

© А.И.Куликова, И.М.Зубина, Ф.А.Тугушева, 2002
УДК 616.63-008.6-085.38:547.962

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

СОСТОЯНИЕ АЛЬБУМИНА СЫВОРОТКИ КРОВИ УРЕМИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ ПРИ ЛЕЧЕНИИ РЕГУЛЯРНЫМ ГЕМОДИАЛИЗОМ

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

THE STATE OF SERUM ALBUMIN IN URAEMIC PATIENTS TREATED WITH CHRONIC HAEMODIALYSIS

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

РЕФЕРАТ

В сыворотке крови 20 уремических больных, получающих лечение программным бикарбонатным гемодиализом, исследованы содержание общего, нативного (НАЛБ) и модифицированного (МАЛБ) альбумина, общий уровень свободных сульфгидрильных групп (SH-группы) и количество неэтерифицированных жирных кислот (НЭЖК). Эти же показатели определяли в растворимой, частично очищенной фракции альбумина, полученной путем высаливания глобулинов с помощью раствора сульфата аммония со степенью насыщения 40%. Установлено значительное (на 30%), достоверное снижение уровня SH-групп по сравнению с контролем, и такое же падение молярного отношения SH-гр./альбумин ($p < 0,0001$). При этом, в отличие от здоровых лиц, в сыворотке больных наблюдается обратная корреляция между уровнями альбумина и SH-групп ($r = -0,44$, $n = 20$, $p < 0,01$). Эти результаты указывают на возможность окислительной модификации белковой глобулы и изменение нативной конформации молекулы альбумина. Количество НЭЖК в сыворотке крови до сеанса гемодиализа находится в пределах нормы, но резко (в среднем в 4 раза) возрастает к концу процедуры, что является следствием активации постгепариновой липопроотеидлипазы и свидетельствует о возможности проявления токсического эффекта НЭЖК на мембраны клеток (метаболического стресс-синдрома). Пул альбумина сыворотки крови гемодиализных больных, а также здоровых лиц, неоднороден: около 30% его составляет МАЛБ, который, в отличие от НАЛБ, не обладает свойством растворяться в этаноле после осаждения 20%-ным раствором трихлоруксусной кислоты. В процессе высаливания МАЛБ легко выпадает в осадок вместе с глобулинами (предположительно) содержит гораздо меньше SH-групп по сравнению с НАЛБ. Анализ многочисленных корреляционных взаимосвязей уровня МАЛБ с рядом клинико-лабораторных показателей, указывающих на адекватность гемодиализа и состояние больных (таких, как сроки пребывания на гемодиализе, "доза диализа" КТ/В, уровень гемоглобина), позволяет предполагать, что эта форма альбумина благоприятно влияет на основные показатели и выполняет таким образом протекторную, позитивную функцию. По-видимому, МАЛБ обладает более высокой способностью сорбировать НЭЖК и, следовательно, тормозит развитие метаболического стресс-синдрома.

Ключевые слова: гемодиализ, нативный и модифицированный альбумин, восстановленные тиолы, неэтерифицированные жирные кислоты.

ABSTRACT

The levels of total albumin (ALB), native ALB (NALB) and modified ALB (MALB), total content of free sulfhydryl groups (SHG) and of non-esterified fatty acids (NEFA) were determined in the serum of 20 uraemic patients treated with chronic bicarbonate haemodialysis. All the indices were also estimated in the soluble fraction of partially purified ALB obtained by the salting-out of globulins with the help of the ammonium sulfate solution with the 40% degree of saturation. A significant (30%) and statistically reliable decrease of the level of SHG was revealed in patients as compared with healthy subjects and the similar decrease of the molar ratio of SHG/ALB ($p < 0.0001$ in both cases). Unlike healthy subjects, in uraemic patients there was a negative correlation between the levels of ALB and SHG ($r = -0.44$; $n = 20$; $p < 0.01$). These results show that the oxidative modification of the ALB molecule is possible as well as changes in its native conformation. The content of serum NEFA before the hemodialysis treatment procedure is normal but it becomes about 4 times greater by the end of the procedure which is a result of the heparin-activated lipoproteidlipase action and can be considered as manifestation of a toxic effect of NEFA on the cell membranes (metabolic stress-syndrome). The serum ALB pool both in healthy subjects and in patients treated with hemodialysis is heterogenous: about 30% of it is MALB which (unlike NALB) is able to dissolve in ethanol after precipitation in 20% trichloroacetic acid. In the course of the salting-out procedure MALB is easily precipitated along with globulins and appears to contain less SHG than NALB. An analysis of numerous correlations between the level of MALB and other clinical-laboratory indices pointing to hemodialysis adequacy and the state of patients (such as the duration of hemodialysis treatment, the KT/V volume, the hemoglobin level etc) suggests that MALB positively influences these indices and thus has a protective function. MALB appears to possess higher ability to bind greater amounts of NEFA and thus to inhibit the development of stress-syndrome.

Key words: hemodialysis, native and modified albumin, sulfhydryl groups, non-esterified fatty acids.

