

© З.В.Светлова, Н.Н.Смирнова, 2003
УДК [616.61-002.3-036-053.2:577.115+547.96]:543.872

З.В. Светлова, Н.Н. Смирнова

СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ И БЕЛКОВ У ДЕТЕЙ С ХРОНИЧЕСКИМ ПИЕЛОНЕФРИТОМ В ФАЗЕ РЕМИССИИ С СОХРАННОЙ ФУНКЦИЕЙ ПОЧЕК

Z.V.Svetlova, N.N.Smirnova

FREE-RADICAL OXIDATION OF LIPIDS AND PROTEINS IN CHILDREN WITH CHRONIC PYELONEPHRITIS IN REMISSION WITH PRESERVED RENAL FUNCTION

Кафедра педиатрии Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П.Павлова, Россия.

РЕФЕРАТ

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ – изучение процессов свободно-радикального окисления липидов и белков в плазме крови детей с хроническим пиелонефритом в стадии стойкой ремиссии при сохранной функции почек. **ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ.** Обследовано 19 пациентов школьного возраста и 18 здоровых детей в качестве контрольной группы. Изучены традиционные показатели перекисного окисления белков, а также спонтанное и Fe-стимулированное окисление белков плазмы крови. **РЕЗУЛЬТАТЫ.** Выявлены дефицит сульфгидрильных групп и снижение резервов окислительной модификации белков. **ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Показано, что даже при стойкой и длительной ремиссии пиелонефрита сохраняются дефекты антиоксидантной защиты.

Ключевые слова: дети, пиелонефрит, липиды, белки, свободно-радикальное окисление.

ABSTRACT

THE AIM of the work was to study plasma lipid and protein free-radical oxidation in children with chronic pyelonephritis at the stage of steadfast remission with preserved renal function. **PATIENTS AND METHODS.** 19 patients of school age and 18 healthy children were examined. Traditional indices of lipid peroxidation as well as spontaneous and Fe-stimulated protein oxidation in blood plasma were investigated. **RESULTS.** The deficiency of plasma thiol groups and reduced reserves of oxidative modification proteins were revealed. **CONCLUSION.** It has been shown that there exist antioxidative defense holes even in the steadfast and long-term remission of pyelonephritis in school age children.

Key words: children, pyelonephritis, lipids, proteins, free-radical oxidation.

ВВЕДЕНИЕ

Пиелонефрит – наиболее частая форма патологии органов мочевой системы. В детском возрасте инфекция мочевых путей делит 1-2-е места по частоте с поражением респираторного тракта [1]. Известно, что рецидивы пиелонефрита возникают через 5, 8 и более лет после первого эпизода. Между тем сроки активного диспансерного наблюдения нередко ограничиваются 3-5 годами клинико-лабораторной ремиссии, после чего констатируется выздоровление от пиелонефрита. Уточнение критериев «стойкой ремиссии» и тем более «выздоровление» нам представляется возможным при сопоставлении общепринятых клинико-лабораторных показателей и оценки состояния клеточных мембран. Считается, что синдром эндогенной интоксикации при остром пиелонефрите является пусковым механизмом процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и дисфункции иммунной системы [2]. Этот процесс имеет более выраженные последствия при наличии предше-

ствующей функциональной или морфологической нестабильности цитомембран тубулярного эпителия, нарушения оттока мочи при наличии рефлюксов. Эти факторы создают благоприятные условия для адгезии бактерий на поверхности эпителия слизистой оболочки мочевых путей, увеличения проницаемости мембран для токсинов, иммунных комплексов, конечных продуктов ПОЛ [3, 4]. В то же время, токсичные продукты ПОЛ, повреждая мембранные структуры, ухудшают процессы обмена, способствуют хронизации, переходу в более тяжелые формы. Однако большинство работ посвящено изучению нарушений свободно-радикального окисления (СРО) при патологии почек на поздних этапах заболевания – при явлениях вторичного сморщивания и почечной недостаточности [5, 6, 7].

