

© И.М.Зубина, Ф.А.Тугушева, А.И.Куликова, 2002  
УДК 616.611-002-036.12:547.962:547.963

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

## УЧАСТИЕ СУЛЬФИДРИЛЬНЫХ ГРУПП АЛЬБУМИНА СЫВОРОТКИ КРОВИ БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТОМ В ПОДДЕРЖАНИИ НАТИВНОЙ КОНФОРМАЦИИ БЕЛКА

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

## THE ROLE OF SULFHIDRIL GROUPS OF SERUM ALBUMIN IN BLOOD OF PATIENTS WITH CHRONIC GLOMERULONEPHRITIS IN THE MAINTENANCE OF NATIVE CONFORMATION OF PROTEIN

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

### РЕФЕРАТ

По количеству восстановленных сульфидрильных групп (SH-grp.) в альбумине (АЛБ) и по величине молярного соотношения SH-grp./АЛБ можно косвенно судить о конформации глобулы АЛБ и об образовании ковалентных связей с различными лигандами через тиоловую группу. Задачей настоящей работы было определение содержания АЛБ и SH-grp. в сыворотке и во фракции частично очищенного с помощью высаливания сульфатом аммония (40% насыщения) АЛБ крови 36 доноров и 65 больных хроническим глюмерулонефритом (ХГН): 9 пациентов в стадии ремиссии, 20 больных с обострением ХГН в виде нефротического синдрома (НС), 16 человек в стадии хронической почечной недостаточности (ХПН) и 20 пациентов, леченых с помощью хронического бикарбонатного гемодиализа (ГД). У больных в стадии ремиссии (как и у доноров) величина SH-grp./АЛБ и в сыворотке, и во фракции частично очищенного АЛБ была близка к 1,0, что говорит о сохранении нативной конформации молекулы. На фоне НС соотношение SH-grp./АЛБ в сыворотке, и особенно во фракции после высаливания, достоверно выше величины 1,0. Это указывает на нарушение пространственной организации молекулы за счет восстановления дисульфидных связей, но при этом сохраняется хорошая растворимость АЛБ в солевом растворе. Достоверное снижение величины SH-grp./АЛБ у больных с ХПН свидетельствует или об окислительной модификации SH-grp., или о связывании с помощью тиоловой группы эндогенных лигандов, накапливающихся в сосудистом русле за счет снижения функции почек. Самые низкие значения величины SH-grp./АЛБ отмечены у больных на ГД. Модификация SH-grp., однако, не отражается на растворимости АЛБ в соли. Таким образом, выявлен один из возможных механизмов модификации нативной конформации АЛБ у больных с ХГН, лежащий в основе нарушения физико-химических свойств АЛБ. На разных этапах развития заболевания имеются разнокаправленные нарушения тиол-дисульфидного баланса,участвующего в поддержании нативной структуры белка.

**Ключевые слова:** хронический глюмерулонефрит, альбумин, восстановленные тиолы, конформация белковой молекулы.

### ABSTRACT

The number of reduced sulphhydryl groups (SHGs) in albumin (ALB) and the level of the molar ratio SHGs/ALB can indirectly characterize the conformation of the ALB globule and the formation of covalent bonds between SHGs and various ligands. The aim of the study was to determine the contents of ALB and SHGs in serum and soluble fraction of partially purified ALB obtained by the procedure of salting-out globulins with the help of the ammonium sulfate solution (the saturation degree 40%) in case of 36 healthy subjects and 65 patients with chronic glomerulonephritis (CGN): 9 patients with acute attack of CGN, 20 - with nephrotic syndrome (NS), 16 - with chronic renal insufficiency (CRI) and 20 patients treated with chronic bicarbonate hemodialysis (HD). In patients with acute attack of the disease (like in healthy subjects) the SHGs/ALB ratio is equal to 1.0 both in serum and in partially purified ALB suggesting the preservation of its conformation. In patients with NS the SHGs/ALB ratio is statistically reliably higher than 1.0 indicating that there are disorders in the conformation of the ALB molecule due to the reduction of sulphhydryl groups, but this does not influence the solubility of ALB in salt. The value of SHGs/ALB ratio decreases in patients with CRI suggesting that endogenous ligands accumulated in blood are bound to SHGs. It can also happen because of the oxidative modification of SHGs. The lowest values of the SHGs/ALB ratio are found in HD patients but in this case the modification of SHGs fails to influence the solubility of ALB in salt. Thus, we have revealed one of possible mechanisms of modification of native conformation of ALB in patients with CGN. It causes impairment of physical and chemical properties of ALB. In different stages of the disease there are different disturbances of thiol-disulfide balance responsible for the maintenance of the native conformation of the protein structure.

