© А.Д.Кожевников, 1997
УДК 616.15:616.61-092

*Памяти профессора В.М.Дильмана*

*А.Д. Кожевников*

# РОЛЬ МОДИФИЦИРОВАННОГО СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА В ПАТОГЕНЕЗЕ НЕФРОПАТИЙ: НЕКОТОРЫЕ ФАКТЫ И ГИПОТЕЗЫ

# THE ROLE OF MODIFIED SERUM ALBUMIN IN PATHOGENESIS OF RENAL DISEASES: SOME FACTS AND HYPOTHESES

Кафедра пропедевтики внутренних болезней Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П.Павлова, Россия

**Ключевые слова:** заболевания почек, метаболические механизмы, модифицированный человеческий сывороточный альбумин.

**Key words:** renal diseases, metabolic mechanisms, modified human serum albumin.

Трудно со всей определенностью отнести данную публикацию к разряду лекции, оригинальной статьи или гипотезы, так как некоторые полученные автором факты новы, а некоторые из них достаточно неожиданны и лишь сравнительно недавно опубликованы. Сегодня мы попытаемся суммировать и объединить ранее разрозненные сообщения по теме, разрабатываемой нами около 10 лет.

В 1984 г. [5] мы впервые сообщили, что универсальный белок-переносчик — сывороточный альбумин (А) — в очень больших количествах присутствует в сыворотке крови больных с хронической почечной недостаточностью (ХПН) и с нефротическим синдромом (НС) в денатурированном (точнее, в модифицированном) состоянии. Сопоставление полученных клинических данных со сведениями, почерпнутыми из фундаментальной литературы по биохимии и биофизике по данному вопросу [1, 8, 10], позволило нам сформулировать и обосновать несколько принципиально важных соображений, непредвзятое осмысление которых дает возможность несколько иначе взглянуть на некоторые патофизиологические механизмы гломерулонефрита (ГН).

Установлено, что сывороточный А легко вступает во взаимодействие с таким относительно инертным или даже «вредным», в привычном для клинициста понимании, веществом, как мочевина. Мочевина представляет собой слабый катион. Характер ее связи с белком относится к разряду преимущественно электростатических взаимодействий. В норме одна молекула мочевины соединяется с концевой COOH-группой полипептида А, т. е. взаимодействие идет в соотношении 1 моль А на 1 моль мочевины [7].

Первичная структура белка, т. е. последовательность аминокислот в молекуле, наиболее устойчива. Вторичная и третичная структуры, определяющие α-спирализацию молекулы и дальнейшее формирование глобулы, что и обеспечивает возможность молекулы осуществлять свои физиологические функции в полном объеме, напротив, очень лабильны. Они обладают необычайно высокой скоростью изменения своей пространственной организации [10]. Деспирализация (модификация) белка представляет для него опасность в плане поддержания своей целостности, так как в данном случае на молекулах «обнажаются» дополнительные реакционноспособные участки. Возможное повреждающее воздействие самых разнообразных физико-химических факторов (лиганды, протеолитические ферменты, ионизирующая радиация, ультрафиолетовое облучение и т.д.) будет направлено именно на эти уязвимые места. Нам чрезвычайно импонирует мысль некоторых исследователей [8, 13] о том, что мочевина, соединяясь с этими обнаженными участками молекулы, защищает белок. Следовательно, на молекулярном уровне она выполняет отнюдь не инертную, а чрезвычайно важную в физиологическом смысле функцию обеспечения самоподдержания структурной целостности молекулы А. Так обстоит дело, если мочевина присутствует в крови человека в физиологических или близких к ним концентрациях.

Не менее интересно, что мочевина всегда присутствует в крови, лимфе, интерстициаль-

ной и цереброспинальной жидкости (может быть, именно для реализации приписываемых мочевине функций?) не только у млекопитающих, но и у других видов живых существ, вплоть до, насколько нам известно, рептилий, амфибий, хрящевых рыб и других живых существ, стоящих на самых низких ступенях эволюции. Укажем также на общеизвестный факт, что мочевина синтезируется именно в тех органах, в частности — в печени, где образуется и А, и другие одноцепочечные белки. Наконец, минимально допустимая концентрация мочевины в биологических жидкостях организма, возможно, — такой же жестко регулируемый параметр, как минимальный уровень глюкозы, на поддержание которого направлено действие практически всех гормонов, кроме инсулина и некоторых простагландинов.