ВВЕДЕНИЕ

Как известно, патология почек тесно связана с нарушениями белково-липидного обмена. Большие потери белка с мочой при хроничес-

ком гломерулонефрите (ХГН), дальнейшая интоксикация организма продуктами его распада при развитии хронической почечной недостаточности (ХПН), усиленный катаболизм белков

при лечении терминальной уремии с помощью регулярного гемодиализа предъявляют организму повышенные требования в отношении синтеза белка в печени и его участия в регуляции коллоидно-осмотического давления внеклеточной жидкости, в поддержании рН плазмы крови, а также в связывании низкомолекулярных соединений липидной природы. Этой теме посвящено огромное количество работ, но большинство из них касается белкового метаболизма на ранних стадиях заболеваний почек и гораздо меньше – при гемодиализе [11]. Специфическими осложнениями гемодиализной терапии являются анемия, гиперпаратиреоз, нарушения белкового обмена, сердечно-сосудистые заболевания. В настоящее время использование современных технологий позволяет успешно корректировать анемию и гиперпаратиреоз. Однако проблемы белково-энергетической недостаточности и состояния сердечно-сосудистой системы еще требуют своего решения. По нашему мнению, изучение физико-химических и, в первую очередь, сорбционных свойств альбумина у больных, получающих лечение программным гемодиализом, представляет значительный интерес.

Альбумин - это глобулярный белок с молекулярной массой около 66400 Дальтон и представляющий собой одну полипептидную цепь из 585 аминокислотных остатков. В составе альбумина находится 35 остатков цистеина, 34 из которых связаны дисульфидными (-S-S-) связями, которые обеспечивают пространственную организацию молекулы и сохраняют ее глобулярную форму после связывания различных лигандов [13]. Один остаток цистеина остается свободным, поэтому молярное соотношение SH-групп к альбумину в обычных условиях близко к единице.

Гидрофобные группировки аминокислот формируют погруженные вглубь «щелевые карманы», в которые встраиваются лиганды с длинными алифатическими цепями - жирные кислоты (ЖК), причем с наиболее высокой аффинностью связываются пальмитиновая (C 16:0), стеариновая (C 18:0) и олеиновая (C 18:1) ЖК, но не связываются более длинные и полиненасыщенные ЖК. Насыщенные ЖК являются главными лигандами альбумина (1-2 моль ЖК/моль альбумина).

Связывание с альбумином гидрофобных молекул, и ЖК в том числе, представляет для них единственную возможность достичь клеток. Взаимодействие альбумин – лиганд обратимо.

Предполагается, что потеря альбумином способности связывать ЖК является одним из факторов его катаболизма. Как подробно описано в обзоре В.Н.Титова [14], в ассоциации с альбумином жирная кислота проходит через эндотелий, межклеточную жидкость и далее диффундирует через мембрану клеток, обеспечивая энергетическим субстратом как глубокие слои стенки сосудов, так и клетки тканей.

Трансмембранный транспорт ЖК осуществляется путем кавеолин-стимулированного эндоцитоза, который происходит только с комплексом (альбумин-ЖК), но не со свободными жирными кислотами. При высокой концентрации в крови жирных кислот наряду с формированием комплекса (альбумин + насыщенная ЖК) часть их остается свободной, формируя недиссоциированные (т.е. не имеющие заряда) мицеллярные структуры.

Циркулирующие в свободном виде и недиссоциированные жирные кислоты обладают сильным токсическим эффектом, в частности, проявляют выраженное аритмогенное и гипертензивное действие, т.к. они, встраиваясь в мембраны, формируют неспецифические ионные каналы, повышают жидкостность мембраны и стимулируют нерегулируемые потоки ионов, меняют активность Na^+/K^+ -АТФазы и Ca^{2+} -АТФазы, в результате чего нарушают функцию клеток, а также ингибируют активный транспорт в клетки полиеновых ЖК. Высокий уровень свободных ЖК обладает иммуносупрессивным действием и ингибирует цитотоксичность лимфоцитов. В итоге формируется особое состояние – метаболический стресс-синдром, в основе которого лежит повышение в крови уровня свободных ЖК и их токсическое действие на структуру и функцию клеточных мембран [14]. При молярном отношении ЖК/альбумин, равном единице, все незэстерифицированные ЖК (НЭЖК) связаны с альбумином. Более высокое соотношение свидетельствует о встраивании части свободных НЭЖК в мембраны клеток. Отношение 4:1 указывает на то, что большинство НЭЖК связано с мембранами клеток.

Ранее, с помощью метода, основанного на использовании специфичного для альбумина флуоресцентного зонда К-35, нами было показано, что у больных на гемодиализе резко снижается связывающая способность альбумина при нормальных величинах общей концентрации, что свидетельствует о загруженности активных центров альбумина токсинами и продуктами протеолиза [18]. Однако возможно,

что низкая флуоресценция зонда К-35, по крайней мере частично, связана с заполнением активных центров жирными кислотами. В любом случае резерв связывания альбумина снижен и это приводит к резкому повышению индекса токсичности, характеризующего степень интоксикации всего организма.

Лечение гемодиализом создает, по меньшей мере, две предпосылки для проявления токсического эффекта свободных ЖК: ацидоз и гепаринизация при подключении к диализному аппарату. Гепарин, как известно, резко стимулирует постгепариновую липопроотеидлипазу крови, катализирующую гидролиз триглицеридов в составе ЛПОНП в положении 1 и 3, т.е. отщепление именно насыщенных ЖК, для связывания которых и необходим альбумин. Ацидоз снижает диссоциацию ЖК и уменьшает их способность связываться с альбумином.

Благодаря особенностям своего строения альбумин способен к различным конформационным перестройкам, и это позволяет ему участвовать в неспецифических реакциях адаптации. О возможности изменений физико-химических свойств и конформационного состояния альбумина при заболеваниях почек свидетельствуют работы А.Д.Кожевникова и соавт. [6, 7]. По мнению этих авторов, усиленное связывание мочевины альбумином при ХГН меняет конформацию молекулы белка и предохраняет его от воздействия протеаз. Кроме того, в этих работах показано наличие сдвига спектров флуоресценции альбумина больных ХГН в коротковолновую область, что трактуется как изменение третичной и вторичной структуры белка.

