости от примененного метода определения [21]. Предназначение АЛБ в организме поливалентно, но основных функций, выполняемых этим белком, три: сорбционно-транспортная, ге-

модинамическая и основной белковый резерв организма. Транспортная функция, как ни одна другая, определяется специфическими особенностями строения белка. Кроме этого, АЛБ благодаря наличию сульфгидрильной группы проявляет антиоксидантные свойства [20].

Молекула АЛБ состоит из единственной полипептидной цепи, включающей 585 аминокислотных остатков. Первичная структура АЛБ расшифрована в 1975 году J.R.Brown и B.Meloun [18]. Молекулярная масса альбумина, рассчитанная по аминокислотному составу, составляет 66439 Да [18]. Главный вклад в стабилизацию вторичной структуры молекулы

вносят водородные связи, образующиеся между пептидными группами аминокислотной цепи. Около 50 – 67% полипептидной цепи уложены в α -спирали, которые являются единственной периодической структурой в молекуле [2]. Третичная структура молекулы поддерживается гидрофобными взаимодействиями, кроме того, существенный вклад в ее организацию вносят 17 дисульфидных связей, которые образуются между 34 из 35 остатков цистеина. В результате в молекуле формируется структурная единица, содержащая две больших и одну малую петли, которая трижды почти точно повторяется в виде трех индивидуальных областей - доменов [13]. Первый и второй домены имеют отрицательный заряд, что определяет общий отрицательный заряд молекулы альбумина. При pH 7,4 чистый отрицательный заряд молекулы равен 18. Всего альбумин имеет около 180 титруемых зарядов на молекулу. [17]. Реальный заряд доменов и молекулы в целом может меняться при связывании заряженных лигандов.

Для изучения структуры и функциональных свойств белка необходимо добиться максимально возможной очистки его от прочих белков. Основным источником для выделения АЛБ служит плазма крови, которая по своему составу является смесью разнообразных белков. Как известно, для разделения белковых смесей используются разнообразные методы: избирательное осаждение белков за счет изменения некоторых свойств растворителя, гель-фильтрация, хроматография, препаративный электрофорез. Методы разделения белковых смесей, основанные на разной растворимости белков при изменении свойств растворителя, с одной стороны, наиболее просты и общедоступны, с другой стороны, позволяют оценить важнейшие физико-химические свойства белка.

Высаливание – один из широко применяемых способов разделения белковых смесей [11, 23]. Растворимость белков в солевых растворах зависит от их гидрофильности, от концентрации соли и от природы соли. Наиболее эффективны соли, анионы которых имеют большой заряд. Катионы в этом отношении менее важны. По способности к высаливанию анионы располагаются в ряд Гофмейстера: SCN^- , I^- , ClO_4^- , NO_3^- , Br^- , Cl^- , CH_3COO^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} . Хотя, судя по положению в этом ряду, фосфат более эффективен, чем сульфат, на практике при нейтральном значении pH фосфат состоит из смеси ионов HPO_4^{2-} и H_2PO_4^- , которые менее эффективны, чем PO_4^{3-} . Одновалентные катионы по

эффективности действия на осаждение белков можно расположить в следующий ряд: $\text{NH}_4^+ > \text{K}^+ > \text{Na}^+$. При выборе соли учитывают ее растворимость, плотность концентрированного раствора, так как эффективность центрифугирования при отделении осадка определяется разностью между плотностью белкового осадка и плотностью растворителя [11]. Сернокислый аммоний (СКА) – единственная соль, которая обладает всеми преимуществами и не имеет недостатков при работе с типичным белком.

Растворимость СКА очень мало меняется в области температур от 0 до 30°C; концентрация насыщенного раствора в воде составляет приблизительно 3,5 М. Плотность этого насыщенного раствора равна 1,235 г·см⁻³, а плотность белкового агрегата в таком растворе – 1,29 г·см⁻³.

Поскольку АЛБ является самым гидратированным белком сыворотки крови, он обладает самой высокой растворимостью. В отличие от глобулинов, АЛБ растворяется и в воде, и в концентрированных солевых растворах. Согласно одной из первых классификаций белков, АЛБ – это белки, которые остаются в полунасыщенном растворе сульфата аммония [4].

Метод выделения фракции АЛБ из смеси белков с помощью высаливания чрезвычайно прост и удобен. Однако ни в одном из источников отечественной или зарубежной литературы мы не смогли найти четких, определенных и унифицированных рекомендаций в отношении оптимальной концентрации высаливающего агента в том случае, когда в качестве материала для исследований используют цельную сыворотку крови человека.