Немного отклоняясь от последовательности изложения, позволим себе, в интересах дела, кратчайший экскурс в область эволюционной «протофизиологии». Согласно расчетам математиков, самопроизвольное зарождение сложных полипептидов, по теории вероятности, практически невозможно. Однако с помощью физико-химических экспериментов доказано, что мочевина может (и могла — в так называемом опаринском бульоне) возникнуть абиогенно, т. е. из «элементарных» (неорганических) веществ [8]. Далее ее роль оказалась настолько важной, что именно благодаря ее протективным свойствам сформировались вначале «протопротеины», а затем и «основа жизни» — сложные многоцепочечные белки.

Увеличение концентрации мочевины в крови, намного превышающее ее физиологические уровни, напротив, ведет к деспирализации белка, далее — к его денатурации, а при достижении концентрации мочевины (в опытах in vitro до 8 ммоль/л) — к необратимой денатурации и к потере белком всех его физиологических свойств [14].

Повышенный уровень мочевины в крови больных с ХПН, вне зависимости от причины, вызвавшей последнюю, ведет к утрате нормальных (а по логике вещей — и транспортных) свойств А. Таким образом, кроме того, что уровень альбумина в крови больных с ХПН снижен (недостаток питания, уменьшенная кишечная абсорбция, гиперкатаболизм), — даже оставшийся у них альбумин неполноценен. Тогда, по определению, он не способен в необходимой мере выполнять свою транспортную функцию в отношении энергетическтх субстратов, гормонов и лекарственных средств. Подобную ситуацию мы предложили обозначить термином «неэффективный метаболизм» [5]. Поясним его смысл: содержание энергетических субстратов и гуморальных регуляторов в крови больных достаточно или избыточно, однако они не могут эффективно доставляться в ткани-мишени из-за «пареза» транспортной системы, представленной, в частности, сывороточным А. Клиническим отражением этого феномена является удивительно точная характеристика больных с ХПН, обозначенная акад. Е.М.Тареевым, хотя и в несколько ином смысле, как «vita minor».

Серьезный материал для размышления представили нам данные обследования больных с НС без нарушения суммарной функции почек (точнее — с нормальным уровнем мочевины и креатинина в сыворотке крови). Степень связывания мочевины с А, в пересчете на одну молекулу последнего, оказалась у них едва ли не такой же, как у больных с тяжелой ХПН [5]. Объяснить это явление иначе нежели признанием наличия первично аномальных свойств сывороточного А у пациентов с НС мы не смогли.

В своих более ранних работах мы пытались обратить внимание на удивительное сходство метаболических нарушений у больных с ХПН и с НС без нарушения азотовыделительной функции почек [11]. Именно здесь уместно упомянуть об этом, иначе будет труднее понять интерпретацию результатов наших последующих наблюдений.

Кратко резюмируя рассуждения, представленные выше, можно высказать пока еще робкое предположение: на первый взгляд, возможность значительного повышения аффинитета мочевины к сывороточному А в условиях патологии (в том числе при ХПН и НС) — явление вроде бы отрицательное. Однако, может быть, благодаря именно этому обстоятельству сывороточный А на самом низком — молекулярном — уровне организации жизни в той или иной мере «сумел» уцелеть как молекула.

Следующий этап нашей работы был основан на методе исследования собственной флюоресценции сывороточного А здоровых доноров, больных ГН с НС и с ХПН [6]. Методологическая сторона вопроса тщательно описана в упомянутой статье, и ее подробное изложение не соответствует задачам данной публикации.

