

© Яремчук О. З.

УДК 612.015.11-02:616-005.6]-092.9

Яремчук О. З.

ПАТОБІОХІМІЧНІ МЕХАНІЗМИ УРАЖЕННЯ НИРОК ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ АНТИФОСФОЛІПІДНОМУ СИНДРОМІ ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет ім. І. Я. Горбачевського Міністерства охорони здоров'я України» (м. Тернопіль)

yaremchuk@tdmu.edu.ua

Дане дослідження виконано в рамках комплексної науково-дослідної роботи кафедри фармакології з клінічною фармакологією ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет ім. І. Я. Горбачевського МОЗ України» «Встановлення ефективності препаратів метаболічного типу дії та ентеросорбції при патологічних станах різної етіології» (№ державної реєстрації 0113U001246).

Вступ. Антифосфоліпідний синдром (АФС) – автоімунне захворювання, що характеризується наявністю в крові антитіл до негативно заряджених фосфоліпідів мембран та зв'язаних з ними глікопротеїнів (бета-2-глікопротеїну-1, анексину V, протромбіну). АФС супроводжується тромбозом судин різного розміру і локалізації, серцево-судинною патологією, інсультом, ускладненнями вагітності [15,16,18,19,5].

За даними досліджень останнього десятиліття, нирки є одним із основних органів-мішеней при всіх клінічних формах АФС (первинному, вторинному, катастрофічному). Частота ураження нирок становить 25-68% при первинному і вторинному АФС, також зростає кількість хворих з ознаками пошкодження мікроциркуляторного русла нирок при цій патології [8,16].

Відомо, що оксидативний стрес є важливим моментом патогенезу АФС, в тому числі при системному червоному вовчаку [18]. Також доведено, що оксидативний стрес при системному червоному вовчаку і виникаючій нирковій недостатності є показником високої активності процесу [20].

Активні форми кисню (АФК), які беруть участь у патогенезі АФС, мають виражений токсичний і прямий пошкоджуючий вплив [15]. Відомо, що у результаті окисно-відновних реакцій в організмі постійно проходить генерація активних форм кисню (АФК: O_2^- , OH^\cdot , RO_2^\cdot , OH_2^\cdot , H_2O_2 та ін.), які відіграють важливу роль у багатьох фізіологічних і біохімічних процесах: регуляції тону судин, клітинній проліферації, синтезі простагландинів, передачі сигналів від міжклітинних сигнальних молекул на регуляторні системи, які контролюють експресію генів [1]. При оксидативному стресі відбувається зниження рівня АТФ, гіперпродукція АФК – супероксидних, пероксидних та гідропероксидних радикалів, оксиду азоту (NO) [20]. Пошкоджуючій дії АФК протистоїть антиоксидантна система, яка попереджує утворення, забезпечує зв'язування та модифікацію вільних радикалів, руй-

нування пероксидів, екранування функціональних груп білків і інших молекул [18,1].

Незважаючи на існування ряду наукових досліджень, присвячених вивченню значення оксидативного стресу у механізмах розвитку АФС [15,16,18,19,20,21], його роль у патобіохімічних механізмах ураження нирок при цій патології, залишається недостатньо з'ясованою.

Мета дослідження – дослідити стан окремих показників прооксидантно-антиоксидантної системи та тканинного дихання у нирках при експериментальному антифосфоліпідному синдромі.

Об'єкт і методи дослідження. Дослідження проводили на мишах лінії BALB/c, яких утримували на стандартному раціоні віварію. Експерименти проводили відповідно до «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених на Першому Національному конгресі з біоетики (Київ, 2000) та узгоджених з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986). АФС моделювали за допомогою кардіоліпіну (Sigma, США), який вводили внутрішньом'язово, чотири рази (30 мкг на 1 ін'єкцію, проміжки між ін'єкціями становили 14 діб) [12]. Для підвищення ефективності імунної відповіді кардіоліпін емульгували в 75 мкл повного ад'юванту Фрейнда (перша ін'єкція), наступні ін'єкції проводили з неповним ад'ювантом Фрейнда. АФС формувалася через 2 тижні після останньої ін'єкції кардіоліпіну.