В 1973 – 1986 годах Г.В.Троицкий и соавт. провели ряд исследований, показавших наличие в сыворотке крови больных с различными заболеваниями особой формы альбумина, которая, в отличие от обычной, не способна растворяться в этиловом спирте после осаждения трихлоруксусной кислотой [1, 2, 15]. Эта форма, которую авторы называли модифицированным альбумином, электрофоретически и иммунологически идентична обычной, нативной форме. Свойства и функции модифицированного альбумина остаются малоизученными в силу сложности методических подходов.

Задачей настоящей работы явилось изучение физико-химических свойств альбумина, выявление модифицированного альбумина и выяснение его роли у уремических больных, леченных с помощью регулярного бикарбонатного гемодиализа.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Обследовано 20 пациентов (12 мужчин и 8 женщин) с хронической почечной недостаточностью, получавших лечение регулярным бикарбонатным гемодиализом в течение 8 – 114 месяцев, в среднем $49,5 \pm 7,4$ мес.

Средний возраст больных составил $48,2 \pm 2,8$ года (25 – 65 лет). Причиной развития терминальной ХПН послужили следующие заболевания: ХГН – 14 случаев; мочекаменная болезнь с вторичным хроническим пиелонефритом – 2 случая; васкулит – 2; амилоидоз – 1; хронический интерстициальный нефрит – 1 случай.

Все больные с ХПН получали лечение гемодиализом в стандартном режиме – 3 раза в неделю по 4 – 4,5 часа на аппаратах «Fresenius 2008», «Altin-Nikisso», «HD-Secura». В табл.1 представлены основные клинико-лабораторные параметры пациентов, получающих лечение программным гемодиализом.

Таблица 1

Клинико-лабораторные параметры гемодиализных больных ($\bar{X} \pm m$), n=20

Показатель	Значение
Пол, м/ж	12/8
Возраст, годы	$48,2 \pm 2,8$
Длительность гемодиализной терапии, мес.	$49,5 \pm 7,4$
Гемоглобин, г/л	$90,2 \pm 4,2$
Креатинин крови, ммоль/л	$1,02 \pm 0,03$
Мочевина крови, ммоль/л	$31,2 \pm 1,9$
"Доза диализа", КТ/В	$1,28 \pm 0,07$
АЛТ, ммоль/л(·)час	$0,269 \pm 0,042$
АСТ, ммоль/л(·)час	$0,163 \pm 0,023$
Щелочная фосфатаза, мккат/л	$3,17 \pm 0,48$

Контрольная группа состояла из 36 здоровых доноров (22 мужчины и 14 женщин), средний возраст которых составил $41,1 \pm 1,2$ года.

Материалом исследования являлась сыворотка крови, взятой из артериовенозной фистулы при подключении к диализному аппарату. У доноров кровь брали утром натощак из локтевой вены.

Для оценки состояния альбумина сыворотки крови использовался комплекс лабораторных биохимических исследований, включавший в себя определение общей концентрации альбумина, фракций нативного и модифицированного альбумина, содержания общих сульфгидрильных групп (SH-гр.), уровня неэстерифицированных жирных кислот. Кроме этого определяли содержание общего белка.

Все показатели, характеризующие состояние альбумина и его свойства, определяли как в сыворотке крови, так и в растворимой фракции альбумина, полученной после частичного осаждения глобулинов сульфатом аммония при 40%-ном насыщении раствора солью (высаливании).

Концентрацию альбумина определяли унифицированным методом по реакции с бромкрезоловым зеленым [8] с помощью наборов НПФ "Абрис+".

Фракции нативного и модифицированного альбумина определяли методом Г.В.Троицкого [16]. Метод основан на способности нативного альбумина (НАЛБ) растворяться в спирте после осаждения трихлоруксусной кислотой (ТХУ), модифицированный альбумин (МАЛБ) при такой обработке остается в осадке. К белковому раствору (разведенная сыворотка или фракция после осаждения) по каплям добавляли равный объем 20%-ного раствора ТХУ и центрифугировали 10 минут при 3000 об./мин. Осадок дважды промывали 5%-ным раствором ТХУ, затем растворяли в 80%-ном этаноле, выдерживали 30 минут при температуре 8 °С и центрифугировали 10 минут при 4000 об./мин. Содержание общего белка в супернатанте определяли биуретовым методом. Для кислых спиртовых растворов использовали биуретовый реактив, приготовленный на 1N гидроксиде натрия. Для построения калибровочной кривой точную навеску

альбумина (бычий сывороточный альбумин для вирусологических исследований) растворяли в 70%-ном этаноле с 10%-ным содержанием ТХУ. В холостую пробу вместо биологического материала добавляли 0,1 мл 10%-ного раствора ТХУ в 70%-ном этиловом спирте [3].

Сульфгидрильные группы определяли в классической реакции Элмана [22].

Свободные (неэтерифицированные) жирные кислоты определяли спектрофотометрическим методом [10].

Содержание общего белка определяли унифицированным методом по биуретовой реакции [8] с помощью наборов НПФ "Абрис+".