Целью нашей работы было выявление нарушения баланса между про- и антиоксидантными системами у детей с хроническим пиелонефритом в фазе ремиссии с сохранной функцией почек.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Таблица 1

Показатели перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты у больных хроническим пиелонефритом и у здоровых детей ($\bar{X} \pm m$)

Показатель	Здоровые (n=17)	Больные хроническим пиелонефритом (n=19)	Отличие в % от здоровых детей
Общие липиды, г/л	4,14±0,20	4,85±0,23	117,50
Общий белок, мг/л	66,11±1,48	62,97±1,43	95,25
МДА, нмоль/л	8,27±0,34	11,31±0,64*	136,75
Токоферол, мкмоль/л	0,233±0,006	0,233±0,009	100,00
SH-группы, мкмоль/мл	0,468±0,011	0,425±0,019*	90,80
СОД-акт., у.е./мл	18,87±0,87	22,00±1,19*	116,59
СОД-акт., у.е./мг белка	0,28±0,01	0,35±0,02*	125,00
ЦП, ммоль/г/л	20,20±0,93	19,32±1,04*	95,64

Примечание: * отмечены значения показателей с $p < 0,05$ (критерий Стьюдента).

Таблица 2

Показатели окислительной модификации белков плазмы крови у больных хроническим пиелонефритом и у здоровых детей ($\bar{X} \pm m$)

Показатель, у.е./мг белка	Здоровые (n=17)	Больные хроническим пиелонефритом (n=19)	Отличие в % от здоровых детей
Спонтанное 270нм	0,062±0,009	0,097±0,012*	156,45
Fe-зависимое 270нм	0,201±0,014	0,144±0,023*	71,64
Спонтанное 363нм	0,174±0,008	0,130±0,011	109,19
Fe-зависимое 363нм	0,199±0,011	0,143±0,024*	71,86
Спонтанное 370нм	0,182±0,007	0,188±0,012	103,30
Fe-зависимое 370нм	0,196±0,013	0,152±0,022*	77,55

Примечание: * отмечены значения показателей с $p < 0,05$ (критерий Стьюдента).

Обследовано 19 детей в возрасте от 5 до 15 лет (средний возраст 11,4 года) с диагнозом «хронический пиелонефрит в фазе стойкой клинико-лабораторной ремиссии с сохранной функцией почек». Все дети обследованы и пролечены в специализированном нефро-урологическом отделении. Диагностический комплекс включал подробный анамнез, физикальное обследование, серию анализов мочи, бактериологические посевы, клинический и биохимический анализ крови, ультразвуковое исследование почек, цистографию, цистоскопию, экскреторную урографию и динамическую реносцинтиграфию.

Длительность заболевания составляла от 1 до 15 лет. У 15 детей пиелонефрит был вторичным и развивался на фоне пузырно-мочеточникового рефлюкса или поясничной дистопии, удвоения, ротации, увеличения подвижности одной или обеих почек, дисметаболической нефропатии, хронического цистита. У 4 пациентов не выявлено первичных изменений со стороны органов мочевой системы. Время, прошедшее с момента последнего обострения, составляло от 6 месяцев до 3 лет. На момент обследования не зафиксировано никаких воспалительных изменений со стороны других органов.

Контрольную группу составили 18 здоровых детей от 6 до 13 лет (средний возраст 10,4 года). Отбор производился по данным амбулаторной карты развития ребенка, объективному обследованию и результатам осмотров специалистами (отоларингологом, стоматологом, дерматологом и хирургом). Дети контрольной группы не имели хронических очагов инфекции и не переносили острых заболеваний минимум 6 месяцев до момента обследования.