Піддослідних тварин розділили на 2 групи: 1-ша – інтактні; 2-га – миші з АФС. Через 10 діб з моменту підтвердження АФС по 10 тварин кожної групи в умовах тіопентал-натрієвого наркозу виводили з експерименту. Для дослідження використовували 10% гомогенати нирок. Ниркову тканину охолоджували у середовищі виділення, яке містило 0,25 М сахарози, 1 мМ ЕДТА та 10 мМ трис-НСІ-буфер (рН 7,4) [7].

Активність супероксиддисмутази (СОД, КФ 1.15.1.1) визначали за ступенем зниження відновлення нітротетразолію синього у присутності НАДН₂ і феназинметасульфату [13]. Активність каталази (КАТ, КФ 1.11.1.6) визначали згідно методу [11], фіксуючи зміну оптичної щільності в результаті реакції пероксиду водню з молібдатом амонію. Вміст відновленого глутатіону (G-SH) визначали за здатністю його вільних SH-груп взаємодіяти з 5,5'-дитіо-біс-2-нітробензойною кислотою з утворенням тіонітрофе-

нільного аніону, кількість якого прямопропорційна вмісту G-SH [17]. Рівень продуктів вільнорадикального окиснення ліпідів визначали за вмістом гідропероксидів ліпідів (ГПЛ) [4], (ґрунтується на здатності екстрагованих гептан-ізопропіловою сумішшю ГПЛ інтенсивно поглинати світло при довжині хвилі $\lambda=232$ нм) та ТБК-активних продуктів (ТБК-АП) [2] (визначали в реакції з 2-тіобарбітуровою кислотою). Стан енергозабезпечувальних процесів мітохондрій досліджували за активністю сукцинатдегідрогенази (СДГ, КФ 1.3.99.1) та цитохромоксидази (ЦХО, КФ 1.9.3.1). Активність СДГ визначали за відновленням ферриціаніду калію до ферроціаніду калію сукцинатом під дією СДГ [6]. Принцип методу визначення ЦХО ґрунтується на здатності останньої окиснювати диметил-пара-фенілєндіамін і α -нафтол з утворенням індофенолового синього [9].

Статистичну обробку даних здійснювали за допомогою програми STATISTICA 10. Порівняння отриманих величин проводили з використанням U-критерію Манна-Уїтні. Зміни вважали достовірними при $p \leq 0,05$.

Результати дослідження та їх обговорення.

У результаті проведених досліджень встановлено зміни вмісту продуктів ліпідної пероксидації у нирках мишей лінії BALB/c за умов АФС. Так, вміст ГПЛ зростає на 27%, ТБК-АП – на 57%, відносно контролю (рис.).

За даними літератури, інтенсифікація вільнорадикального окиснення поєднується із змінами антирадикального захисту, що проявляється дискоординацією в системі прооксиданти-антиоксиданти [1]. У наших досліджах активність СОД у нирках при АФС зростала на 23%, порівняно із показниками інтактних тварин. Отримані результати узгоджуються із даними С. Perez-Sanchez та співавт. [18]. В той же час відбувалось зниження активності КАТ на 13% (рис.).

Встановлено також виснаження пулу G-SH у нирках, кількість якого зменшувалась на 14%, порівняно з контрольною групою. G-SH бере безпосередню участь у знешкодженні вільних радикалів та їх токсичних продуктів, а також у відновленні сульфгідрильних груп ензимів [3]. На початкових етапах оксидативного стресу збільшення АФК, зокрема, супероксидного аніон-радикалу, може індукувати зростання активності СОД, яка знешкоджує останній. Водночас персистуюча активація даного патологічного процесу призводить до виснаження резервів антиоксидантної системи [18], що у

наших досліджах підтверджувалось зменшенням активності КАТ та вмісту G-SH.

Відомо, що при активації процесів переокиснення мембранних ліпідів, в тому числі, знижується енергозабезпечення клітин внаслідок роз'єднання транспорту електронів і окисного фосфорилування в мітохондріях та розвитку їх дисфункції [18]. У результаті наших досліджень при АФС виявлено порушення функціонування мітохондрій, про що свідчило зменшення активності СДГ і ЦХО відносно контролю. Зниження активності ЦХО у мітохондріях нирок при АФС, яке спостерігається, може бути пов'язане з порушенням надходження електронів від субстратної ланки дихального ланцюга через цитохроми b-c. Встановлені зміни активності ензимів дихального ланцюга свідчать про пригнічення функції мітохондрій, що може супроводжуватись зниженням вмісту макроергічних сполук [10], та негативно позначається на перебігу біохімічних процесів у нирках при АФС.