Общая концентрация АЛБ в сыворотке крови – важный клинико-лабораторный показатель. Так, понижение концентрации АЛБ в сыворотке крови наблюдается при острых и хронических воспалениях (бактериальные и вирусные инфекции, ревматизм, термический ожог, некоторые паразитарные поражения и др.), при понижении синтеза АЛБ в печени (острые и хронические заболевания печени, амилоидоз, злокачественные новообразования и т.д.), при увеличении потери АЛБ через поверхность тела (нефротический синдром, ожоги и травмы, трансудация и экссудация из полых органов), при повышении катаболизма и при гиперволемии [15].

В практике нефрологических отделений концентрацию АЛБ определяют для диагностики нефротического синдрома (НС), снижение его содержания в крови является плохим прогностическим

тическим признаком для больных, получающих лечение с помощью регулярного гемодиализа.

При развитии НС концентрация АЛБ в крови снижается в первую очередь вследствие развития протеинурии. Кроме этого, изменяются и физико-химические свойства этого белка. Так, методом изоэлектрического электрофокусирования показано, что при гломерулонефрите [12], в том числе при НС [10, 19], в крови больных появляются минорные фракции АЛБ с рI 5,2-7,4. Однако следует отметить, что работ, посвященных изучению физико-химических и сорбционных свойств АЛБ при гломерулонефритах, в доступной литературе практически нет.

Целью настоящего исследования был подбор оптимальных условий для выделения АЛБ сыворотки крови больных хроническим гломерулонефритом (ХГН) с помощью метода высаливания для последующего изучения физико-химических и, в частности, сорбционных свойств АЛБ.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Обследована сыворотка крови 36 практически здоровых лиц и 65 пациентов с ХГН, находившихся на лечении на нефрологических отделениях клиник СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова.

Группу доноров составляли 22 мужчины и 14 женщин, средний возраст которых составил $41,1 \pm 1,2$ года. Группа больных состояла из 39 мужчин и 26 женщин, средний возраст пациентов – $47,1 \pm 1,7$ года. Сорок пять пациентов получали различные варианты консервативной терапии, а 20 больных с терминальной стадией хронической почечной недостаточности (ХПН) получали лечение хроническим бикарбонатным гемодиализом (ГД) в обычном режиме – три раза в неделю по 6 часов на аппаратах “Fresenius 2008”, “Althin - Nikisso”, “HD - Secura”.

Всем пациентам проводили тщательное нефрологическое обследование с включением современных биохимических, функциональных, рентгенологических, сонографических и морфологических методов.

Большей части пациентов (40 человек) была выполнена нефробиопсия, позволившая установить морфологический вариант ХГН, остальным 25 больным биопсия по разным причинам не была показана. В группе больных были

представлены все наиболее часто встречающиеся морфологические формы ХГН (табл.1).

Таблица 1

Распределение больных по морфологическим диагнозам

Морфологический диагноз	Количество пациентов
Мезангио-пролиферативный ГН	7
Мембранозно-пролиферативный ГН	6
Мембранозный ГН	9
ГН с минимальными изменениями	2
Экстракапиллярный ГН	5
Склерозирующий ГН	11
Всего больных:	40

Примечание: ГН - гломерулонефрит

По клинко-лабораторным проявлениям больные, получавшие консервативное лечение, распределялись следующим образом: 9 пациентов находились в состоянии ремиссии, у 20 человек с ХГН наблюдалось обострение в виде НС, у 16 больных имелось нарушение функции почек II – III стадии по классификации С.И. Рябова и Б.Б. Бондаренко [9]. В табл. 2 представлены основные данные клинко-морфологического обследования пациентов, получавших консервативную терапию.

Материалом исследования являлась сыворотка крови, взятой утром натощак у доноров и больных людей из локтевой вены. У больных, получающих лечение хроническим ГД, кровь брали из артерио-венозной фистулы при подключении к диализному аппарату. Кровь брали в сухие стеклянные пробирки, выдерживали 40 мин при комнатной температуре для формирования сгустка, затем сыворотку отделяли путем центрифугирования.

Таблица 2

Клинко-морфологическая характеристика больных с хроническим гломерулонефритом, получающих консервативную терапию

Морфологический диагноз	Количество пациентов с разными вариантами клинического течения ХГН			
	Ремиссия	НС	ХПН II - III	Всего
Мезангио-пролиферативный ГН	2	4	-	6
Мембранозно-пролиферативный ГН	-	5	-	5
Мембранозный ГН	-	7	-	7
ГН с минимальными изменениями	-	2	-	2
Экстракапиллярный ГН	1	-	2	3
Склерозирующий ГН	1	-	4	5
ХГН без проведения биопсии	5	2	10	17
Всего больных	9	20	16	45

Примечания: ГН – гломерулонефрит,
ХГН - хронический гломерулонефрит,
ХПН – хроническая почечная недостаточность,
НС - нефротический синдром

гирования в течение 15 мин при 2000 об./мин. Исследования проводили в день взятия крови.