Для изучения состояния системы ПОЛ использовались следующие методики. Определение содержания общих липидов плазмы крови проводилось по стандартным методикам с помощью набора реактивов фирмы «Синтакон». Определение концентрации малонового диальдегида в плазме крови в реакции с тиобарбитуровой кислотой по методу С.Г.Конюховой и соавт. [8]. Оценивали содержание малонового диальдегида в плазме крови, и в пересчете на количество общих липидов плазмы.

Определение концентрации токоферолов в плазме крови методом Н.К. Рудаковой-Жилиной с соавт. [9] в реакции с 2,2'-дипиридилем и хлорным железом. Определение содержания сульфгидрильных групп в плазме крови по методу, в основе которого лежит классическая реакция Элмана, предложенному В.В.Соколовским с соавт. [10]. Суммарная супероксиддисмутаза (СОД)-подобная активность белков плазмы крови определялась спектрофотометрическим методом, основанном на определении степени торможения реакции окисления кверцетина [11]. Определение содержания общего белка плазмы крови по методу Лоури [12]. Определение Fe-оксидазной активности церулоплазмينا по Ревину [13].

Для изучения процессов окислительной модификации белков под действием активных форм кислорода использовали методику, предложенную Е.Е.Дубининой и соавт. [14]. Принцип метода основан на реакции взаимодействия окисленных аминокислотных остатков белков с 2,4-динитрофенилгидразином с образованием альдегидных и кетонных производных 2,4-ди-

нитрофенилгидразона, регистрируемых при следующих длинах волн: 270нм, 363нм и 370нм. При введении в систему металла переменной валентности (Fe) происходит катализирование данной реакции и возрастает содержание образовавшихся 2,4-динитрофенилгидразонов. Разницу между спонтанным и Fe-стимулированным перекисным окислением белков расценивали как резерв антиоксидантной защиты организма.

Все вышеуказанные показатели изучали в плазме крови, полученной путем венопункции из локтевой вены натощак.

Результаты обработаны статистически с использованием критерия Стьюдента. Различия считали достоверным при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Как видно из табл. 1, в группе больных пиелонефритом уровень МДА в плазме крови достоверно выше такового у здоровых детей, что свидетельствует об усилении интенсивности ПОЛ. Анализ состояния антиоксидантной системы (АОС) показывает достоверное снижение содержания сульфгидрильных групп при нормальной концентрации токоферола в плазме. Величина СОД-подобной активности, как абсолютной, так и отнесенной на количество белка достоверно выше, чем у здоровых детей. Ферроксидазная активность церулоплазмينا у больных пиелонефритом мало отличается от нормальных значений.

В условиях оксидативного стресса свободно-радикальные продукты наряду с окислительной деструкцией липидов поражают и белковые структуры. Учитывая большую и очень разнообразную функциональную нагрузку белков в тканях, их окислительная модификация может носить в отличие от перекисидации липидов более избирательный и специфический характер при различных патологических состояниях [15]. Результаты определения уровня продуктов спонтанной и Fe-стимулированной окислительной модификации белков в плазме крови представлены в табл. 2. Уровень спонтанной модификации белков на 270нм у больных пиелонефритом достоверно превышает таковой у здоровых детей в среднем в 1,5 раза; на 363 и 370 нм увеличение не достоверно. В то же время уровень Fe-зависимой модификации белков на всех длинах волн при пиелонефрите в фазу ремиссии достоверно ниже, чем у здоровых детей, составляя в среднем 71,6-77,5% от нормы. Эти различия представлены на диаграммах (рис.1 и 2). У здоровых детей уровень продуктов металл-катализируемой ОМБ, регистрируемый во всех диапазонах длин волн, преобладает над уровнем спонтанной реак-