Висновки. За умов експериментального антифосфоліпідного синдрому у тканині нирок мишей відбувається активація оксидативного стресу, порушення рівноваги у системі прооксиданти-антиоксиданти, що супроводжується накопиченням продуктів вільнорадикального окиснення, дискоординацією активності та вмісту компонентів антиоксидантного захисту та електронно-транспортного ланцюга мітохондрій.

Перспективи подальших досліджень. Зважаючи на те, що у патогенезі ураження нирок при антифосфоліпідному синдромі ключову роль відіграє активація оксидативного стресу, в подальшому планується з'ясувати доцільність пошуку способів корекції цієї патології серед речовин з антиоксидантними властивостями.

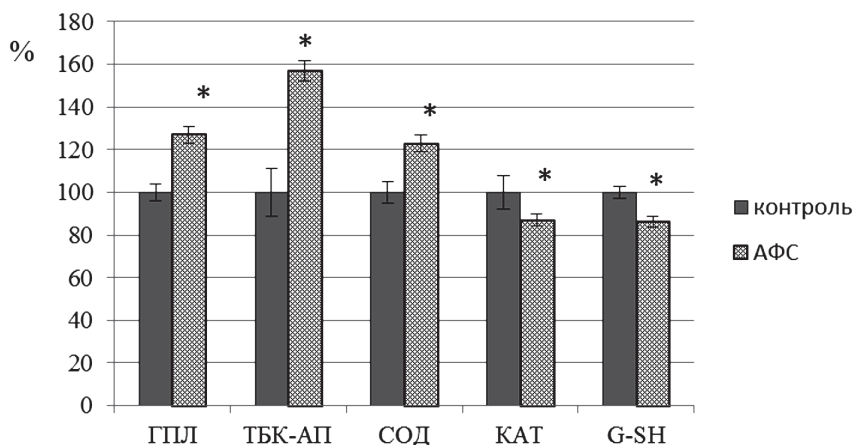


Рис. Показники системи прооксиданти-антиоксиданти у мишей BALB/c за умов антифосфоліпідного синдрому (n= 10).

Примітка. * – достовірність різниці відносно показників групи інтактних тварин.

Література

- Активні форми кисню та їх роль у метаболізмі клітин / М. І. Колісник, Г. В. Колісник, Є. Нідзюлка [та ін.] // Біологія тварин. – 2009. – № 1-2, Т. 11. – С. 59-70.
- Андреева Л. И. Модификация метода определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой / Л. И. Андреева, Л. А. Кожемякин, А. А. Кишкун // Лаб. дело. – 1988. – № 11. – С. 41-43.

