

© М.М.Альдебель, Н.В.Кириллова, 2002
УДК 616.611-002-036.12.001.5:547.96-001

М.М. Альдебель, Н.В. Кириллова

ОКИСЛИТЕЛЬНОЕ ПОВРЕЖДЕНИЕ БЕЛКОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТЕ

M.M. Aldebel, N.V. Kirillova

OXIDATIVE LESION OF PROTEINS IN EXPERIMENTAL GLOMERULONEPHRITIS

Кафедра биохимии Санкт-Петербургской государственной химико-фармацевтической академии, Россия

РЕФЕРАТ

Целью данной работы было исследование интенсивности окислительной модификации белков ткани почек и плазмы крови крыс в норме и при гломерулонефрите. Установлено достоверное увеличение уровня карбонильных групп и степени окисления триптофановых и битирозиновых остатков в белках плазмы крови и почек опытных животных по сравнению с контрольными. Состояние антиоксидантной защитной системы оценивали по уровню активности каталазы и супероксиддисмутазы (СОД). Показано, что при гломерулонефрите уровень активности каталазы был достоверно снижен, а активность СОД возрастала в крови и почках больных по сравнению с контрольными животными.

Ключевые слова: гломерулонефрит, окислительная модификация белков, антиоксидантная защитная система, каталаза, супероксиддисмутаза.

ABSTRACT

The aim of the work was to study the role of protein oxidation in blood and kidneys of rats with glomerulonephritis and in the controls. Protein carbonyl content and production of dityrosine and oxidation of tryptophane were found to significantly increase in glomerulonephritis as compared to the controls. The state of the oxidation system was assessed by the level of catalase and superoxide dismutase activity. It was shown that catalase activity was reliably decreased, the activity of superoxide dismutase being increased in the kidneys and blood of rats with glomerulonephritis.

Key words: glomerulonephritis, protein oxidation, antioxidation system, catalase, superoxide dismutase.

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что одним из ведущих звеньев патогенеза хронического гломерулонефрита являются мембрано-деструктивные процессы в почечной ткани [5,6], возникновение которых, по-видимому, может быть обусловлено, в частности, и нарушением функциональной активности антиоксидантной защитной системы (АОЗ) организма и избыточным образованием свободных кислородных радикалов. В связи с этим большое внимание исследователей в последние годы привлечено к изучению роли активных форм кислорода в процессах окислительной модификации белков [2].

Целью данной работы была оценка степени окислительной модификации белков в почках и крови крыс в норме и при гломерулонефрите и состояние каталазы и супероксиддисмутазы (СОД) – основных ферментов АОЗ.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Работу проводили на беспородных белых крысах-самцах массой тела 140-160 г из питом-