**Key words:** chronic glomerulonephritis, albumin, reduced sulphhydryl groups, conformation of the protein molecule.

### ВВЕДЕНИЕ

Молекула альбумина (АЛБ), самого распространенного в природе простого белка и наиболее изученного белка плазмы крови человека

[19], состоит из единственной полипептидной цепи, включающей 585 аминокислотных остатков, а молекулярная масса альбумина, рассчитанная по аминокислотному составу, составляет

66439 Да [20]. Около 50 – 67% полипептидной цепи уложены в  $\alpha$ -спирали [1]. Некоторые аминокислотные остатки, например, пролин, не могут образовывать водородных связей. Ход  $\alpha$ -спирали около таких остатков нарушается [2]. В неспирализованных участках полипептидная цепь изгибаются. Третичная структура молекулы обеспечивается гидрофобными взаимодействиями, кроме того, существенный вклад в поддержание нативной конформации вносят 17 дисульфидных связей, которые образуются между 34 из 35 остатков цистеина. Одна восстановленная сульфогидрильная группа цистеина-34 (SH-группа) остается в свободном состоянии и именно это отличает АЛБ от других белков плазмы крови и сообщает ему многие уникальные, в том числе антиоксидантные, свойства [24]. Эта восстановленная тиоловая группа участвует в тиол-дисульфидном обмене, образуя дисульфиды с такими веществами, как цистеин, гомоцистеин, глутатион и др. Показано, что АЛБ может также образовывать межмолекулярный дисульфид, т.е. димер из двух молекул АЛБ, соединенных дисульфидной связью [29].

Альбумин – один из наиболее хорошо растворимых белков плазмы, что объясняется большим количеством способных к ионизации групп на поверхности его молекулы [7, 17]. Этот белок выполняет в организме разнообразные функции: 1. Молекула АЛБ имеет выраженную гидрофильность, благодаря чему играет важную роль в поддержании онкотического давления крови. Благодаря способности хорошо связывать воду и удерживать ее в сосудистом русле АЛБ играет главную роль в поддержании объема кровотока [5]. 2. АЛБ, обладая амфотерными свойствами, играет превалирующую роль в поддержании pH крови по сравнению с другими белками [9]. 3. АЛБ является основным белковым резервом организма, его распад обеспечивает возможность синтеза глобулинов и структурных белков тканей и органов [14]. 4. Уникальная способность сывороточного АЛБ связывать обширный круг органических и неорганических лигандов определяет его транспортную функцию. В результате взаимодействия с разнообразными лигандами молекула АЛБ претерпевает изменения (конформационные или изменения заряда), которые зависят от химических свойств связываемых веществ и характера образующихся связей. При этом происходят изменения физико-химических свойств как белка, так и самих лигандов. 5. Наконец, АЛБ, являясь тиолсодержащим белком, проявляет

нейтрализующее действие по отношению к свободным радикалам [24]. Восстановленные тиолы обладают высокой антиокислительной активностью, они имеют как антирадикальные, так и антиперекисные свойства и способны защищать от повреждения ферменты и нуклеиновые кислоты, липиды и другие биологически активные соединения [13]. Белки плазмы крови могут инактивировать активные формы кислорода, а также связывать ионы переменной валентности, инициирующие образование активных форм кислорода [21], осуществляя, таким образом, защиту на уровне эритроцитов, предотвращая их гемолиз в результате активации перекисного окисления липидов [4]. Мощный антиокислительный потенциал проявляют АЛБ, иммуноглобулины, церулоплазмин, фракции  $\alpha_2$ - и  $\beta$ -глобулинов [23]. При этом основная роль в антиокислительной активности плазмы крови принадлежит АЛБ [18].

Если восстановленная тиоловая группа цистеина-34 свободна, то молярное соотношение SH-группы/АЛБ приближается к единице. Таким образом, по количеству SH-групп в расчете на молекулу АЛБ можно косвенно судить о конформации его глобулы и об образовании ковалентных связей с различными лигандами через тиоловую группу.

В данных литературы имеются лишь отдельные факты, характеризующие уровень восстановленных тиоловых групп АЛБ на фоне патологии. Так, для АЛБ сыворотки крови больных с нарушениями функции щитовидной железы, а также больных с нефротическим синдромом (НС) показано появление в крови его форм со сниженным электрическим зарядом [12, 22]. Предполагается, что такие формы АЛБ образуют димерные формы с потерей нативной конформации [27]. Кроме того, тиол-дисульфидный обмен служит механизмом образования минорных фракций АЛБ с изоэлектрической точкой при pH 5,1-7,4 [15].

В нашем предыдущем исследовании [6] мы показали, что у пациентов с хроническим гломерулонефритом (ХГН) отмечается снижение растворимости АЛБ в солевых растворах, что свидетельствует о частичном нарушении нативной конформации и об изменении суммарного поверхностного заряда молекулы АЛБ. Однако оставались невыясненными конкретные химические механизмы, лежащие в основе нарушения физико-химических свойств АЛБ.