Для осаждения глобулинов к сыворотке крови добавляли насыщенный раствор СКА, создавая разную степень насыщения раствора. Подбор оптимальной концентрации СКА осуществляли в диапазоне от 65%-ного до 30%-ного насыщения (насыщенный раствор СКА при 20°C содержит 43 г соли в 100 мл, что соответствует концентрации 3,3 М [5]).

К 3 мл сыворотки крови при перемешивании добавляли 2 мл охлажденного насыщенного раствора СКА (рН 6,1), для более полного осаждения глобулинов смесь выдерживали 40 мин при температуре 8°C, затем центрифугировали 40 мин при 8000 об./мин.

Супернатант очищали от СКА с помощью проточного диализа против 5 л дистиллированной воды. Диализ проводили при комнатной температуре (16–18°C) в течение 18–20 часов.

После диализа белковый раствор концентрировали, удаляя воду за счет осмотических сил. Для этого диализный мешок с раствором помещали в сухой полиэтиленгликоль-4000. Объем раствора доводили до исходного объема сыворотки крови (3 мл) и использовали для анализа.

Концентрацию АЛБ определяли унифицированным методом по реакции с бромкрезоловым зеленым (БКЗ) [7] с помощью наборов НПФ “Абрис+”. Метод основан на образовании цветного комплекса БКЗ с АЛБ в кислой среде (рН 4,2) в присутствии детергента. Для построения калибровочной кривой использовали стандартный раствор АЛБ с концентрацией 69 г/л производства фирмы “КлиниТест”.

Содержание общего белка определяли уни-

фицированным методом по биуретовой реакции [7] с помощью наборов НПФ “Абрис+”. Метод основан на образовании комплексных соединений ионов меди с пептидными группировками белка, имеющих фиолетовую окраску. Калибровочную кривую строили по стандартному раствору АЛБ (80 г/л), имевшемуся в наборе.

Для оценки степени очистки АЛБ после высаливания проводили электрофорез (ЭФ). В качестве носителя использовали пленки из ацетата целлюлозы с размером пор 0,2 мкм. ЭФ проводили при силе тока 60V в течение 40 минут, длина пробега составляла 28 мм. Использовали веронал-мединаловый электродный буфер рН 8,6. Фореграммы окрашивали амидо-черным. Сканирование проводили на денситометре при длине волны 600 нм [14].

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием общепотребительных методов параметрической и непараметрической статистики [8, 16]. Методы дескриптивной статистики включали в себя оценку среднего арифметического ($\bar{X}$), средней ошибки среднего значения (m). Для оценки межгрупповых различий при сравнении двух групп применяли t-критерий Стьюдента.

Статистическая обработка материала выполнялась на ПЭВМ с использованием стандартного пакета программ прикладного статистического анализа (Statistica for Windows v.5.0). Критический уровень достоверности нулевой статистической гипотезы (об отсутствии значимых различий) принимали равным 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Исходя из принятых представлений, что к альбуминам относятся белки, обладающие ра-

Таблица 3

Результаты опытов по частичной очистке альбумина сыворотки с помощью высаливания при разной степени насыщения раствора сульфатом аммония ($\bar{X} \pm m$; в скобках указано число опытов)

Образцы сыворотки крови	Сыворотка крови		Фракция после высаливания в условиях 50%-ного насыщения			Фракция после высаливания в условиях 40%-ного насыщения		
	общий белок, г/л	альбумин, г/л	общий белок, г/л	альбумин, г/л	количество выделенного альбумина в % от его содержания в сыворотке	общий белок, г/л	альбумин, г/л	количество выделенного альбумина в % от его содержания в сыворотке
Доноры	68,4±1,3 (36)	38,3±0,6 (36)	30,4±1,6 (12)	22,3±1,3 (12)	56,9±0,7 (12)	38,8±1,0 (36)	29,7±0,8 (36)	77,6±1,6 (36)
Больные с ХГН	59,8±1,8 (43)	28,1±1,5 (43)	20,4±2,4 (8)	13,7±2,0 (8)	46,9±2,3 (8)	28,8±1,3 (43)	18,5±1,1 (43)	63,2±2,1 (43)