Важнейшим результатом этого этапа исследований мы считаем обнаруженную нами исключительно высокую корреляцию ($r = 0{,}885$; $p < 0{,}005$) между степенью качественных (конформационных) изменений сывороточного А и величиной суточной протеинурии. Такая высокая взаимосвязь данных показателей заставляет думать не просто о наличии прямой корреляции, но об их *функциональной* связи. Иначе говоря, при наличии протеинурии клубочково-

го происхождения с мочой теряется преимущественно (если не исключительно!) изначально денатурированный (модифицированный) белок, т. е. лишенный свойственного ему в норме отрицательного электростатического заряда. За сведениями о характере взаимодействия сывороточных белков и базальной мембраны при ГН, обладающей в норме также отрицательным электростатическим зарядом, и о современных взглядах на механизмы клубочковой протеинурии отсылаем читателя к почти исчерпывающему обзору В.Я.Плоткина [10].

Осмелимся именно здесь поставить вопрос, касающийся природы и происхождения ГН (а может быть, и других нефропатий): действительно ли первопричиной заболевания является исключительно поражение нефрона (гломерулярного фильтра)? Точно так же давно уже стало привычным считать, что весь комплекс сложнейших метаболических нарушений в организме нефрологического больного развивается вторично. Верно ли это? Сравнительно редким исключением являются работы, посвященные выявлению самостоятельной роли некоторых метаболических факторов (а может быть, первичных обменных нарушений), способных влиять на развитие и прогрессирование ХПН и НС.

Следующий этап нашей работы преследовал цель подтвердить правомочность высказанной выше гипотезы с помощью еще одного метода. Для этого была предпринята попытка исследовать конформационные свойства сывороточного А у больных с ХПН и с НС (без нарушения азотовыделительной функции почек) с помощью флюоресцентного зонда [12].

Степень нарушений конформационных свойств сывороточного А у больных с ХПН и с НС оказалась очень выраженной и, в количественном отношении, соизмеримой. Так, в частности, у больных с НС, вне зависимости от морфологической формы гломерулонефрита (n = 28), у больных ГН с суточной протеинурией свыше 1 г/сут, у больных с ХПН с протеинурией свыше 1 г/сут, а также у успешно леченных больных с НС после достижения у них клинической ремиссии (срок наблюдения 3 мес) сопоставимые глубокие конформационные изменения А удалось регистрировать с высоким постоянством [12].

Из изложенного можно сделать предварительный осторожный вывод: несмотря на несомненное положительное влияние иммуномодуляторов, цитостатиков и глюкокортикоидов на состояние гломерулярного фильтра у больных ГН, свойства сывороточного А при этом практически не восстанавливаются.

Предлагаем принять к сведению результаты еще одного проведенного нами эксперимента: взаимодействие сывороток крови 4 больных с НС с углеродным сорбентом марки СКН-2М в течение 1 ч при комнатной температуре in vitro показало, что спектрофлюориметрические характеристики частично очищенного сывороточного А у всех больных приблизились к норме [6]. Эти данные уместно сопоставить, по нашему мнению, с положительным влиянием на течение ГН у некоторых больных, леченных углеродными сорбентами в клинических условиях.

Факт, ранее нами не публиковавшийся: у 4 больных с тяжелым нелеченным НС (у одного из них — амилоидоз почек, развившийся на почве Х-гистиоцитоза легких, подтвержденный гистологически; у остальных троих — мембранозно-пролиферативный ГН) на протяжении 10—12 сут ежедневно определяли суточную протеинурию, которая составила, с незначительными колебаниями, от 8 до 11 г. В лечебных целях за указанный период каждому из них производили двукратное переливание человеческого альбумина (100 мл 10% раствора). Один из растворов А вводили каждому больному внутривенно капельно per se. Достоверного, хотя и превышающего в среднем на 2—3 г/сут, увеличения протеинурии в последующие 2—3 дня не отмечалось. Этим же больным спустя несколько дней вводили препарат А той же серии и в той же дозе, предварительно облученный при длине волны 254 нм на аппарате «Изольда» в строгом соответствии с требованиями инструкции, касающихся условий и режима ультрафиолетового облучения цельной крови, со скоростью тока препарата А через кювету из увиолевого стекла (12±0,2) мл/мин (данный фрагмент работы выполнен совместно с М.А.Шабуниным в 1991 г.). В последующие сутки у всех 4 больных суточная протеинурия однократно возросла до 18—25 г, а в последующие дни продолжала персистировать на прежнем присущем каждому больному уровне ($P_{тмф} < 0,025$). Никаких других изменений в клиническом статусе, а также в самочувствии больных не произошло. Экзацербация течения болезни не отмечена. Приведенные данные, представляющие собой результат почти прямого опыта, показывают, что гломерулярный фильтр пропускает, скорее всего, только денатурированный белок. В нашем наблюдении — практически весь, введенный извне.