Целью настоящей работы было определение содержания восстановленных тиолов в цельной

Таблица 1

**Распределение больных по морфологическим диагнозам**

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

Примечание: ГН - гломерулонефрит.

плазме, а также во фракции частично очищенного с помощью высаливания альбумина плазмы крови доноров и больных хроническим гломерулонефритом.

**ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ**

Обследована сыворотка крови 36 практически здоровых лиц и 65 пациентов с ХГН, находившихся на лечении в 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. 45 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 не-

фрологическое 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).

По клинико-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 [11]. В табл. 2 представлены основные данные клинико-морфологического обследования пациентов, получавших консервативную терапию.

Материалом исследования являлась сыворотка крови, взятой у доноров и больных людей из локтевой вены утром натощак. У больных, получающих лечение хроническим ГД, кровь получали из артерио-венозной fistулы при подключении к диализному аппарату. Кровь забирали в сухие стеклянные пробирки, выдерживали 40 минут при комнатной температуре для формирования сгустка, затем сыворотку отделяли путем центрифугирования в течение 15 минут при 2000 об./мин. Исследования проводили в день взятия крови.

Для осаждения глобулинов к сыворотке крови добавляли насыщенный раствор сульфата аммония, чтобы создать конечную концентрацию 17,2%, что со-

Таблица 2

**Клинико-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
Мезангийо-пролиферативный ГН	2	4	-	6
Мембранозно-пролиферативный ГН	-	5	-	5
Мембранный 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.

отвечает 40%-ному насыщению раствора. С этой целью к 3 мл сыворотки крови при перемешивании добавляли 2 мл охлажденного насыщенного раствора сульфата аммония (рН 6,1). Для более полного осаждения глобулинов смесь выдерживали 40 минут при темпе-

ратуре 8 °C, затем центрифугировали 40 минут при 8000 об./мин.

Супернатант очищали от соли 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.

Как в цельной плазме, так и во фракции частично очищенного с помощью высаливания АЛБ определяли содержание АЛБ и восстановленных тиолов.

**Концентрацию АЛБ** определяли унифицированным методом по реакции с бромкрезоловым зеленым [8] с помощью наборов НПФ «Абрис+». Метод основан на образовании цветного комплекса красителя 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».

**Восстановленные сульфидрильные группы (SH-группы)** определяли в классической реакции Эллмана [28]. В щелочной среде (рН 8,0) реагент Эллмана, 5,5'-дитиобис-(2-нитробензойная кислота), реагирует с сульфидрильными группами белка с образованием аниона 5-тио-2-нитробензойной кислоты, имеющего

желтую окраску с максимумом поглощения при длине волны 412 нм. Интенсивность окрашивания пропорциональна количеству тиоловых групп. Для построения калибровочного графика использовали восстановленный глутатион производства фирмы «Serva».

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием общепринятых методов параметрической и непараметрической статистики [10, 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

Абсолютное содержание SH-групп и АЛБ в сыворотке крови и фракции после высаливания, а также молярное соотношение между количеством SH-групп и АЛБ (SH-группы/АЛБ) представлены в табл. 3.

Содержание SH-групп в сыворотке крови доноров ( $0,616 \pm 0,012$  ммоль/л) было достоверно выше, чем в больных всех обследованных групп.

Таблица 3

### Молярное содержание общих сульфидрильных групп (SH-групп), альбумина и их молярное соотношение в сыворотке крови и во фракции после высаливания ( $\bar{X} \pm m$ ; в скобках указано число обследованных лиц)

Обследованные лица	Сыворотка крови			Фракция после высаливания		
	Альбумин, ммоль/л	SH-группы, ммоль/л	SH-grp./АЛБ	Альбумин, ммоль/л	SH-группы, ммоль/л	SH-grp./АЛБ
Доноры	0,569±0,011 (24)	0,616±0,012 (24)	1,09±0,08 (24)	0,452±0,016 (24)	0,430±0,011 (24)	0,97±0,02 (24)
Больные в фазе ремиссии	0,504±0,012 <sup>a</sup> (9)	0,481±0,028 <sup>a</sup> (9)	0,96±0,06 <sup>a</sup> (9)	0,345±0,008 <sup>a</sup> (8)	0,369±0,030 <sup>a</sup> (8)	1,07±0,08 (8)
Больные с НС	0,303±0,020 <sup>a,b</sup> (22)	0,316±0,020 <sup>a,b</sup> (22)	1,14±0,10 (22)	0,185±0,017 <sup>a,b</sup> (20)	0,267±0,016 <sup>a,b</sup> (20)	1,65±0,16 <sup>a,b</sup> (20)
Больные с ХПН	0,548±0,028 <sup>c</sup> (16)	0,489±0,024 <sup>a,c</sup> (16)	0,90±0,04 <sup>a,c</sup> (16)	0,359±0,021 <sup>a,c</sup> (16)	0,393±0,028 <sup>c</sup> (16)	1,14±0,09 <sup>a,c</sup> (16)
Больные, леченные ГД	0,543±0,009 <sup>a,b,c</sup> (20)	0,409±0,015 <sup>a,b,c,d</sup> (20)	0,76±0,04 <sup>a,b,c,d</sup> (20)	0,394±0,012 <sup>a,b,c</sup> (20)	0,326±0,012 <sup>a,b,c,d</sup> (20)	0,84±0,03 <sup>a,b,c,d</sup> (20)