Примечание: ХГН – хронический гломерулонефрит

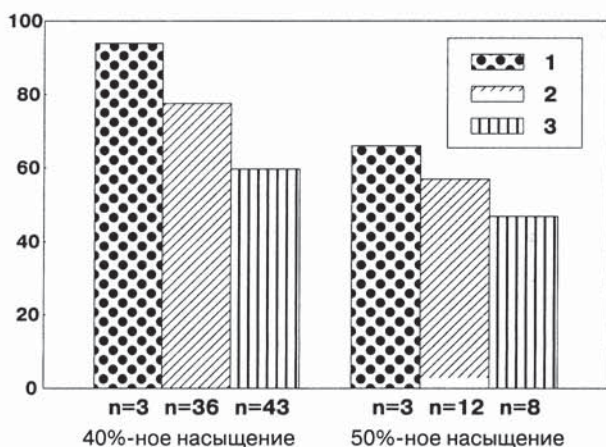


Рис. 1. Количество выделенного альбумина (в процентах от исходного уровня) во фракциях после высаливания при разной степени насыщения раствора сернокислым аммонием (1 – препараты очищенного альбумина, 2 – сыворотка крови доноров, 3 – сыворотка крови больных хроническим гломерулонефритом, находящихся на консервативном лечении).

створимостью в полунасыщенных солевых растворах [4], подбор оптимальной концентрации высаливающего агента начинали с 50%-ного насыщения СКА, а затем остановились на 40%-ном насыщении.

Высаливающему воздействию были подвергнуты как препараты очищенного АЛБ (10%-ного человеческого плацентарного АЛБ и бычьего сывороточного АЛБ для вирусологических исследований), так и образцы сыворотки крови доноров и больных с ХГН, получающих консервативное лечение. Результаты данных опытов представлены в табл. 3 и на рис. 1.

При 50%-ном насыщении высаливающим агентом исследуемых образцов (что соответствует конечной концентрации СКА 21,5%) происходила значительная потеря АЛБ. Так, в растворах препаратов очищенного АЛБ в надосадке оставалось в среднем 67% от исходного количества белка, а в образцах сыворотки крови доноров и больных с ХГН – $56,9 \pm 0,7\%$ и $46,9 \pm 2,3\%$ от общего количества АЛБ в цельной сыворотке, соответственно.

При использовании СКА в конечной концентрации 17,2% (что соответствует 40%-ному насыщению раствора) выделили практически весь АЛБ из его очищенных препаратов (в среднем 94% от исходного содержания) и значительную часть из сывороток крови доноров (в среднем – $77,6 \pm 1,6\%$) и больных с ХГН, получающих консервативное лечение заболевания ($63,2 \pm 2,1\%$).

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что для выделения АЛБ из образцов цельной сыворотки крови целесообразно использовать СКА в конечной концентрации 17,2%, так как в этих условиях достигается разумный компромисс между количеством выделяемого АЛБ и степенью его очистки. Поэтому во всех последующих экспериментах для выделения АЛБ методом высаливания использовали СКА именно в этой концентрации (17,2%).

Как видно из представленных в табл. 3 данных, количество АЛБ, выделяемого с помощью метода высаливания из сыворотки крови больных с ХГН, значительно меньше по сравнению с образцами

Таблица 4

Результаты опытов по выделению альбумина с помощью метода высаливания сульфатом аммония из сыворотки крови обследованных лиц
($\bar{X} \pm m$; в скобках указано число обследованных)

Группы обследованных лиц	Содержание альбумина в сыворотке крови, г/л высаливания, г/л	Содержание альбумина во фракции после в % от его содержан	Количество альбумина во фракции после высаливания в сыворотке крови
Доноры	$38,30 \pm 0,59$ (36)	$29,70 \pm 0,77$ (36)	$77,6 \pm 1,6$ (36)
Больные с ХГН в фазе ремиссии	$33,46 \pm 0,80^a$ (9)	$22,94 \pm 0,51^a$ (8)	$68,9 \pm 2,6^a$ (8)
Больные с ХГН с НС	$20,09 \pm 1,30^{a,b}$ (20)	$12,30 \pm 1,15^{a,b}$ (20)	$60,1 \pm 3,5^a$ (20)
Больные с ХГН с ХПН	$36,38 \pm 1,84^c$ (16)	$23,95 \pm 1,40^{a,c}$ (16)	$64,2 \pm 3,2^a$ (16)
Больные с ХГН, леченные ГД	$36,04 \pm 0,57^{a,b,c}$ (20)	$26,14 \pm 0,81^{a,b,c}$ (20)	$72,7 \pm 2,2^{c,d}$ (20)

Примечания: ХГН – хронический гломерулонефрит, НС – нефротический синдром, ХПН – хроническая почечная недостаточность, ГД – гемодиализ, Данные достоверно отличаются от данных: а – доноров