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием общепотребительных методов параметрической и непараметрической статистики [9, 19]. Методы дескриптивной статистики включали в себя оценку среднего арифметического ($\bar{X}$), средней ошибки среднего значения (m). Для сравнения двух групп применяли U-критерий Вилкоксона-Манна-Уитни. Для сравнения парных (сопряженных) выборок использовали парный Ud-критерий Вилкоксона. Использовали также t-критерий Стьюдента и методы корреляционного анализа (t-критерий Кендела) [4]. Статистическая обработка материала выполнялась на ПЭВМ с использованием стандартного пакета программ прикладного статистического анализа

Таблица 2

Исследуемые показатели доноров и больных, получающих гемодиализную терапию
($\bar{X} \pm m$, в скобках указано число обследованных лиц)

Показатель	Сыворотка крови			Растворимая фракция (после высаливания)			P ₁₋₃	P ₂₋₄
	доноры	гемодиализные больные	P ₁₋₂	доноры	гемодиализные больные	P ₃₋₄		
Общий белок, г/л	69,4±1,3 (36)	69,1±0,7 (20)	>0,05	38,3±1,0 (36)	36,7±1,1 (20)	>0,05	<0,0001	<0,0001
Альбумин, г/л	38,3±0,6 (36)	36,0±0,6 (20)	<0,01	29,7±0,8 (36)	26,1±0,8 (20)	<0,005	<0,0001	<0,0001
Альбумин, ммоль/л	0,569±0,011 (24)	0,543±0,009 (20)	<0,01	0,452±0,016 (24)	0,394±0,012 (20)	<0,005	<0,0001	<0,0001
T-SH, ммоль/л	0,616±0,012 (24)	0,409±0,015 (20)	<0,0001	0,430±0,011 (24)	0,326±0,012 (20)	<0,0001	<0,0001	<0,0001
T-SH/альбумин	1,09±0,08 (24)	0,760±0,040 (20)	<0,0001	0,970±0,020 (24)	0,840±0,030 (20)	<0,01	<0,05	<0,001
НЭЖК, ммоль/л	0,454±0,035 (24)	0,429±0,044 (16)	>0,05	0,477±0,31 (24)	0,344±0,027 (16)	<0,005	>0,05	>0,05
НЭЖК/альбумин	0,800±0,030 (24)	0,790±0,080 (16)	>0,05	1,080±0,080 (24)	0,900±0,080 (16)	>0,05	<0,0001	>0,05
МАЛБ, г/л	11,40±0,91 (12)	11,76±0,93 (20)	>0,05	-	4,33±0,60 (20)	-	-	<0,0001
МАЛБ, % от АЛБ	28,8±1,9 (12)	32,3±2,2 (20)	>0,05	-	16,0±1,9 (20)	-	-	<0,0001
НАЛБ, г/л	27,9±0,7 (12)	24,3±0,8 (20)	<0,002	-	21,8±0,6 (20)	-	-	<0,0002

Примечания: Сокращения соответствуют сокращениям в тексте; прочерк означает отсутствие данных.

(Statistica for Windows v.5.0). Критический уровень достоверности нулевой статистической гипотезы (об отсутствии значимых различий) принимали равным 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В табл. 2 представлены результаты определения изучаемых показателей у здоровых лиц (доноров) и уремических больных, получающих регулярное лечение программным гемодиализом. В сыворотке крови обеих групп не обнаружено различий в содержании общего белка, НЭЖК и модифицированного альбумина. Общее содержание альбумина у гемодиализных больных немного снижено по сравнению с донорами, но в среднем находится в пределах нормы. Содержание нативного альбумина в группе больных также несколько снижено (в среднем на 13 %, $p < 0,002$). Таким образом, более низкое содержание альбумина у гемодиализных больных связано с уменьшением доли нативной формы альбумина.

Содержание свободных SH-групп, равно как и молярное соотношение SH-гр./альбумин, снижено у гемодиализных больных в значительной степени (на 34 и 30% соответственно, $p < 0,0001$). Поскольку доля снижения обоих показателей примерно одинакова, можно с уверенностью считать, что падение уровня сульфгидрильных групп объясняется не уменьшением содержания альбумина, а окислением SH-групп вследствие стимуляции реакций свободнорадикального окисления с образованием дисульфидных мостиков, приводящим к появлению смешанных дисульфидов или димерных форм альбумина. Таким образом, около трети SH-групп альбумина больных, леченных с помощью гемодиализа, находится в окисленном состоянии.

Использование высаливания с помощью раствора сульфата аммония с целью частичной очистки альбумина показало, что в растворимой фракции остается приблизительно одинаковое количество альбумина – около 78% у доноров и 73% у гемодиализных больных, что свидетельствует о достаточно высокой устойчивости белка к высаливанию в обеих группах. Альбумин-глобулиновый коэффициент в результате очистки увеличился с 1,36 до 4,2 у доноров и с 1,10 до 2,70 у больных, содержание глобулинов снизилось в 3,1 раза. Уровень свободных SH-групп в растворимой фракции, так же как и в сыворотке крови, в донорской группе достоверно выше (на 32%, $p < 0,0001$). Но если в донорской группе при высаливании уровень SH-

групп снижается приблизительно на 30%, то в группе больных – только на 20%. За счет этого в растворимой фракции достоверно повышается молярное соотношение SH-гр./альбумин – с 0,76 до 0,84 ($p < 0,001$). Это указывает на преобладание в растворимой фракции пула альбумина с восстановленными SH-группами.

Практически все НЭЖК остаются в растворимой фракции, и их содержание находится в пределах нормальных величин как у доноров, так и у гемодиализных больных (при заборе крови перед подключением к диализному аппарату и до гепаринизации).

Значительные различия выявлены относительно растворимости нативного и модифицированного альбумина у гемодиализных больных при высаливании сульфатом аммония (в группе доноров такие исследования не проводились). Оказалось, что в растворимой фракции остается большая часть нативной формы альбумина (НАЛБ) – 89,7% и значительно меньшая – модифицированной формы (МАЛБ) – всего около 37%. Таким образом, эти две формы четко различаются по способности выпадать в осадок при высаливании: модифицированный альбумин представляет собой малорастворимую форму альбумина, нативный – высокорастворимую форму. Эти данные представлены на рис. 1.