Примечания: НС – нефротический синдром, ХПН – хроническая почечная недостаточность, ГД – гемодиализ, АЛБ – альбумин, SH-группы – общие восстановленные сульфидрильные группы. Данные статистически достоверно отличаются от данных: а – доноров, b – больных в фазе ремиссии, c – больных с НС, d – больных с ХПН.

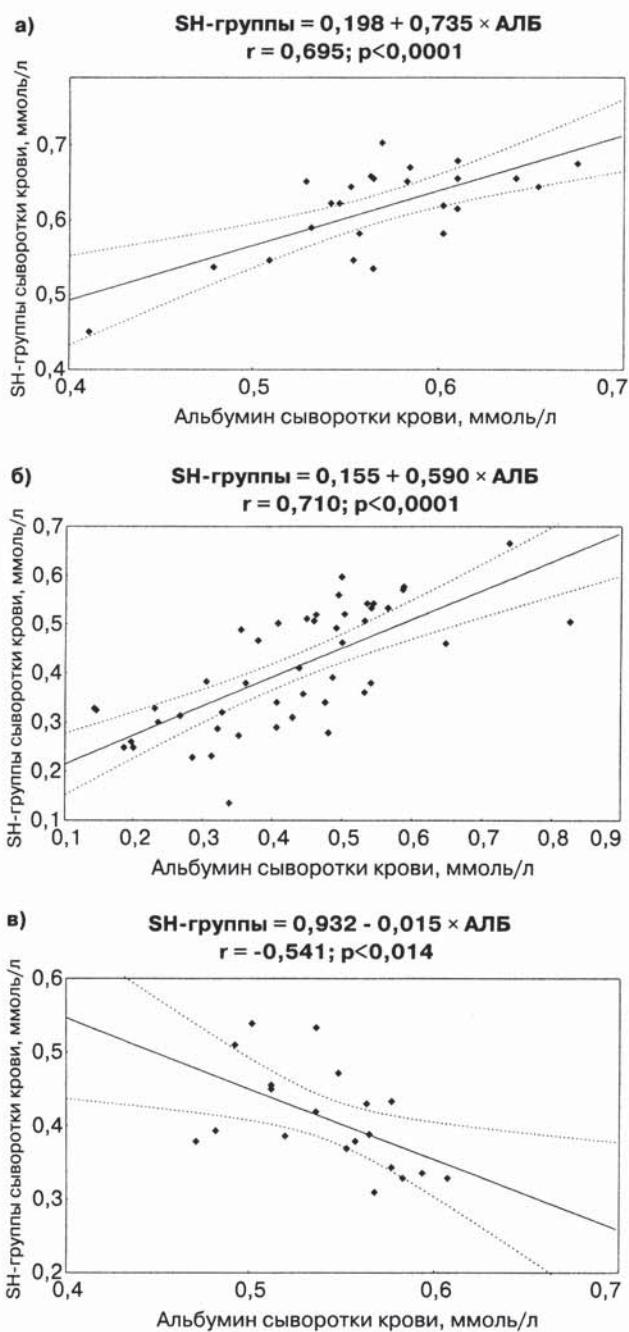


Рис. 1. Взаимосвязь между содержанием альбумина (АЛБ) и уровнем восстановленных тиолов (SH-групп) в сыворотке крови доноров (а), больных, получавших консервативное лечение (б), и больных, получавших лечение гемодиализом (в).

Самый низкий уровень –  $0,316 \pm 0,020$  ммоль/л – наблюдался у больных с НС ( $p<0,0001$ ). У пациентов в фазе ремиссии заболевания содержание SH-групп составляло  $0,481 \pm 0,028$  ммоль/л, у больных в стадии ХПН –  $0,489 \pm 0,024$  ммоль/л ( $p<0,0001$  в обоих случаях).

Поскольку АЛБ – основной белок сыворотки, имеющий свободную SH-группу, можно предположить, что низкий уровень SH-групп у больных с НС связан с низким содержанием АЛБ. Это подтверждается выяв-

лением высокодостоверной корреляции между уровнем АЛБ и SH-групп, обнаруженной в группах доноров и больных, получавших консервативную терапию (рис. 1а и рис. 1б).