«Загруженный» мочевиной белок теряет свой отрицательный электростатический заряд. В простом опыте мы показали следующее: у 8 практически здоровых людей в возрасте от 19 до 24 лет традиционным методом определя-

ли СОЭ; у них же (при соблюдении всех необходимых методологических условий) СОЭ определяли повторно с добавлением в цитратный раствор, в соответствующем пересчете, мочевины (ЧДА) до ее конечной концентрации 30 ммоль/л. Величина СОЭ возрастала при этом у всех исследуемых в 3—5 раз ($p < 0,01$). Точка приложения влияния мочевины на величину СОЭ (на белки крови? на электростатический заряд ее форменных элементов?) нам, разумеется, с полной определенностью неизвестна. Об этом можно было бы и не говорить, если бы так настойчиво не говорили сами за себя факты, изложенные в начале статьи.

Справедливости ради, необходимо отметить, что модифицированные формы сывороточного А с практически неизменным постоянством встречаются в крови пациентов с самыми различными тяжелыми соматическими заболеваниями, например, при злокачественных новообразованиях, при различных формах ИБС и первичных (семейных) гиперлипопротеидемиях, при хронических гепатитах и циррозах печени (здесь можно напомнить о давно известной этиопатогенетической роли вируса гепатита В в генезе некоторых гломерулопатий), при гипотиреозе, сахарном диабете, шизофрении и т. д. [1, 2].

Основываясь на методике оценки степени деспирализации А по его способности образовывать комплексы с эндогенной мочевиной, нами было показано при обследовании 9 больных с ИБС и высокой гипертриглицеридемией (фенотип гиперлипопротеидемии IV типа), что число связанных с одной молекулой А молекул мочевины колебалось в пределах от 2 до 7 (данный фрагмент работы выполнен совместно с А.В.Смирновым, Г.И.Сазонец и Т.В.Ефремовой). Все 9 больных получали комбинированную терапию углеродным энтеросорбентом марки СКН-2М в дозе 40 г/сут плюс 150 мг метформина (препарат из группы бигуанидов) ежедневно (на протяжении от 1 до 4 мес). У всех обследованных отмечены достоверное снижение уровня триглицеридов в сыворотке крови ($p<0,05$) и одновременно уменьшение массы деспирализованного А ($p<0,05$). Уровень общего холестерина при этом достоверно не изменялся.

В связи с изложенным, мы предлагаем обратить внимание на следующее явление: все перечисленные выше нозологические формы болезней неизменно сопровождаются однонаправленными изменениями таких важнейших гомеостатических показателей, как уровень сывороточного А (сочетающийся, к тому же, как мы пытались это показать, с изменениями его функциональных свойств) и дислипопротеидемией. Можно сказать проще: число болезней неисчислимо, но их «метаболическое самовыражение» ограничено, на биохимическом уровне, однотипными проявлениями. Здесь просматривается аналогия с механизмами развития «неспецифического адаптационного синдрома» Г.Селье. Другой пример: глубокое, отнюдь не «философское», а именно эмпирическое обобщение единства природных явлений подобного рода на протяжении многих лет доказывалось и пропагандировалось одним из выдающихся ученых нашего времени В.М.Дильманом [4].