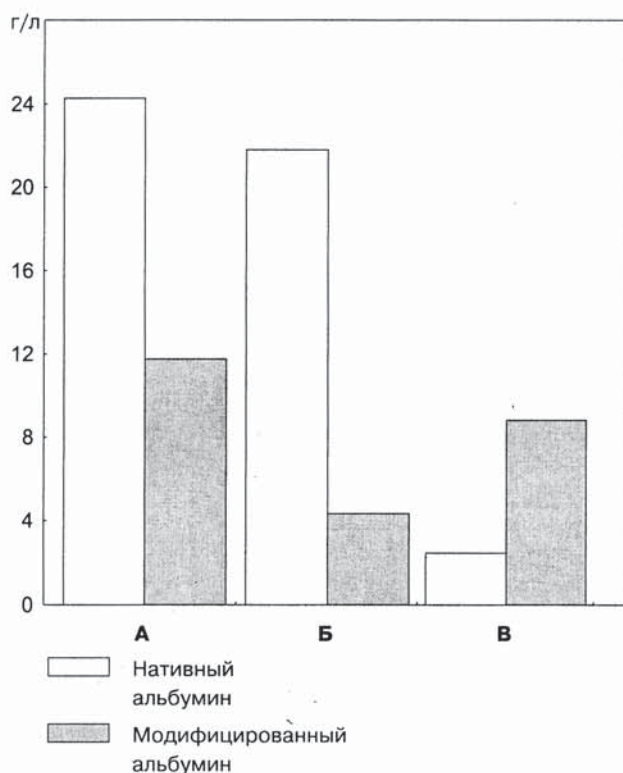


Рис. 1 Содержание нативного и модифицированного альбумина в сыворотке крови гемодиализных больных (А), в растворимой фракции (Б) и в осадке (В), полученных при высаливании.

Одной из основных функций альбумина является связывание НЭЖК. В процессе процедуры гемодиализа уровень НЭЖК может значительно повышаться и таким образом превышать сорбционную емкость альбумина. Если молярное соотношение НЭЖК/альбумин превышает величину, равную двум, это свидетельствует о том, что все высокоаффинные центры связывания заняты, а если оно приближается к четырем, то большая часть НЭЖК находится в несвязанном состоянии, и таким образом возникают условия для формирования метаболического стресс-синдрома. С целью выяснения такой возможности была проведена отдельная серия исследований, в которой определялось содержание альбумина и НЭЖК перед началом процедуры гемодиализа и в самом ее конце. Результаты представлены на рис.2. Как видно из этого рисунка, в конце сеанса имеет место более чем четырехкратный подъем уровня НЭЖК за счет активации липопротеидлипазы под влиянием гепарина. Так как содержание альбумина в течение процедуры нарастает незначительно, то в конце сеанса резко повышается соотношение НЭЖК/альбумин (в среднем до величины 2,79). Таким образом, действительно, гемодиализ создает возможность развития метаболического стресс-синдрома. В междиализный период уровень НЭЖК нормализуется.