Среди всех обследованных пациентов выделяется группа больных, леченных с помощью ГД. Содержание SH-групп в сыворотке крови этой группы больных составляло  $0,409 \pm 0,015$  ммоль/л. Между содержанием АЛБ и SH-групп также обнаружена высокодостоверная, но отрицательная корреляционная связь:  $r = -0,54$ ,  $p=0,014$ ,  $n=20$  (рис. 1в).

Содержание SH-групп во фракции после высаливания снижалось пропорционально уменьшению содержания АЛБ и составляло у доноров  $0,430 \pm 0,011$  ммоль/л, у больных в стадии ремиссии –  $0,369 \pm 0,030$  ммоль/л, у больных с НС –  $0,267 \pm 0,016$  ммоль/л, у больных с ХПН –  $0,393 \pm 0,028$  ммоль/л и у пациентов, леченных с помощью ГД, –  $0,326 \pm 0,012$  ммоль/л.

Корреляционные связи между уровнями АЛБ и SH-групп во фракции после высаливания сохранялись в группах доноров и больных, получавших консервативное лечение (рис. 2). В группе пациентов, леченных с помощью

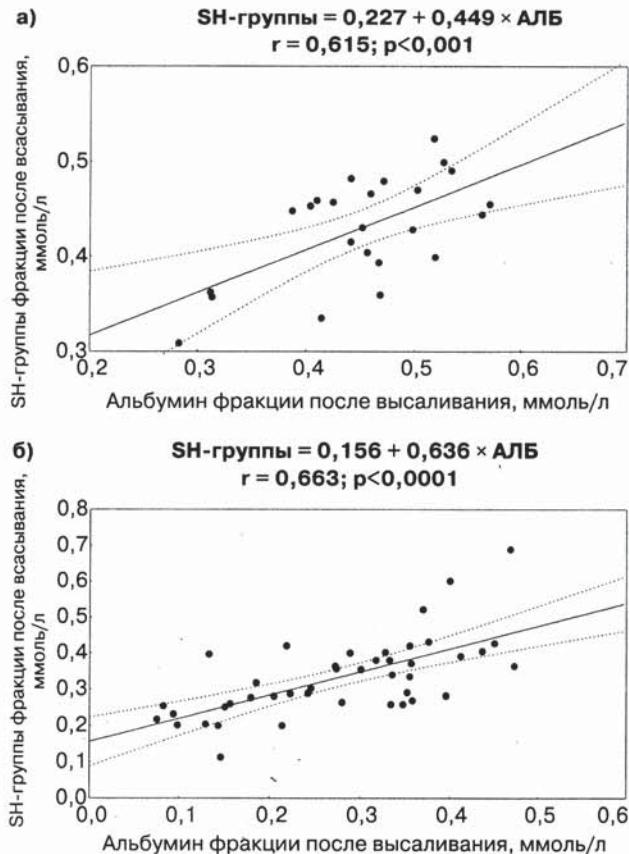


Рис. 2. Взаимосвязь между содержанием альбумина (АЛБ) и уровнем восстановленных тиолов (SH-группы) во фракции частично очищенного альбумина доноров (а) и больных, получавших консервативное лечение (б).

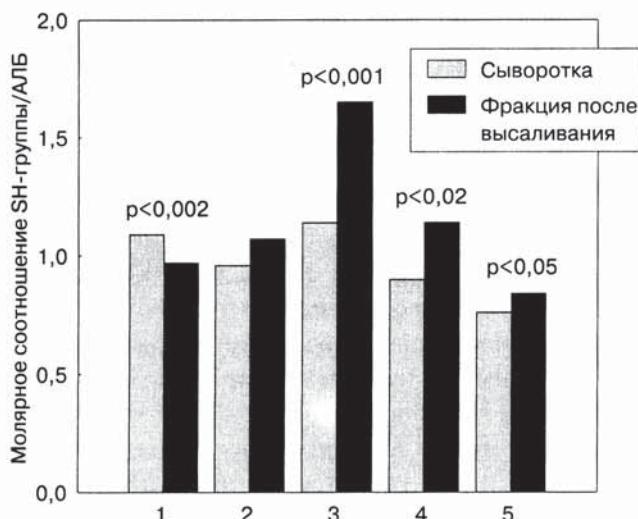


Рис. 3. Относительное содержание тиоловых групп (молярное отношение SH-группы/АЛБ) в сыворотке крови и фракции после высаливания: 1 – доноров ( $n=24$ ), 2 – больных в фазе ремиссии ( $n=8$ ), 3 – больных с нефротическим синдромом ( $n=20$ ), 4 – больных в стадии нарушения функции почек ( $n=16$ ), 5 – больных, получавших лечение гемодиализом ( $n=20$ ). Указаны достоверности отличий показателя сыворотки от показателя фракции частично очищенного альбумина.

хронического ГД, во фракции после высаливания корреляции не были обнаружены.

На рис.3 представлены соотношения SH-группы/АЛБ в сыворотке крови и во фракции после высаливания.