3. Антиоксидантна система захисту організму (огляд) / І. Ф. Беленічев, Е. Л. Левицький, Ю. І. Губський [та ін.] // *Соврем. пробл. токсикол.* – 2002. – № 2. – С. 14-23.
4. Гаврилов В. Б. Спектрофотометрическое определение содержания гидроперекисей липидов в плазме крови / В. Б. Гаврилов, М. И. Мишкорудная // *Лаб. дело.* – 1983. – № 3. – С. 33-35.
5. Горницкая О. В. Антифосфолипидный синдром / О. В. Горницкая // *Експериментальна та клінічна фізіологія та біохімія.* – 2008. – № 1(4). – С. – 61-70.
6. Ещенко Н. Д. Определение количества янтарной кислоты и активности сукцинатдегидрогеназы / Н. Д. Ещенко, Г. Г. Вольский // *Методы биохимических исследований.* – Л.: Изд-во Ленинградского университета, 1982. – С. 207-210.
7. Камышников В. С. Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике / В. С. Камышников – М.: МЕДпресс-информ, 2004. – 920 с.
8. Козловская Н. Л. Сосудистое поражение почек при антифосфолипидном синдроме (Обзор литературы) / Н. Л. Козловская // *Нефрология и диализ.* – 2006. – Т.8, №3. – С. 206-216.
9. Кривченкова Р. С. Определение активности цитохромоксидазы в суспензии митохондрий // *Современные методы в биохимии* / Р. С. Кривченкова Под ред. В. Н. Ореховича. – М.: Медицина, 1977. – С. 47-49.
10. Лукьянова Л. Д. Молекулярные механизмы тканевой гипоксии и адаптация организма / Л. Д. Лукьянова // *Фізіологічний журнал.* – 2003. – Т. 49, № 3. – С. 17-35.
11. Метод определения активности каталазы / М. А. Королук, Л. И. Иванова, И. Г. Майорова [та ін.] // *Лаб. дело.* – 1988. – № 1. – С. 16-19.
12. Морфологічний стан матки та плаценти при експериментальному моделюванню гестаційного антифосфоліпідного синдрому на мишах / Зайченко Г. В., Лар'яновська Ю. Б., Деева Т. В. [та ін.] // *Український медичний альманах.* – 2011. – Т. 14, № 4. – С. 136-141.
13. Чевари С. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения её в биологических материалах / С. Чевари, И. Чаба, И. Секей // *Лаб. дело.* – 1985. – № 11. – С. 678-681.
14. Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids / I. C. Green, A. W. Davie, J. Golawski [et al.] // *Anal. biochem.* – 1982. – Vol. 126, № 1. – P. 131-138.
15. Antiphospholipid antibodies are associated with enhanced oxidative stress, decreased plasma nitric oxide and paraoxonase activity in an experimental mouse model / J. Delgado Alves, L. J. Mason, P. R. J. Ames [et al.] // *Rheumatology.* – 2005. – Vol. 44. – P. 1238-1244.
16. "Black swan in the kidney": Renal involvement in the antiphospholipid antibody syndrome / C. M. Nzerue, K. Hewan-Lowe, S. Pierangeli [et al.] // *Kidney International.* – 2002. – Vol. 62. – P. 733-744.
17. Ellman G. L. Tissue sulfhydryl groups / G. L. Ellman // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1959. – Vol. 82. – P. 70-77.
18. Mitochondrial dysfunction in antiphospholipid syndrome: implications in the pathogenesis of the disease and effects of coenzyme Q10 treatment / C. Perez-Sanchez, P. Ruiz-Limon, M. Angeles Aguirre [et al.] // *Blood.* – 2012. – Vol. 119, № 24. – P. 5859-5870.
19. Giannakopoulos B. The pathogenesis of the antiphospholipid syndrome / B. Giannakopoulos, S. A. Krilis // *The New England Journal of Medicine.* – 2013. – Vol. 368. – P. 1033-1044.
20. Oxidative stress and human health / T. Rahman, I. Hosen, M. M. T. Islam [et al.] // *Advances in Bioscience and Biotechnology.* – 2012. – Vol. 3. – P. 997-1019.
21. Rand J. H. Molecular pathogenesis of the antiphospholipid syndrome / J. H. Rand // *Circulation Research.* – 2002. – Vol. 90. – P. 29-37.

УДК 612.015.11-02:616-005.6]-092.9

ПАТОБІОХІМІЧНІ МЕХАНІЗМИ УРАЖЕННЯ НИРОК ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ АНТИФОСФОЛІПІДНОМУ СИНДРОМІ

Яремчук О. З.

Резюме. При експериментальному антифосфоліпідному синдромі відмічено зростання вмісту продуктів вільнорадикального окиснення в нирках, зокрема, збільшення концентрації гідропероксидів ліпідів і ТБК-активних продуктів, що супроводжується дискоординацією активності антиоксидантних ферментів (супероксиддисмутазу і каталазу) і виснаженням пулу G-SH в нирках мишей лінії BALB/c. Також встановлено порушення функціонування митохондрий, що проявляється зниженням активності сукцинатдегідрогенази і цитохромоксидази. Встановлені зміни свідчать, що при експериментальному антифосфоліпідному синдромі відбувається ураження нирок, що проявляється активацією оксидативного стресу, порушенням рівноваги прооксидантно-антиоксидантної системи і електронно-транспортної системи.

Ключові слова: експериментальний антифосфоліпідний синдром, нирки, оксидативний стрес, антиоксидантна система.

УДК 612.015.11-02:616-005.6]-092.9

ПАТОБІОХІМІЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ПОРАЖЕНИЯ ПОЧЕК ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ АНТИФОСФОЛИПИДНОМ СИНДРОМЕ

Яремчук О. З.