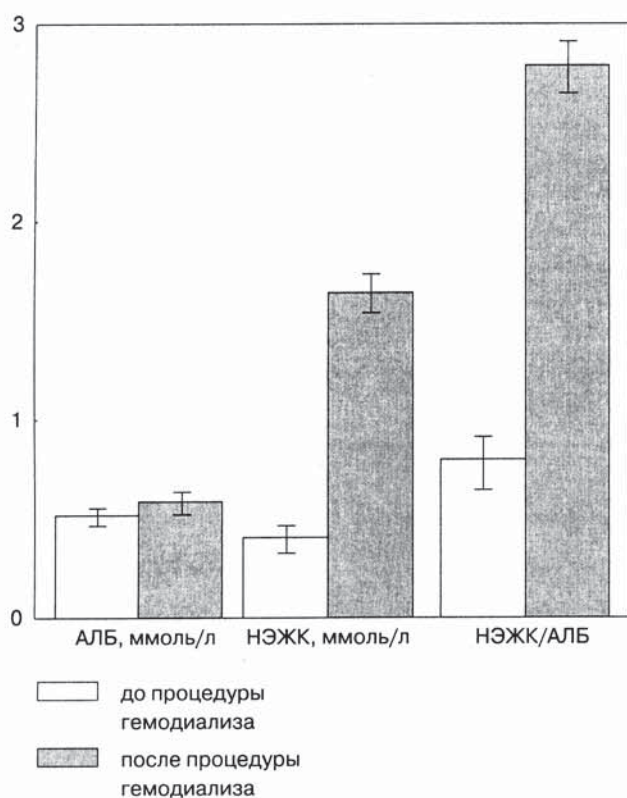


Рис.2. Содержание альбумина и незатерифицированных жирных кислот (НЭЖК) в сыворотке крови гемодиализных больных до и после процедуры гемодиализа.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Выполненные исследования показывают, что уровень альбумина сыворотки крови гемодиализных больных мало отличается от уровня альбумина сыворотки крови доноров. Достаточно низкое содержание альбумина у доноров ($38,3 \pm 0,6$ г/л) отражает негативные тенденции влияния повышенных техногенных факторов на организм и снижение потребления пищевого белка, что отмечают и другие авторы [5]. В солевых растворах альбумин достаточно устойчив – при 40%-ном насыщении сульфатом аммония в осадок выпадает около 22% его у доноров и 27% – у больных. Следовательно, пул альбумина в крови неоднороден и часть его даже у здоровых людей имеет измененную конформацию и/или электрический заряд. Этот вывод согласуется с литературными данными о том, что около 10–15% альбумина сыворотки крови здоровых людей представлено минорными фракциями с величиной $pI=5,2-7,4$ [12, 17]. Содержание МАЛБ в обеих группах составляет около трети от общего количества альбумина и прямо пропорционально его уровню в крови, о чем свидетельствует положительная корреляционная зависимость между ними ($r=0,48$, $n=12$, $p<0,05$ и $r=0,49$, $n=20$, $p<0,01$, соответственно). В донорской группе уровень МАЛБ у мужчин достоверно выше, чем у женщин ($p<0,05$). Кроме того, обнаружено снижение содержания нативной формы альбумина (НАЛБ) с возрастом ($r=-0,45$, $n=12$, $p<0,05$). В группе больных такая зависимость не выявлена. В процессе очистки альбумина путем высаливания в растворимой фракции остаются обе формы альбумина, но преобладает НАЛБ, тогда как две трети МАЛБ выпадают в осадок.

Как уже отмечалось, содержание НЭЖК и молярное соотношение НЭЖК/альбумин до сеанса гемодиализа находятся в пределах нормы, но к концу его эти величины резко возрастают, создавая предпосылки для реализации метаболического стресс-синдрома, в основе которого лежит токсический эффект свободных жирных кислот на мембраны, в том числе и на мембраны кардиомиоцитов. Возможно, это явление лежит в основе возникновения ряда сердечно-сосудистых осложнений, и в первую очередь аритмий, в процессе сеанса гемодиализа, что требует детального анализа.

В модельных опытах показано, что альбумин со свободной SH-группой (меркаптальбумин) способен связывать меньше НЭЖК по сравнению с альбумином, у которого SH-группа находится в окисленном состоянии [23]. Наши исследования

показали, что у гемодиализных больных, в отличие от здоровых лиц, резко снижен уровень SH-групп. В нормальных условиях на одну молекулу альбумина приходится одна свободная SH-группа, так что молярное соотношение SH-гр./альбумин должно приближаться к единице. Это условие выполняется у лиц донорской группы, где соотношение SH-гр./альбумин составляет величину $1,09 \pm 0,08$. Соответственно с увеличением уровня альбумина возрастает и содержание SH-групп (рис. 3, а). Однако у гемодиализных больных по мере увеличения уровня альбумина содержание SH-групп, напротив, снижается (рис. 3, б), следствием чего является падение молярного соотношения SH-гр./альбумин до величины $0,76 \pm 0,04$. У пациентов на гемодиализе между уровнем альбумина сыворотки крови и содержанием SH-групп отмечается отрицательная корреляционная взаимосвязь ($\tau = -0,44$, $n=20$, $p<0,01$). Таким образом, свойства альбумина у них резко изменены: около трети SH-групп находится в окисленном состоянии, а это отражается как на конформации белковой глобулы, придавая ей дополнительную жесткость [14], так и на возможности образовывать связи с лигандами по типу смешанных дисульфидов. Это предположение согласуется с литературными данными о стимуляции свободнорадикальных модификаций белков при азотемии [21].

Мы считаем возможным высказать предположение, что снижение уровня SH-групп в альбумине гемодиализных больных является приспособительно-компенсаторным механизмом, повышающим сродство альбумина к НЭЖК и таким образом снижающим токсический эффект избытка образующихся под воздействием постгепариновой липопропротеидлипазы НЭЖК. В пользу такого предположения свидетельствует, с одной стороны, положительная корреляционная взаимосвязь между уровнями альбумина и НЭЖК у пациентов, получающих гемодиализную терапию ($\tau=0,49$, $n=16$, $p<0,01$), и с другой – отрицательная зависимость содержания SH-гр. от содержания альбумина, чего не наблюдается в донорской группе. Кроме того, обнаружена обратная зависимость между молярными соотношениями SH-гр./альбумин и НЭЖК/альбумин ($\tau = -0,38$, $n=16$, $p<0,05$), что также свидетельствует об антагонистических взаимодействиях в отношении связывания НЭЖК окисленной

и восстановленной по SH-группе формой альбумина. В донорской группе такие корреляционные взаимосвязи не обнаружены, поэтому наши рассуждения касаются только свойств альбумина у гемодиализных больных, то есть в условиях той патологии, где выброс избытка НЭЖК и возможность развития метаболического стресс-синдрома является обычным спутником сеанса гемодиализа в результате гепаринизации. Что же касается вопроса о том, в какой именно форме альбумина – МАЛБ или НАЛБ – преобладают окисленные SH-группы, то ответ на него требует дополнительных исследований, хотя некоторые косвенные данные и, в частности, наличие достоверной отрицательной корреляции между уровнями МАЛБ и SH-групп ($\tau = -0,42$, $n=20$, $p<0,01$) наводят на мысль о преобладании в структуре МАЛБ окисленных SH-групп в виде дисульфидных связей. Возможно, это обстоятельство является причиной снижения его растворимости в солевых растворах.