б – больных в фазе ремиссии

с – больных с НС

д – больных с ХПН

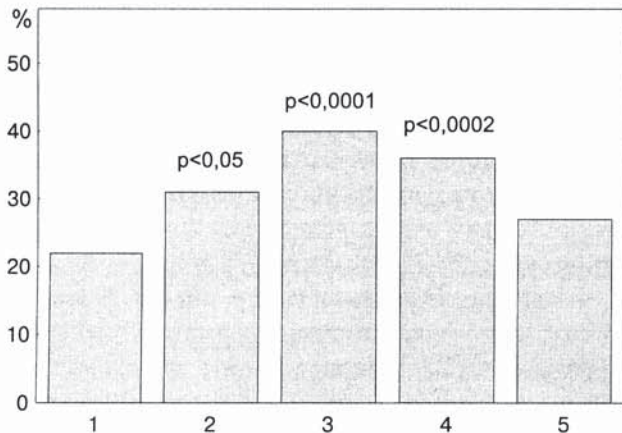


Рис. 2. Процент альбумина, выпавшего в осадок при высаливании из сыворотки крови: 1 – доноров ($n=36$), 2 – больных в фазе ремиссии ($n=8$), 3 – больных с нефротическим синдромом ($n=20$), 4 – больных в стадии нарушения функции почек ($n=16$), 5 – больных, леченных регулярным гемодиализом ($n=20$); (указана достоверность отличий результатов от данных доноров).

сыворотки крови доноров. Однако группа обследованных пациентов была неоднородной по своему составу. Среди пациентов, получающих консервативное лечение, были больные в фазе ремиссии и в фазе обострения, а также пациенты с нарушением функции почек, в том числе с уремией, леченные с помощью хронического ГД. По величине исходного содержания АЛБ в сыворотке крови среди больных выделялись пациенты с ХГН в фазе обострения, проявляющимся НС: концентрация АЛБ у этих больных в среднем составляла $20,1 \pm 1,30$ г/л, что почти в 2 раза ниже, чем у доноров ($p < 0,0001$) (табл. 4).

Существенные различия между группами обследованных пациентов выявлены по величинам процента выделенного АЛБ и, соответственно, по доле АЛБ, выпавшего в осадок в ходе процедуры высаливания (рис.2). Так, АЛБ сыворотки крови доноров в наименьшей степени терялся в процессе высаливания (в среднем – $22,4 \pm 1,6\%$ от исходного количества в сыворотке).

Самой малой устойчивостью к высаливающему эффекту СКА обладал АЛБ сыворотки крови больных с НС или с ХПН: количество АЛБ, выпавшего в осадок в ходе процедуры выделения, составил в среднем $39,9 \pm 3,5\%$ и $35,8 \pm 3,2\%$ от

исходного уровня соответственно. Промежуточное положение занимал АЛБ сыворотки крови больных в состоянии ремиссии: происходила потеря $31,1 \pm 2,6\%$ от первоначального содержания АЛБ в сыворотке. У больных, находящихся на гемодиализной терапии, отмечен неожиданно низкий процент АЛБ, выпавшего в осадок, – в среднем $27,3 \pm 2,2\%$ (табл. 4).

Как уже отмечалось, для определения количества и степени очистки АЛБ прибегали к электрофоретическому исследованию материала. Данные о содержании АЛБ, полученные в ходе ЭФ цельной сыворотки и фракции после высаливания, дали результаты, хорошо совпадающие с данными других методов. Однако анализ фореграмм позволил получить дополнительную информацию о содержании и соотношении между отдельными фракциями глобулинов в исследуемых образцах.

На рис.3 в качестве иллюстрации представлены типичные фореграммы сыворотки крови и фракции АЛБ после высаливания донора и больного с НС. Данные анализа фореграмм показали, что при высаливании происходило осаждение в первую