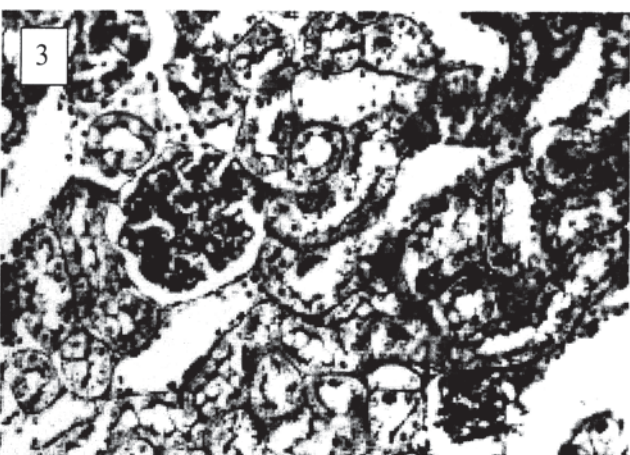
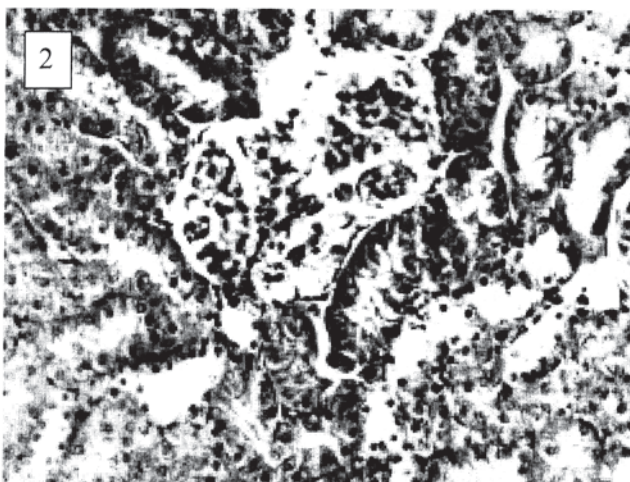
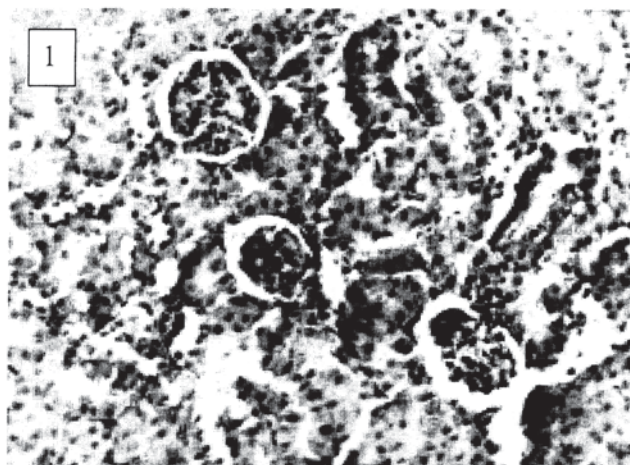
ника РАН «Рапполово». Животные содержались в условиях вивария на стандартном рационе [4]. Все исследования проводили на цельной крови, гемолизированных эритроцитах, сыворотке крови и постмитохондриальном супернатанте почек, предварительно отмытых от крови в охлажденном 0,9% растворе хлорида натрия. Экспериментальную модель гломерулонефрита (нефрит Хейманна) вызывали у лабораторных животных внутримышечным введением гомогената почек здоровых крыс в полном адьюванте Фрейнда [1]. Развитие заболевания у животных контролировали гистологически. Активность СОД определяли по скорости аутоокисления кверцетина в аэробных условиях [5,9]. Определение активности каталазы проводили по методике [8]. Оценку степени окислительных повреждений белков почек и плазмы крови проводили по уровню карбонильных производных [3, 12], для чего ткань почек предварительно освобождали от нуклеиновых кислот [12]. Об интенсивности окислительной модификации белков судили также по степени окисления ти-

розиновых и триптофановых остатков [11,14]. Полученные данные были обработаны статистически. Определение достоверности сравниваемых средних величин производили по критерию Стьюдента. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для доказательства развития гломерулонефрита через 3 недели после внутримышечного введения животным гомогената почек здоровых крыс в полном адьюванте Фрейнда были проведены морфологические исследования почек опытной группы животных. Как видно из представленных данных (см. фото), у опытной группы животных был обнаружен двухсторонний диффузный гломерулонефрит. Наличие деформации петель капилляров, пролиферация мезангия, а также мембранозные изменения свидетельствовали о хронизации процесса. По характеру и распространению клубочковые изменения соответствовали морфологическим проявлениям мезангио-пролиферативного и/или мембранозного гломерулонефрита.

Анализ полученных данных по окислительной деструкции белков при гломерулонефрите показал, что уровень карбонильных групп – основных маркеров окислительной модификации белков – в белках плазмы крови больных животных был в 1,9 раз выше по сравнению с контрольными крысами. В то же время содержание карбонильных групп в белках почек опытных крыс было достоверно увеличено на 66% по сравнению с контрольными значениями (табл. 1). Известно, что не только содержание карбонильных компонентов отражает состояние окислительной дегградации белков. Окислению за счет атаки активными формами кислорода подвергаются аминокислотные остатки, в частности тирозина и триптофана [7]. Окислительная модификация тирозиновых остатков сопряжена с образованием битирозина, который обладает характерной голубой флуоресценцией. В то же время окисление триптофановых остатков сопровождается снижением флуоресценции, характерной для нативного триптофана. Определение степени окисления триптофановых и битирозиновых остатков показало интенсивное образование битирозиновых остатков и увеличение степени окисления триптофана в белках плазмы крови и почек опытных животных по сравнению с контрольными (см. табл.1). Так, через 24 часа инкубации контрольных и опытных проб степень



Микрофото. Морфологическое исследование почек при экспериментальной модели хронического гломерулонефрита (окраска гематоксилин-эозином, ув. 330).