Отсутствие зависимости содержания альбуми-

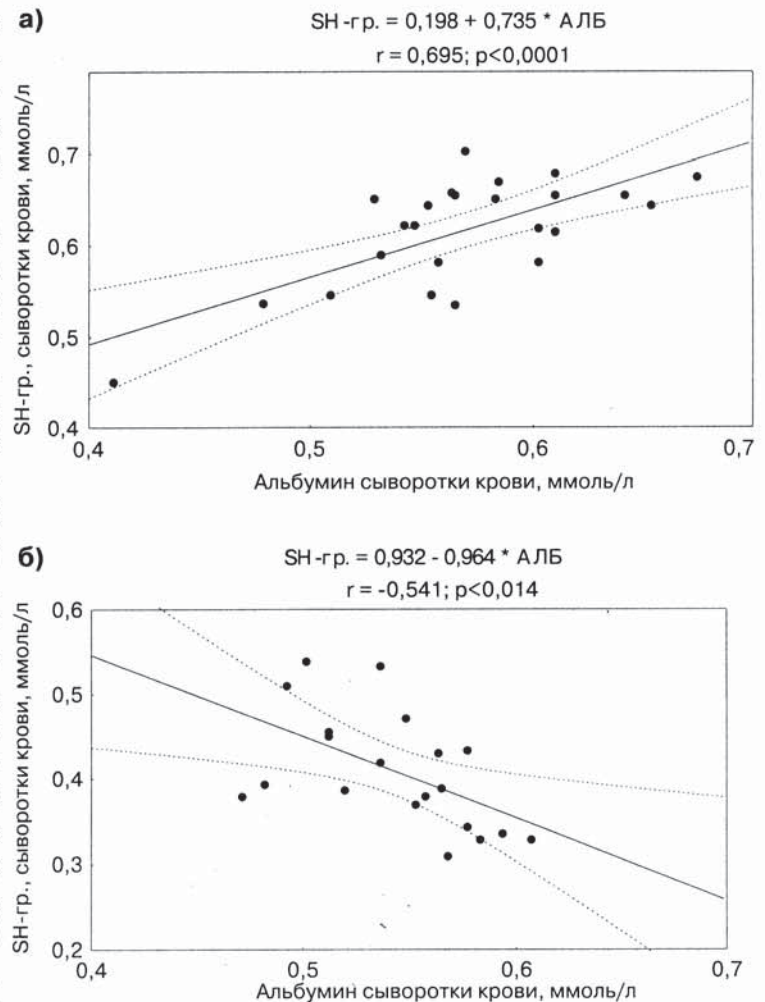


Рис. 3. Взаимосвязь между содержанием альбумина (АЛБ) и уровнем восстановленных тиолов (SH-гр.) в сыворотке крови доноров (а) и больных, получавших лечение гемодиализом (б).

на и его модифицированной формы от пола и возраста у гемодиализных больных, в отличие от здоровых людей, указывает на преобладающую роль почечной патологии и характера лечебного воздействия у этих лиц. Для характеристики состояния пациента крайне важны сроки его пребывания на гемодиализной терапии, «доза диализа», выраженная величиной КТ/V, а также уровень гемоглобина. С увеличением сроков лечения больного с помощью гемодиализа происходит постепенное истощение организма и усиление катаболических процессов, что отмечено многими авторами [11, 20]. Корреляционный анализ показал, что между уровнем альбумина растворимой фракции и длительностью гемодиализной терапии обнаруживается отрицательная взаимосвязь ($\tau = -0,54$, $n=20$, $p<0,001$); кроме того, обратная зависимость отмечена и между длительностью нахождения на гемодиализе и уровнем НАЛБ в растворимой фракции ($\tau = -0,58$, $n=20$, $p<0,001$), но прямая - с количеством альбумина, выпавшего в осадок в процессе высаливания (в котором, как указывалось, 75% альбумина представлено МАЛБ, см. рис.1). Таким образом, по мере увеличения сроков пребывания на гемодиализе снижается содержание НАЛБ растворимой фракции, но нарастает содержание МАЛБ в осадке.

Величина КТ/V, отражающая эффективность гемодиализной процедуры, также отрицательно коррелирует с уровнем общего белка и НАЛБ растворимой фракции ($\tau = -0,44$, $n=20$, $p<0,01$ и $\tau = -0,42$, $n=20$, $p<0,01$, соответственно), но положительно - с количеством альбумина, выпавшего в осадок, т.е. фактически с МАЛБ. Таким образом, с эффективностью очистки крови во время сеанса гемодиализа связан качественно измененный альбумин - МАЛБ, в составе которого уровень свободных SH-групп ниже (между КТ/V и уровнем SH-групп также имеется отрицательная взаимосвязь: $\tau = -0,33$, $n=20$, $p<0,05$).

Между уровнем гемоглобина и исследуемыми показателями также выявлены множественные корреляционные взаимосвязи. Так, содержание гемоглобина положительно коррелирует с уровнем общего альбумина сыворотки ($\tau = 0,49$, $n=20$, $p<0,005$), с содержанием НЭЖК ($\tau = 0,45$, $n=16$, $p<0,05$) и с МАЛБ ($\tau = 0,38$, $n=20$, $p<0,05$), но отрицательно - с концентрацией SH-гр. ($\tau = -0,40$, $n=20$, $p<0,05$) и с молярным соотношением SH-гр./альбумин ($\tau = -0,42$, $n=20$, $p<0,05$).