У доноров это соотношение достоверно снизилось после процедуры высаливания ( $p<0,002$ ), но и в сыворотке крови, и во фракции частично очищенного АЛБ величина SH-группы/АЛБ была близка к единице, что может свидетельствовать о сохранении нативной конформации АЛБ в ходе процедуры выделения.

Во всех остальных обследованных группах соотношение SH-группы/АЛБ повышалось в ходе процедуры высаливания, хотя и не во всех группах достоверно. Величина молярного отношения SH-группы/АЛБ в сыворотке крови и во фракции частично очищенного АЛБ пациентов с ХГН в фазе ремиссии, как и у доноров, была близка к единице. У больных с НС соотношение SH-группы/АЛБ было выше единицы и в сыворотке крови ( $1,14 \pm 0,10$ ), и особенно во фракции после высаливания ( $1,65 \pm 0,16$ ). Такое существенное и достоверное ( $p<0,001$ ) повышение молярного отношения SH-группы/АЛБ во фракции частично очищенного альбумина больных с НС может свидетельствовать о частичном нарушении нативной конформации за счет восстановления дисульфидных связей в молекуле, однако это не снизило растворимость АЛБ в солевом растворе.

У больных с ХПН количество SH-групп в расчете на АЛБ в сыворотке крови было достоверно меньше, чем у доноров –  $0,90 \pm 0,04$  ( $p<0,01$ ), а после выделения АЛБ с помощью высаливания значение данного соотношения достоверно увеличивалось, достигая величины  $1,14 \pm 0,09$  ( $p<0,02$ ).

Самые низкие значения соотношения SH-группы/АЛБ обнаружены у больных, леченных ГД. В сыворотке крови этот показатель составлял величину  $0,76 \pm 0,04$ , а во фракции после высаливания –  $0,84 \pm 0,03$  ( $p<0,05$ ).

Низкое соотношение SH-группы/АЛБ в сыворотке крови больных с ХПН и пациентов, леченных с помощью ГД, можно, по-видимому, объяснить тем, что молекула АЛБ ковалентно через SH-группу связывает некие лиганды, в том числе так называемые уремические токсины, образуя смешанные дисульфиды [25]. Поскольку во фракции, полученной после высаливания, соотношение SH-группы/АЛБ увеличивается, можно предположить, что при выделении АЛБ в осадок вместе с глобулинами выпадает та часть АЛБ, которая связана с лигандами. В на-досадочной жидкости остается АЛБ, сохранивший свободную SH-группу.

Таким образом полученные результаты подтверждают, что количество SH-групп и особенно молярное соотношение SH-группы/АЛБ косвенно свидетельствуют о состоянии конформации молекулы АЛБ и о наличии лигандов, которые могут образовывать ковалентные связи с сульфидрильной группой молекулы АЛБ.

## ОБСУЖДЕНИЕ

В нашей предыдущей работе мы привели данные о значительном снижении растворимости АЛБ в растворе сульфата аммония [6]. Растворимость в солевых растворах, как уже указывалось, зависит от гидрофильности белка и величины его поверхностного заряда. 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 могут происходить, например, 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 уже при pH 6,1. Измене-

ние поверхностного заряда может происходить 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.

Количество SH-групп в расчете на моль АЛБ является косвенной характеристикой нативности конформации. В нативном АЛБ дисульфидные связи стабилизируют конформацию, в том числе и  $\alpha$ -спирали. Изменение в расположении дисульфидных связей приводит к деспирализации в отдельных частях молекулы. К веществам, активирующими тиол-дисульфидный обмен АЛБ, относятся альдегиды (глюкоза и другие сахара), фосфолипиды. Тиол-дисульфидный обмен лежит в основе способности АЛБ отвечать на различные воздействия *in vitro* и *in vivo* обратимым конформационным переходом. Следствиями такого перехода являются появление АЛБ с более щелочными рН, деспирализация, измененное лигандирование. Это неспецифичные реакции – они наблюдаются в норме и более резко выражены при патологии.

Полученные нами данные показали, что содержание АЛБ в 36 образцах сывороток доноров составляет  $0,569 \pm 0,011$  ммоль/л, и это соответствует концентрации  $38,3 \pm 0,6$  г/л. Этот уровень находится ближе к нижней границе нормы (35–45 г/л), что не противоречит современным представлениям, так как в регионах с повышенным техногенным напряжением отмечается тенденция к гипопротеинемии, причем типичной является диспротеинемия за счет снижения содержания АЛБ [3].