1 - Контрольная группа. Типовая, нормальная морфология паренхимы почек.

2 - Опытная группа. Очаговая пролиферация мезангиальных клеток, сращение петель капилляров с их деформацией.

3 - Опытная группа. Деформация петлевых капилляров, утолщение базальных мембран, гиалиново-капельная дистрофия эпителия извитых канальцев.

образования битирозиновых сшивков увеличилась в 1,8 раза, а степень окисления триптофана увеличивалась примерно на 20% в сыворотке и почках животных при гломерулонефрите.

Таблица 1

Окислительная модификация белков сыворотки крови и почек крыс при гломерулонефрите ($\bar{X} \pm m$, n=15)

Индексы	Сыворотка крови			Почки		
Содержание карбонильных групп, нмоль / мг белка						
Контроль Опыт	12,00±0,55			5,9±0,34		
	23,00±0,91*			9,8±0,43*		
Время инкубации проб, час						
	1	2	24	1	2	24
Окисление тирозина (по содержанию битирозина, %)						
Контроль	87,9±2,3	166,7±3,1	407,0±6,2	117,4±1,1	169,8±3,8	217,4±5,4
Опыт	109,7±1,2	200,0±5,3*	745,5±7,8*	250,0±5,3	327,5±6,4*	393,2±6,9*
Окисление триптофана (по степени снижения флуоресценции, %)						
Контроль	37,6±0,8	29,8±0,7	19,3±0,6	39,5±2,2	31,8±2,1	16,8±0,6
Опыт	36,0±1,1	28,7±0,9	15,0±0,9*	29,5±3,5*	20,5±1,9*	13,4±0,4*

Примечание: * -p<0,05

Степень окислительной деструкции белков в организме зависит, как известно, от состояния ферментативной антиоксидантной защитной системы. Поэтому в данной работе параллельно с оценкой уровня окислительной модификации белков изучали состояние каталазы и СОД. Было установлено, что при гломерулонефрите уровень активности каталазы эритроцитов и почек крыс был достоверно снижен (в 1,8 – 2,2 раза) по сравнению с контрольными животными. В свою очередь, активность СОД достоверно возрастала (в 1,3 раза) в почках и имела тенденцию к увеличению (на 5%) в крови больных крыс по сравнению с контрольными животными (табл. 2).

Таким образом, результаты наших исследований свидетельствуют о глубоких нарушениях белкового обмена при хроническом гломерулонефрите. Важно отметить, что повышение окислительной деструкции белков сопровождается резким падением активности

каталазы на фоне повышения уровня каталитической активности СОД, что, в свою очередь, является показателем развития окислительного стресса [2,7,9], сопровождающегося дополнительной генерацией активных форм кислорода.

ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что степень окисления биомолекул в тканях напрямую зависит от содержания активных метаболитов кислорода в клетках и биологических жидкостях организма. Активные радикалы кислорода легко взаимодействуют с различными биомолекулами, поэтому они способны нарушать их структуру и функции, что может приводить к развитию окислительного стресса в клетках и, как следствие, вызывать множественные первичные нарушения в живых системах. Например, окисление сульфгидрильных групп и остатков триптофана в молекулах белков и ферментов, приводящее к их инактивации, нарушение структуры ДНК, повреждение

углеводов, индукция перекисного окисления липидов и др. [7]. Исследования последних лет показали, что при всех патологических процессах, которые сопровождаются воспалительными реакциями, главную роль в повреждении клеток и тканей организма играют активные формы кислорода. Кроме того, установлена непосредственная связь между процессами окислительной модификации белков и многими заболеваниями

Таблица 2

Активность СОД и каталазы в крови и почках крыс при гломерулонефрите ($\bar{X} \pm m$, n=30)