Изложенные в настоящей статье факты и клиническая интуиция автора не позволяют успокоиться на мысли, что в основе ГН лежит исключительно первичное поражение клубочковых структур. Отвергать иммунный механизм происхождения ГН и некоторых иных форм нефропатий, конечно же, немыслимо. Однако как объяснить новые факты, указывающие, возможно, на первичные изменения сывороточных белков при нефропатиях? Как убедить себя, что ГН не представляет собой своего рода «системное» заболевание и не есть поражение одного только органа — почки? В какой мере и в какой последовательности может быть вовлечена в патологический процесс печень? Может ли денатурированный (модифицированный) А сам по себе участвовать в повреждении не только канальцев, но и клубочковых структур?

Следующий этап работы, который позволил бы прояснить некоторые из поставленных вопросов, лежит за пределами возможностей клинициста.

В дефинитивной моче А, разумеется, денатурирован и, отчасти, пребывает там в виде крупных аггрегатов с относительной молекулярной массой свыше 88 000, так как концентрация мочевины в ней в десятки раз превышает сывороточный уровень этого природного протектора-денатуранта. В какой форме представлен альбумин (или анаальбумины) в провизорной моче? На этот вопрос сможет ответить только патофизиолог, владеющий высокой технологией микропункций. Если мы сумеем узнать это с помощью такого безусловно прямого опыта, то, возможно, некоторые звенья патогенеза ГН могут быть пересмотрены достаточно существенным образом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Альбумин сыворотки крови в клинической медицине / Ред. Ю.А.Грызунов, Г.В. Троицкий.— М.: ИРИУС, 1994.— 226 с.

2. *Багдасарьян С.Н., Троицкий Г.В.* Модификация сывороточных альбуминов в патологии // Докл. АН СССР.— 1980.— Т. 25, № 1.— С. 222 —224.

3. *Гершенович З.С., Кричевская А.А., Лукаш А.И.* Особенности комплексов мочевины с белками // Докл. АН СССР.— 1971.— Т. 201, № 4.— С. 986—987.

4. *Дильман В.М.* Четыре модели медицины.—Л.: Медицина, 1987.—286 с.

5. *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. — Т. 56, № 7.— С. 44—47.

6. *Кожевников А.Д., Пархоменко Т.В., Чуприна Я.В.* Обнаружение модифицированных форм сывороточного альбумина у больных гломерулонефритом с помощью спектрофлюориметрии // Тер. арх.— 1994.— Т. 66, № 6.— С. 26—29.

7. *Кричевская А.А., Лукаш А.И., Карташева Л.Ф.* Ассоциация мочевины с белками при ее низких концентрациях // Биохимия.— 1973.— Т. 38, № 4.— С. 700—706.

8. *Гершенович Э.С., Кричевская А.А., Лукаш А.И. и др.* // Мочевина в живых организмах. — Ростов н/Д, 1970.— 168 с.

9. *Плоткин В.Я.* Механизмы протеинурии при нефротическом синдроме // Нефротический синдром / Ред. С.И.Рябов.— СПб.: Гиппократ, 1992.— С. 56—73.

10. *Попов Е.М.* Естествознание и проблема белка. Химическое и пространственное строение белков. Структурная организация белков.— М.: Высшая школа, 1989.— 416 с.

11. *Рябов С.И., Кожевников А.Д.* Почки и обмен веществ.— Л.: Наука, 1980.— 168 с.

12. *Рябов С.И., Кожевников А.Д.* Исследование свойств сывороточного альбумина у больных гломерулонефритом с помощью флюоресцентного зонда //Диагностика и лечение нефропатий в стадии хронической почечной недостаточности/ Сб. материалов V конф. нефрологов Северо-Запада России.— СПб., 1997.— С. 73—74.

13. *Спектор И.М.* Влияние исходного состояния белка на направление и степень изменений под действием денатурированного агента// Биофизика.— 1996.— Т. 11, № 3.— С. 406—411.

14. *Gordon J.A., Warren J.R.* Denaturation of globular proteins. The interaction of urea and thiourea with bovine plasma albumin // J. Biol. Chem.— 1968.— Vol. 243, № 21.— P. 5663—5669.