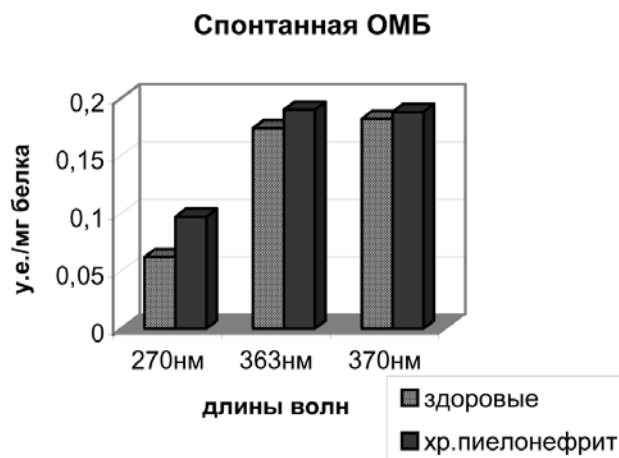


Рис.1. Соотношение уровня продуктов спонтанной окислительной модификации белков у здоровых детей и больных пиелонефритом.

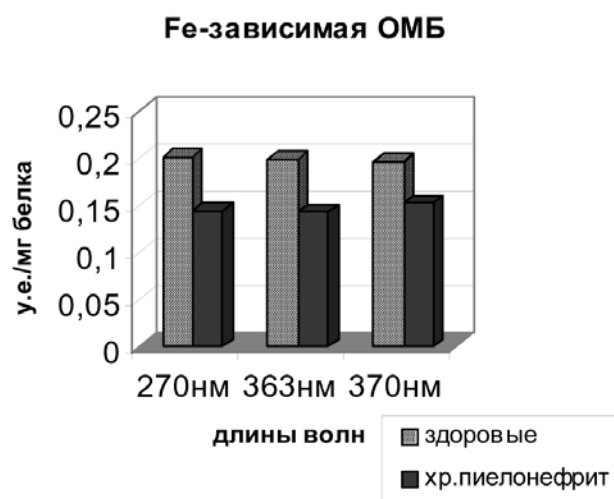


Рис.2. Соотношение уровня продуктов Fe-зависимой окислительной модификации белков у здоровых детей и больных пиелонефритом.

ции. У больных пиелонефритом показатели Fe-стимулированной ОМБ достоверно ниже, чем спонтанной во всем диапазоне определения. Таким образом, процессы ОМБ у больных детей исходно протекают на более высоком уровне, но резервы антиоксидантной защиты снижены.

ОБСУЖДЕНИЕ

У детей, больных пиелонефритом и находящихся в стадии стойкой и длительной клинико-лабораторной ремиссии, определяются существенные дефекты в системе антиоксидантной защиты. Повышенный уровень МДА свидетельствует об усилении процессов ПОЛ. Высокая СОД-подобная активность белков плазмы крови очевидно является компенсаторной реакцией и выполняет антиоксидантную функцию на первой – антикислородной ступени защиты. Антирадикальная ступень оценивалась по уровню токоферола и тиоловых групп. Примечательно, что в стадии ремиссии пиелонеф-

рита не отмечается снижения в плазме токоферола – одного из жирорастворимых антиоксидантов, встроенных непосредственно в липидный бислойный матрикс биомембраны. Вместе с тем отмечен достоверный дефицит тиоловых соединений, представляющих водорастворимый компонент антирадикальной защиты. Между тем хорошо известно, что в комплекс патогенетической и противорецидивирующей терапии пиелонефрита часто включаются препараты токоферола, но не источники тиоловых соединений.