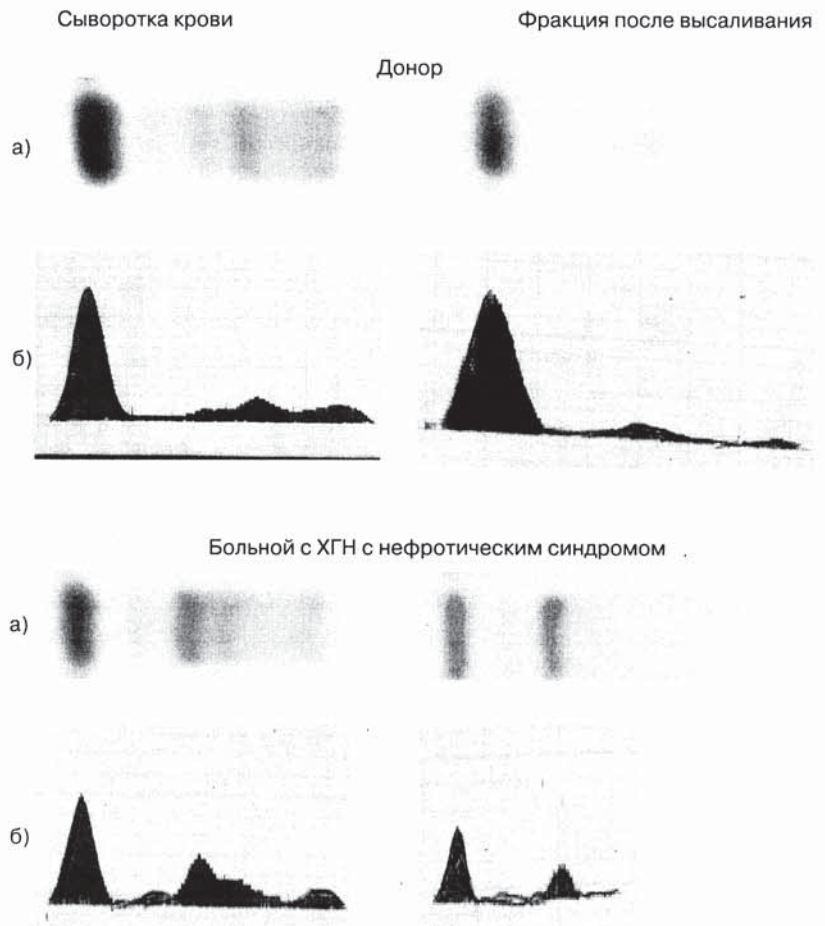


Рис. 3. Электрофореграммы (а) и денситограммы (б) сыворотки крови и фракции частично очищенного (с помощью высаливания) альбумина донора и больного хроническим гломерулонефритом с нефротическим синдромом.

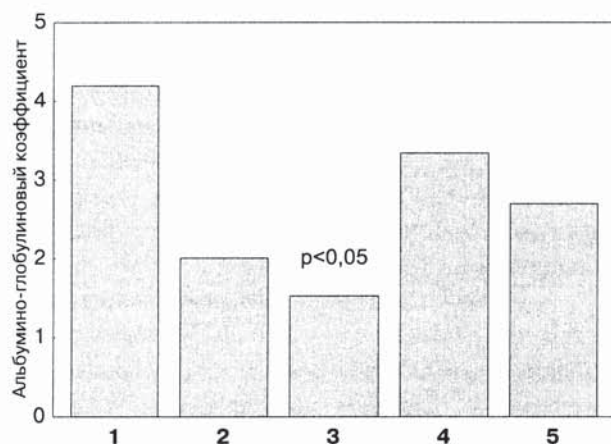


Рис. 4. Величина альбумино-глобулинового коэффициента во фракциях частично очищенной с помощью высаливания альбумина сыворотки крови обследованных лиц: 1 – доноров (n=36), 2 – больных в фазе ремиссии (n=8), 3 – больных с нефротическим синдромом (n=20), 4 – больных в стадии нарушения функции почек (n=16), 5 – больных, леченных регулярным гемодиализом (n=20); (указана достоверность отличий результатов от данных доноров).

очередь гамма-глобулиновой фракции (внадосадочной жидкости остается в среднем около 21% от их исходного количества). В меньшей степени осаждаются глобулины α_1 -, α_2 - и β -фракций: в супернатанте их остается в среднем 60%, 50% и 35% от исходного содержания в сыворотке.

Характеристикой степени очистки АЛБ сыворотки крови является величина альбумино-глобулинового коэффициента во фракции, полученной после высаливания (рис.4). Этот коэффициент имеет самое высокое значение в группе доноров – $4,2 \pm 0,7$. В группе больных с ХПН величина коэффициента составляла $3,3 \pm 0,6$; у пациентов, находящихся на лечении ГД, его значение составило $2,7 \pm 0,2$. Самые низкие значения коэффициента отмечены у больных с ХГН в состоянии ремиссии – $2,01 \pm 0,2$ и с НС – $1,5 \pm 0,3$.

Низкое значение альбумино-глобулинового коэффициента у больных с НС объясняется, с одной стороны, высоким содержанием α_2 -глобулиновой фракции в сыворотке, а с другой стороны – тем, что доля осаждаемых высаливанием альбумина и α_2 -глобулинов практически одинакова.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что АЛБ сыворотки больных с НС или на фоне развития ХПН у больных, получающих консервативное лечение, отличается наименьшей устойчивостью (растворимостью) в солевых растворах.