Из других показателей обращает на себя внимание отрицательная взаимосвязь между активностью щелочной фосфатазы и величиной

МАЛБ ($\tau = -0,36$, $n=20$, $p<0,05$) и положительная - с величиной НАЛБ ($\tau = 0,35$, $n=20$, $p<0,05$) и с отношением SH-гр./альбумин ($\tau = 0,33$, $n=20$, $p<0,05$). Если считать, что повышение уровня щелочной фосфатазы связано с прогрессированием вторичного гиперпаратиреоза, то более высокий уровень МАЛБ отражает более благоприятное его течение. Таким образом, если анализировать взаимосвязи уровня МАЛБ с важнейшими клиничко-лабораторными показателями, характеризующими состояние больных на гемодиализе, то создается впечатление, что модифицированная форма альбумина гемодиализных больных играет некую позитивную роль в поддержании метаболического гомеостаза. Предположительно эта роль заключается в более успешном связывании НЭЖК и предотвращении развития метаболического стресс-синдрома.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленные в настоящем исследовании результаты свидетельствуют о важности изучения не только содержания, но и свойств альбумина у больных с терминальной ХПН, леченных с помощью регулярного гемодиализа. В работе показано, что альбумин сыворотки крови этих больных содержит гораздо меньше свободных сульфгидрильных групп по сравнению со здоровыми лицами, что связано с окислительной модификацией и является причиной изменения конформации белковой глобулы. Установлено наличие модифицированной формы альбумина (МАЛБ), содержание которой составляет около трети от общего количества альбумина. При очистке альбумина высаливанием с помощью 40%-ного раствора сульфата аммония в растворимой фракции уровень МАЛБ резко уменьшается, что свидетельствует о его более низкой растворимости по сравнению с нативным альбумином. Использование результатов корреляционного анализа позволяет предполагать, что МАЛБ у гемодиализных больных выполняет определенную компенсаторно-приспособительную функцию, стабилизирующую состояние больных на гемодиализе. По-видимому, МАЛБ обладает более высокой способностью связывать НЭЖК, уровень которых резко возрастает к концу сеанса гемодиализа за счет активации гепаринзависимой липопротеидлипазы и таким образом уменьшает токсический эффект свободных жирных кислот, лежащий в основе метаболического стресс-синдрома.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Багдасарьян С.Н., Касимова Г.А., Клишевич И.Б., Фоменко О.Г. Иммунологическая характеристика сывороточного альбумина, модифицированного при патологии // Молекуляр. биология. - Киев, 1982. - Вып.33. - С.68-71.
2. Багдасарьян С.Н., Троицкий Г.В., Алахов Ю.Б. Модификация сывороточного альбумина при патологии // Докл. АН СССР. - 1980. - Т.255, N1. - С.222 - 224.
3. Багдасарьян С.Н., Троицкий Г.В., Вершинин А.А. Количественный метод оценки конформационных изменений альбумина сыворотки крови // Укр. биохим. журн. - 1979. - N4. - С. 439-442.
4. Дрейпер Т., Смит Г. Прикладной регрессионный анализ / В 2-х томах: Пер. с англ. - 2-е изд. - М.: Финансы и статистика, 1986. - Т.1 - 366 с. - Т.2 - 351 с.
5. Гильямирова Ф.Н., Радомская В.М., Баишева Г.М., Кретьова И.Г. Традиционный анализ крови: новые экологические индуцированные тенденции // Клинич. лаб. диагностика. - 1999. - N10. - С.27.
6. Кожевников А.Д., Пархоменко Т.В., Чуприна Л.В. Обнаружение модифицированных форм сывороточного альбумина у больных гломерулонефритом с помощью спектрофлуориметрии // Тер. арх. - 1994. - N6. - С.26-29.
7. Кожевников А.Д., Сазонец Г.И. Связывание мочевины с белками сыворотки крови в норме, при хронической почечной недостаточности и при нефротическом синдроме // Тер. арх. - 1984. - N7. - С.44-47.
8. 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.
9. Поллад Дж. Справочник по вычислительным методам статистики / Пер. с англ. - М.: Финансы и статистика, 1982. - 344с.
10. Прохоров М.Ю., Тиунов М.Г., Шакалис Д.А. Простой колориметрический микрометод определения свободных жирных кислот // Лаб. дело. - 1977. - N9. - С.535-536.
11. Румянцев А.Ш. Особенности обмена белков у больных с хроническим гломерулонефритом // Нефрология. - 2001. - Т.5, N1. - С.7-18.
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. Альбумин, транспорт насыщенных жирных кислот и метаболический стресс-синдром (обзор литературы) // Клинич. лаб. диагностика. - 1999. - N4. - С.3-11.
15. Троицкий Г.В., Багдасарьян С.Н. Новый тип микрогетерогенности альбумина плазмы крови // Бюл. эксперим. биологии и медицины. - 1973. - N8. - С.48-50.
16. Троицкий Г.В., Багдасарьян С.Н. Гетерогенность альбумина плазмы крови при некоторых патологиях // Вопр. мед. химии. - 1974. - N2. - С.121-126.
17. Троицкий Г.В., Шараева Т.К., Апишный Г.Ю., Мамин В.В. Тиол-дисульфидный обмен как механизм образования минорных фракций альбумина с рI 5,2-7,4 при патологиях // Украинский биохимический журнал. - 1986. - Т.58, N5. - С.12-22.
18. Тугушева Ф.А., Зубина И.М., Куликова А.И. и др. Использование флуориметрического метода определения общей и эффективной концентрации альбумина в сыворотке крови больных с заболеваниями почек // Нефрология. - 1998. - Т.2, N4. - С.37-42.
19. Урбах В.Ю. Статистический анализ в биологических и медицинских исследованиях. - М.: Медицина, 1975. - 295 с.
20. Kopple J.D. Pathophysiology of protein-energy wasting in chronic renal failure // J. Nutr. - 1999. - Vol. 129, Suppl. 1S. - P. 247S-251S.
21. 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.
22. Sedlak J., Lindsay R.H. Estimation of total, protein-bound and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent // Anal. Biochemistry. - 1968. - Vol. 25, N1-3. - P.192-205.
23. Takabayashi K., Imada T., Saito Y., Inada Y. Coupling between fatty acid binding and sulfhydryl oxidation in bovine serum albumin // Europ. J. Biochem. - 1983. - Vol.136. - P.291-295.

Поступила в редакцию 17.11.2001 г.