Резюме. При экспериментальном антифосфолипидном синдроме отмечено возрастание содержания продуктов свободнорадикального окисления в почках, в частности, увеличение концентрации гидроперекисей липидов и ТБК-активных продуктов, что сопровождается дискоординацией активности антиоксидантных ферментов супероксиддисмутазы и каталазы и истощением пула G-SH в почках мышей линии BALB/c. Также установлено нарушение функционирования митохондрий, что проявляется снижением активности сукцинатдегидрогеназы и цитохромоксидазы. Зарегистрированные изменения свидетельствуют, что при экспериментальном антифосфолипидном синдроме происходит поражение почек, что проявляется

активацией оксидативного стресса, нарушением равновесия в прооксидантно-антиоксидантной и митохондриальной электронно-транспортной системах.

Ключевые слова: экспериментальный антифосфолипидный синдром, почки, оксидативный стресс, антиоксидантная система.

UDC 612.015.11-02:616-005.6]-092.9

PATHOBIOCHEMICAL MECHANISMS OF KIDNEY DAMAGE IN EXPERIMENTAL ANTIPHOSPHOLIPID SYNDROME

Yaremchuk O. Z.

Abstract. Antiphospholipid syndrome is a topical multidisciplinary issue of current medicine. Antiphospholipid syndrome is followed by thrombosis of different size and location, cardiovascular disorders, stroke. Antiphospholipid syndrome is one of the main causes of habitual miscarriage. We know that kidneys are the main target organs for all clinical antiphospholipid syndrome types (primary, secondary, catastrophic). Oxidative stress is directly involved in antiphospholipid syndrome pathogenesis. Despite the number of researches on oxidative stress in antiphospholipid syndrome pathogenesis, the state of kidney prooxidant-antioxidant system in this pathology is still studied insufficiently.

To study the state of specific findings of prooxidant-antioxidant system and kidney mitochondria electron-transport chain in experimental antiphospholipid syndrome was the aim of the research.

The study was carried out on BALB/c mice kept on a standard vivarium diet. Test animals were divided into 2 groups: in the 1st there were intact ones; in the 2nd there were mice with APS. APS was simulated with cardiolipin administered intramuscularly four times (30 mcg per 1 injection, injections in every 14 days). To increase the immune response, cardiolipin was emulsified in 75 mcl of complete Freund's adjuvant (first injection), the other injections were of incomplete adjuvant. APS was developed in 2 weeks after the last cardiolipin injection. Control group animals were administered identical volume injections of sodium chloride intraperitoneally. In 10 days after the APS confirmation 10 animals of each group were removed from the experiment. Kidney homogenates were used for this research.

The activity of antioxidant enzymes (superoxide dismutase and catalase) and reduces glutathione content were determined. The level of lipid peroxidation was defined by the content of lipid hydroperoxides and Thiobarbituric Acid Reactive Substances. Energy generating processes in mitochondria were studied by succinate dehydrogenase and cytochrome oxidase activity.

As a result of our research, lipid peroxidation products increase in the kidney antiphospholipid syndrome, lipid hydroperoxides and Thiobarbituric Acid Reactive Substances in particular, was found as compared to control group.

The decrease of antioxidant system activity and components content in BALB/c mice's kidneys with antiphospholipid syndrome was proven. Superoxide dismutase and catalase activity was decreased. Pool G-SH exhaustion also was present, its amount decreased as compared to the control group.

As a result of our research, mitochondria functioning disorders in antiphospholipid syndrome were discovered. Succinate dehydrogenase and cytochrome oxidase activity decrease as compared to control group was the evidence of it.

So, prooxidant-antioxidant system imbalance in BALB/c mice's kidney tissue with experimental antiphospholipid syndrome was found. It is followed by accumulation of free radical oxidation products, decrease of antioxidant enzymes activity and mitochondrial respiratory chain.

These results evidence the expediency of prooxidant-antioxidant system disorders treatment search among antioxidant substances in cases of antiphospholipid syndrome.

Keywords: experimental antiphospholipid syndrome, kidneys, oxidative stress, antioxidant system.

Рецензент – проф. Непорада К. С.

Стаття надійшла 08.10.2015 р.