ОБСУЖДЕНИЕ

Растворимость белка в солевых растворах зависит от его гидрофильности и поверхност-

ного заряда, поэтому снижение растворимости в солевых растворах свидетельствует о появлении на поверхности молекулы гидрофобных кластеров, которые могут возникнуть при нарушении нативной конформации и разворачивании глобулы. Подобные нарушения происходят, в частности, при разрыве дисульфидных связей. Другая причина снижения растворимости АЛБ в солевых растворах – изменение поверхностного заряда. Если при патологии увеличивается содержание “щелочных фракций” АЛБ, можно ожидать, что такой АЛБ будет выпадать в осадок при высаливании в слабокислой среде (рН 6,1). Изменение поверхностного заряда может возникать и при нарушении нативной конформации, и при какой-либо ковалентной модификации заряженных групп. Таким образом, снижение растворимости АЛБ в солевых растворах может косвенно свидетельствовать о нарушении нативной конформации и о ковалентном связывании с лигандами.

Содержание АЛБ в 36 образцах сывороток доноров составляет $38,3 \pm 0,6$ г/л, что находится ближе к нижней границе нормы (35 – 45 г/л). Это не противоречит современным представлениям, так как в регионах с повышенным техногенным напряжением отмечается тенденция к гипопроотеинемии, причем типичной является диспротеинемия за счет снижения содержания АЛБ [3].

В солевых растворах АЛБ сыворотки крови доноров достаточно устойчив – при 40%-ном насыщении в супернатанте остается около 78% от общего количества АЛБ. Это свидетельствует о том, что часть АЛБ сыворотки крови здоровых людей имеет измененную конформацию и/или заряд и соответствует литературным данным, по которым в крови здоровых людей содержится около 10 – 15% минорных фракций АЛБ с рI 5,2 – 7,4 [1, 12].

Устойчивость АЛБ в солевом растворе у всех больных, получающих консервативное лечение, достоверно ниже, чем у доноров, и зависит от клинического варианта течения ХГН. Так, даже у пациентов в фазе ремиссии на фоне достоверного уменьшения уровня АЛБ плазмы по сравнению с донорами ($33,46 \pm 1,84$ г/л), количество альбумина, остающееся в супернатанте при высаливании, составляет в среднем всего $68,9 \pm 2,6\%$ от исходного количества.

В сыворотке крови больных с ХГН, осложненном НС, наблюдается самый низкий уровень АЛБ – $20,09 \pm 1,30$ г/л и самая малая растворимость в СКА – при высаливании в надосадке остается

только $60,1 \pm 3,5\%$ от исходного количества АЛБ. Это указывает на значительные нарушения физико-химических свойств и, следовательно, нативности АЛБ на фоне развития обострения ХГН. Вполне вероятно, что такие нарушения способствуют персистированию протеинурии при НС.

Содержание АЛБ в сыворотке крови больных с ХГН в стадии нарушения функции почек практически не отличается от данных доноров и составляет $36,38 \pm 1,84$ г/л. Однако устойчивость АЛБ при ХПН в солевых растворах сравнима с таковой при НС – в растворе остается $64,2 \pm 3,2\%$ от исходного содержания АЛБ.

Значительные потери АЛБ при высаливании сыворотки крови больных с ХПН могут быть связаны с загруженностью АЛБ эндотоксинами. Кроме того, можно предположить, что одним из механизмов модификации АЛБ при ХПН лежат свободнорадикальные окислительные процессы, которые, как известно, чрезвычайно ускорены в крови больных с азотемией [22].

В отличие от других обследованных пациентов в группе больных, получавших лечение регулярным ГД, не обнаружено достоверных отличий от доноров в растворимости АЛБ сыворотки крови в солевых растворах, что доказывает эффективность данного метода лечения пациентов с терминальной стадией заболевания.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, изучение устойчивости АЛБ в растворе СКА выявило нарушения физико-химических свойств этого белка в крови больных с ХГН. Уменьшение устойчивости (растворимости) АЛБ в солевых растворах может быть связано с частичным нарушением нативной конформации и изменением суммарного поверхностного заряда альбуминовой глобулы. Дальнейшая работа будет направлена на выяснение конкретных механизмов, лежащих в основе нарушения растворимости АЛБ плазмы крови больных с ХГН.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Ажицкий Г.Ю., Троицкий Г.В., Шараева Т.К. и др. Транзиторные минорные фракции сывороточного альбумина человека: физико-химические свойства // *Вопр. мед. химии*. - 1984. - Т.30, N5. - С.50-55.
2. Багдасарьян С.Н., Троицкий Г.В., Вершинин А.Я. Количественный метод оценки конформационных изменений альбумина сыворотки крови // *Укр. биохим. журн.* - 1979. - N4. - С.439-442.