Индексы	Активность СОД	
	Почки, усл. ед. СОД / г ткани	Кровь, усл. ед. СОД / мл
Контроль	1022,80±65,3	1768,70±124,0
Опыт	1328,88±72,95**	1861,84±16,26
	Активность каталазы	
	Почки, ммоль / мин · г ткани	Эритроциты крови, ммоль / мл эр.
Контроль	783,10±63,4	3934,1±485,6
Опыт	436,60±20,63*	1775,4±56,34*

человека [10, 13]. В данной работе было показано, что развитие хронического гломерулонефрита сопровождается развитием окислительного стресса, при этом обнаруживается сильное окислительное повреждение белков. В свою очередь окисление белков может приводить к их агрегации или фрагментации [3,7]. Такие окисленные белки, как известно, служат субстратом для протеолитических ферментов и таким образом способствуют дальнейшему усилению деструктивных процессов в очаге воспаления.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование липидов, как основных объектов для атаки свободных кислородных радикалов, при целом ряде патологических процессов долгое время занимало лидирующее положение. В то же время окислительное повреждение белков, как правило, сопровождается необратимыми повреждениями тканей, поэтому данный процесс, по-видимому, играет не менее значительную роль в патогенезе целого ряда заболеваний, в том числе и при гломерулонефрите и требует дальнейшего всестороннего изучения.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Альбини Б. Аутологичные антигены // Иммунопатология почки. – М.: Медицина, 1983. – С. 116-259.
2. Дубинина Е.Е., Шугалей И.В. Окислительная модификация белков // Успехи совр. биологии. 1993. – Т.113, вып.1. – С. 71-81.
3. Дубинина Е.Е., Бурмистров С.О., Ходов Д.А., Повотов И.Е. Окислительная модификация белков плазмы крови человека. Метод выделения // Вопр. мед. химии. – 1995. – Т.41, – С. 24-26.
4. Западнюк И.П., Западнюк В.И., Захария У.А. Западнюк Б.В. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте // – Киев.: Вища школа, 1983. – 383 с.
5. Смирнова Н.Н., Сергеева К.М., Маслова М.Н., Флеров М.А. Взаимосвязь структурно-функционального состояния биомембран с парциальными функциями почек при гломерулонефрите у детей и подростков // Нефрология. – 1998. – Т.2, №1. – С.47-52.
6. Тугушева Ф.А., Куликова А.И., Зубина И.М. Особенности перекисного окисления липидов крови больных хроническим гломерулонефритом в стадии нарушения функции почек на фоне нефротического синдрома // Вопр. мед химии. – 1993. – Т.39, вып.2. – С.18-21.
7. Янковский О.Ю. Кооперативные взаимодействия миелопероксидазы лейкоцитов и опсонинов плазмы крови в системах антимикробной и антиоксидантной защиты // Автореф. дисс. ... докт. биол. наук. СПб. – 1997. – 33 с.
8. Butler E. Red cell metabolism // New York-London. – 1975. – 198 p.
9. Dubinina E.E., Babenko G.A., Scherbak I.G. Molecular heterogeneity of plasma superoxide dismutase // Free Rad. Biol. Med. – 1992. – Vol. 13, № 1. – P.1-7.
10. Halliwell B. Free radicals, antioxidants and human disease: curiosity, cause or consequence // Lancet. – 1994. – Vol. 344. – P. 721-724.
11. Huggins T.G., Wells-Knecht M.C., Detorje N.A. et al. Formation of o-tyrosine and dityrosine in proteins radiolysis and metal-catalyzed oxidation // J.Biol.Chem. – 1993. – Vol.268. – P.12341-12347.
12. Leski M.L., Bao F., Wu L. et al. Protein and DNA oxidation in spinal injury: neurofilaments – an oxidation target // Free Radical Biology. – 2001. – Vol.30, №6. – P.613-624.
13. Stadtman E.R. Role of oxidized amino acids in proteins: mechanism and biological consequences // Method enzymol. – 1995. – Vol. 258. – P. 379-393.
14. Ushisima Y., Nakano M., Goto T. Production and identification of dityrosine in horseradish peroxidase-H₂O₂-tyrosine system // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1984. – Vol.125, N3. – P.916-918.

Поступила в редакцию 14.03.2002 г.