Корреляционная связь между содержанием АЛБ и уровнем SH-групп ( $\tau=0,404$ ;  $Z=2,77$ ;  $n=24$ ;  $p<0,0056$ ) подтверждает предположение о том, что SH-группы сыворотки крови принадлежат преимущественно АЛБ. Молярное отношение SH-группы/АЛБ в сыворотке крови доноров и во фракции после высаливания близко к единице, хотя и достоверно снизилось во фракции частично очищенного АЛБ. Следовательно, в норме процедура выделения АЛБ с помощью высаливания сульфатом аммония не оказывает влияния на тиол-дисульфидный баланс в молекуле белка. В растворе остается АЛБ, чья пространственная организация соответствует конформации нативного АЛБ.

У больных в фазе ремиссии заболевания уровень АЛБ в сыворотке крови несколько ниже,

чем у доноров –  $0,504 \pm 0,012$  ммоль/л ( $33,46 \pm 1,84$  г/л) (см. табл. 3). Пропорционально ниже и уровень SH-групп (см. табл. 3). Именно поэтому молярное отношение SH-группы/АЛБ и в сыворотке крови, и во фракции частично очищенного АЛБ, так же как у доноров, близко к единице. Следовательно, благоприятный с клинической точки зрения вариант течения заболевания не отражается ни на концентрации АЛБ в плазме крови, ни на пространственной организации его молекулы.

В сыворотке крови больных с ХГН, осложненным НС, наблюдается самый низкий уровень АЛБ –  $0,303 \pm 0,020$  ммоль/л ( $20,09 \pm 1,30$  г/л). Молярное отношение SH-группы/АЛБ и в сыворотке крови, и особенно во фракции частично очищенного АЛБ выше единицы ( $1,14 \pm 0,10$  и  $1,65 \pm 0,16$ , соответственно). Эти данные показывают, что у больных с НС имеются явные нарушения конформации белковой молекулы, связанные с восстановлением дисульфидных связей. Наличие прямой связи между содержанием SH-групп в сыворотке крови и долей выделенного при высаливании АЛБ ( $\tau=0,438$ ;  $Z=2,70$ ;  $n=20$ ;  $p<0,007$ ) указывает на то, что модифицированный за счет восстановления дисульфидных связей АЛБ более устойчив в солевых растворах.

Содержание АЛБ в сыворотке крови больных с ХГН в стадии нарушения функции почек практически не отличается от данных доноров и составляет  $0,548 \pm 0,028$  ммоль/л ( $36,38 \pm 1,84$  г/л). Молярное отношение SH-группы/АЛБ в сыворотке крови несколько ниже единицы. Причиной этого уменьшения может быть связывание с помощью тиоловой группы неких эндогенных лигандов, в том числе токсинов, накапливающихся в кровяном русле в результате нарушения выделительной функции почек. Кроме того, данный эффект может быть результатом проявления альбумином его антиокислительной активности. Величина отношения SH-группы/АЛБ повышается во фракции после высаливания. У больных с ХПН, так же как и у пациентов других групп, наименьшей устойчивостью в солевом растворе обладает АЛБ с более низким содержанием сульфидрильных групп по сравнению с нативным белком. Кроме упомянутых выше окисленных форм АЛБ и белка, «отдавшего» свою тиоловую группу на связывание лигандов, это могут быть и димерные формы АЛБ.

Отмеченные нами нарушения свойств АЛБ плазмы крови больных с ХПН еще более усили-

ваются в группе больных с терминальной уремией, получавших лечение регулярным гемодиализом. И в сыворотке крови, и во фракции частично очищенного АЛБ этих больных обнаружено самое низкое соотношение SH-группы/АЛБ. Кроме того, имеется отрицательная корреляция между содержанием АЛБ и уровнем SH-групп. Механизмы модификации сульфидильных групп, вероятно, такие же как и у больных с ХПН, получающих консервативное лечение. Однако, как показали наши предыдущие исследования [6], АЛБ больных на гемодиализе практически не отличается от АЛБ доноров по своей растворимости в солевом растворе. Следовательно, несмотря на окисление SH-групп и/или связывания с лигандами [25, 26], АЛБ сохраняет свои физико-химические свойства, что явно имеет компенсаторно-припособительную природу и является специфическим свойством этого белка у больных на гемодиализе.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, настоящее исследование позволило выявить один из возможных механизмов модификации нативной конформации молекулы АЛБ у больных ХГН, который, вероятно, лежит в основе нарушений физико-химических свойств АЛБ, проявляющихся снижением растворимости АЛБ плазмы в растворе сульфата аммония. Показано, что на разных этапах развития заболевания имеются разнонаправленные нарушения тиол-дисульфидного баланса, обеспечивающего поддержание нативной структуры белка.

## БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- 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.
- Волькенштейн М.В. Биофизика. – М.: Наука, 1981. – 575 с.
- Гильямирова Ф.Н., Радомская В.М., Баишева Г.М., Кретова И.Г. Традиционный анализ крови: новые экологически индуцированные тенденции // Клинич. лаб. диагностика. – 1999. – N10. – С.27.
- Говорова Н.Ю., Шаронов Б.П., Лызлова С.Н. Окислительное повреждение эритроцитов миелопероксидазой. Защитное действие сывороточных белков // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 1989. – N4. – С.428-430.
- Жербин Е.А., Чухловин А.Б. Река жизни. – М.: Знание, 1990. – 223с.
- Зубина И.М., Куликова А.И., Тугушева Ф.А. Особенности растворимости сывороточного альбумина больных хроническим гломерулонефритом при его выделении путем высаливания с сульфатом аммония // Нефрология. – 2002. – T.6, N. – С. 46-53.
- Кухта В.К., Олецкий Э.И., Стохаров А.Н. Белки плазмы крови (патохимия и клиническое значение). – Минск: Беларусь, 1986.
- Лабораторные методы исследования в клинике: справочник // Меньшиков В.В., Делекторская Л.Н., Золотницкая Р.П. и др. // Ред. В.В. Меньшикова. – М.: Медицина, 1987. – 368 с.
- Михайлов В.Г. Тайны крови. – М., 1982. – 174 с.
- Поллад Дж. Справочник по вычислительным методам статистики // Пер. с англ. – М.: Финансы и статистика, 1982. – 344с.
- Рябов С.И. Современные представления о хронической почечной недостаточности // Лечение хронической почечной недостаточности /Ред. С.И.Рябова – СПб., 1997. – Гл.1. – С.11-26.
- 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.
- Соколовский В.В. Тиол-дисульфидное соотношение крови как показатель состояния неспецифической резистентности организма: Учебное пособие. – СПб, 1996. – 30 с.
- Судаков К.В. Основы физиологии функциональных систем. – М.: Медицина, 1983. – 272с.
- Троицкий Г.В., Шараева Т.К., Апишный Г.Ю., Мамин В.В. Тиол-дисульфидный обмен как механизм образования минорных фракций альбумина с р<sub>1</sub> 5,2-7,4 при патологиях // Украинский биохимический журнал. – 1986. – Т.58, N5. – С. 12-22.
- Урбах В.Ю. Статистический анализ в биологических и медицинских исследованиях. – М.: Медицина, 1975. – 295 с.
- Чегер С.И. Транспортная функция сывороточного альбумина. – Бухарест: Изд-во Академии Соц. республики Румынии, 1975. – 183 с.
- Шаронов Б.П., Говорова Н.Ю., Лызлова С.Н. Антиокислительные свойства и деградация белков сыворотки активными формами кислорода ( $O_2, OCl^-$ ), генерируемыми стимулированными нейтрофилами // Биохимия. – 1988. – Т.53, N5. – С.816-825.
- Plasma proteins /Ed. B.Bloombach, L.A.Hanson. – New-York: John Wiley & Sons, Ltd., 1979. – 393 p.
- Brown J.R. Serum albumin: amino acid sequence //Albumin structure, function and uses / Ed. V.Rosenoer et al. – Oxford, 1977. – P.27-52.
- Descamps-Latscha B., Khoa Th.N., Witko-Sarsat V. et al. Oxidative stress and cardiovascular disease in end-stage renal failure//Cardiovascular disease in endstage renal failure/ Ed. J. Loscalzo, G.M. London – New York: Oxford University Press, 2000.- P.245-271.
- Ghiggeri G.M., Candiano G., Ginevri F. et al. Renal selective properties towards endogenous albumin in minimal change nephropathy // Kidney Int. – 1987. – Vol.32, N1. – P.69-77.
- Griffin S.V., Lockwood C.M. Anti-myeloperoxidase (MPO) antibodies interfere with the inhibition of MPO by caeruloplasmin: potential for renal injury in vasculitis // Congress of the EDTA – ERA, XXXIV-th: Abstracts failure // Cardiovascular disease in end-stage renal failure / Ed. J. Loscalzo, G.M. London. – New York: Oxford University Press, 2000. – P.245-271.
- Iglesias J., Levine J.S. Albuminuria and renal injury – beware of proteins bearing gifts // Nephrol. Dial. Transplant. – 2001. – Vol.16. – P.215-218.
- Mabuchi N. Major albumin associated fluorescent substance in uremic serum // Nephron. – 1988. – Vol.48, - N4. – P.328-329.
- 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.
- Rapier H., McMenamy J., Dintzis H.M., Watson F. Cyanogen bromide fragments of human serum albumin // J. Biol. Chem. – 1971. – Vol.246, N15. – P.4744-4750.
- Sedlak J., Lindsay R.H. Estimation of total, protein-bound and nonprotein sulphhydryl groups in tissue with Ellman's reagent // Analyt. Biochem.- 1968.- Vol. 25, N1-3. - P.192-205.
- Wallevik K. In vivo structure and stability of serum albumin // Acta Physiol. Scänd. – 1979. – Vol.107, Suppl.471. – P.7-56.

Поступила в редакцию 19.02.2002 г.