Показатели окислительной модификации белков в плазме крови свидетельствуют о повышении уровня спонтанной модификации и его снижении при стимуляции ионами железа. Исходно повышенный уровень окислительной модификации белков означает нестабильность белковой матрицы клеточной мембраны и не может не отражаться на активности мембранных ферментов и на трансмембранном транспорте. Окисленные белки расщепляются протеолитическими ферментами более активно, чем нативные [16]. В норме накопление окисленных белков рассматривается как один из факторов регуляции синтеза и распада белков. Снижение резервов окислительной модификации белков, выявленное при металлостимуляции, – косвенное доказательство нарушения белкового обмена при пиелонефрите, сохраняющееся и в стадии полной клинико-лабораторной ремиссии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Общепринятые признаки клинико-лабораторной ремиссии пиелонефрита не являются доказательством полного выздоровления. Даже при стойкой и длительной ремиссии сохраняются дефекты антиоксидантной защиты, создающие предпосылки для нестабильности клеточных мембран. Наиболее значим для профилактики рецидивов воспаления органов мочевой системы – длительно сохраняющийся дефицит тиоловых соединений, восполнение которого должно быть включено в противорецидивные курсы при диспансерном наблюдении за детьми с хроническим пиелонефритом.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Неверов НИ, Козловская ЛВ, Карриева БИ. Свободно-радикальные процессы и перекисное окисление липидов при заболеваниях почек. *Тер Арх* 1992; 11:42-44
2. Baund L, Ardaillov R. Reactive oxygen species: production and role in the kidney. *Amer J Physiol* 1986; 251(5): 765-776
3. Голод ЕА, Даренков АФ, Кирпатовский ВИ, Яненко ЕК. Перекисное окисление липидов в ткани почек у больных с нефролитиазом и хроническим пиелонефритом. *Урол и Нефрол* 1995; 5:8-10
4. Жмуров ВА, Крылов ВИ, Иванова ЕЕ. и др. Содержание в крови и в моче продуктов перекисного окисления и ферментативная активность мочи при остром и хроническом гломерулонефрите у детей. *Урол и Нефрол* 1983; 4:56-60
5. Крылов ВИ, Петрушина АД, Морев ГВ. и др. Роль нарушений структуры клеточных мембран в формировании гормоно-резистентных вариантов заболеваний почек у детей. *Вопр Мед Хим* 1987; 4: 22-24
6. Багирова РД, Александрова НВ, Синяченко ОВ. и др. Исследование продуктов перекисного окисления и ренальных функций при нефрогенной гипертензии. *Врач Дело* 1993; 2-3: 81-85
7. Gwinner W, Grone HJ. Role of reactive oxygen species in glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant* 1999; 14(6): 1595-1598
8. Конохова СГ, Дубикайтис АЮ, Шабуневич ЛВ, Страшнов ВИ, Белоцерковский МВ. Роль активации перекисного окисления липидов в патогенезе экспериментального перитонита. *Бюл Эксперим Биол и Мед* 1989; 5: 557-559.
9. Рудакова-Жилина НК, Матюхова НП. Оценка антиоксидантной системы организма. *Лаб Дело* 1982; 1: 19-22.
10. Соколовский ВВ, Кузьмина ВС, Москадынова ГА, Петрова НН. Спектрофотометрическое определение тиолов в сыворотке крови. *Клин Лаб Диагн* 1997; 11: 20-21
11. Костюк ВА, Потапович АИ, Ковалева ЖВ. Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина. *Вопр Мед Хим* 1990; 2: 88-91.
12. Lowry OU, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
13. Ravin HA. An improved colorimetric enzymatic assay of ceruloplasmin. *J. Lab Clin Med* 1961; 58: 151-168.
14. Дубинина ЕЕ, Бурмистров СО, Ходов ДА, Пороотов ИГ. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод ее определения. *Вопр Мед Хим* 1995; 41(1): 24-26.
15. Дубинина ЕЕ. Активные формы кислорода и их роль в развитии оксидативного стресса. Фундаментальные и прикладные аспекты современной биохимии. Т. II – Труды Науч Конф посвящ 100-летию каф биох СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова 15-17 октября 1998г./ И.Г. Щербак (ред) СПб: Изд-во СПбГМУ; 1998: 386-389
16. Mc Cord JM, Fridovich J. The biology and pathology of oxygen radicals. *Ann Intern Med* 1978; 89: 122-127

Поступила в редакцию 8.01.2003 г.