3. Гильямирова Ф.Н., Радомская В.М., Баишева Г.М., Кротова И.Г. Традиционный анализ крови: новые экологически индуцированные тенденции // *Клинич. лаб. диагностика*. - 1999. - N10. - С.27.
4. Добрецов Г.Е., Миллер Ю.И. Центры связывания лигандов в молекуле альбумина // *Альбумин сыворотки крови в клинической медицине. Книга 1* / Ред. Ю.А.Грызун и Г.Е.Добрецов - М.: «Ириус», 1994. - С. 15-19.
5. Карякин Ю.В., Ангелов И.И. Чистые химические вещества. - М.: Химия, 1974. - 408 с.
6. Кухта В.К., Олецкий Э.И., Стохаров А.Н. Белки плазмы крови (патохимия и клиническое значение). - Минск: Беларусь, 1986.
7. Лабораторные методы исследования в клинике: справочник / Меньшиков В.В., Делекторская Л.Н., Золотницкая Р.П. и др. / Ред. В.В. Меньшиков. - М.: Медицина, 1987. - 368 с.
8. Поллад Дж. Справочник по вычислительным методам статистики / Пер. с англ. - М.: Финансы и статистика, 1982. - 344с.
9. Рябов С.И. Современные представления о хронической почечной недостаточности // *Лечение хронической почечной недостаточности* / Ред. С.И.Рябов. - СПб., 1997. - Гл.1. - С.11-26.
10. Селиванова К.Ф., Прикун А.В. Изоэлектрические спектры альбумина сыворотки крови у больных с нарушением функции щитовидной железы и нефротическим синдромом // *Укр. биохим. журн.* - 1981. - N4. - С.19-25.
11. Скоупс Р. Методы очистки белков: Пер. с англ. - М.: Мир, 1985. - 358 с.
12. Соколова Н.Н. Изоэлектрическое фокусирование альбумина сыворотки крови у больных гломерулонефритом и циррозом печени: Автореф. дис. канд. мед. наук: 14.00.05 / Крымский медицинский институт МЗ УССР. - Харьков, 1990. - 22 с.
13. Соркина Д.А. Структурные аспекты транспортной функции сывороточного альбумина // *Вопр. мед. химии*. - 1988. - N2. - С.8-16.
14. Титов В.Н., Амелюшкина В.А. Электрофорез белков сыворотки крови. - М.: Оптимум пресс, 1994. - 62 с.
15. Тиц Н.У. Энциклопедия клинических лабораторных тестов. - М.: Изд-во "Лабинформ", 1997. - 960с.
16. Урбах В.Ю. Статистический анализ в биологических и медицинских исследованиях. - М.: Медицина, 1975. - 295 с.
17. Чегер С.И. Транспортная функция сывороточного альбумина. - Бухарест: Изд-во Академии Соц. республики Румынии, 1975. - 183 с.
18. Brown J.R. Serum albumin: amino acid sequence // In: *Albumin structure, function and uses* / Ed. V.Rosenoer et al. - Oxford, 1977. - P.27-52.
19. Filler G., Jones D.H., Barratt T.M. Albumin charge distribution pattern in urine and plasma of children with different forms of nephrotic syndrome // *Congress of the EDTA - ERA, XXXVI-th: Abstracts*. - Vienna, 1990. - P.26.
20. Iglesias J., Levine J.S. Albuminuria and renal injury - beware of proteins bearing gifts // *Nephrol. Dial. Transplant.* - 2001. - Vol.16. - P.215-218.
21. Kubota Y., Ueki H. Determination of the isoelectric point of bovine plasma albumin by cellulose acetate paper electrophoresis // *J. Biochem.* - 1968. - Vol.64. - P.405-406.
22. Miyata T., Saito A., Kurokawa K., van Ypersele de Strihou C. Advanced glycation and lipoxidation end products: reactive carbonyl compounds-related uraemic toxicity // *Nephrol. Dial. Transplant.* - 2001. - Vol.16, Suppl.4. - P.8-11.
23. Rachinsky M.N., Foster Y.F. The salting-out behavior of bovine plasma albumin; further evidence for configurational isomerization // *Arch. Biochem. Biophys.* - 1957. - Vol.70, N1. - P.283-285.

Поступила в редакцию 22.12.2001 г.