

© Король Л. В.

УДК 577.126:616.61-036.12

**Король Л. В.**

**АНТИОКИСЛЮВАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ ТРАНСФЕРИНУ  
ПРИ МОДЕЛЮВАННІ IN VITRO ПРОЦЕСІВ ОКСИДАЦІЇ ПРОТЕЇНІВ  
ТА ЛІПІДІВ ПРИ ХРОНІЧНІЙ ХВОРОБІ НИРОК  
Державна установа «Інститут нефрології НАМНУ» (м. Київ)**

lesyakorol@meta.ua

Дослідження виконано згідно плану НДР ДУ «Інститут нефрології НАМН України» «ЕСЗ-14 Фармако-економічне обґрунтування адекватного лікування анемії у пацієнтів з хронічною хворобою нирок VД стадії» (№ державної реєстрації 0114У002013) та «Вивчити особливості етіо- та імуногенезу рецидивуючої інфекції сечової системи та створити нові способи її профілактики» (№ державної реєстрації 0113У001201).

**Вступ.** На сьогоднішній день актуальним та пріоритетним є напрямок щодо прогнозування *in vitro* ефективності лікарського засобу з урахуванням особливостей інтенсифікації ОС в крові при патології чи за індивідуальним обстеженням самого пацієнта. Активно також розробляються та впроваджуються в практику різні модельні системи, за допомогою яких можливо підтвердити або спрогнозувати клінічну ефективність використання лікарських препаратів або хімічних сполук з антиоксидантними властивостями для корекції оксидантно-антиоксидантного (О/А) дисбалансу [5,6].

Останнім часом доведено, що розвиток хронічної хвороби нирок (ХХН) супроводжується зростанням концентрації продуктів пероксидації та зниженням маркерів антиоксидантного захисту (АОЗ), зокрема й вмісту трансферину (ТР). Цей металопротеїн є з одного боку гострофазним протеїном плазми крові, що здебільшого зростає при активному запальному процесі [1,3], а з іншого – належить до позаклітинних антиоксидантів і фізіологічна та антиоксидантна роль цього металопротеїду пов'язана з транспортом іонів  $Fe^{3+}$ , а його недостатність при ХХН сприяє зниженню АОЗ крові та зменшенню активності системи обміну заліза [4]. Показано також, що при розвитку активного запального процесу здебільшого підвищується вміст цього протеїну, як внаслідок підвищеного синтезу печінкою, так і як необхідного протеїну для транспортування заліза до депо еритропоезу, що особливо актуально, оскільки анемія є одним з найпоширеніших синдромів при ХХН [7,8]. В умовах пролонгованого ОС та в поєднанні з анемією цей протеїн може знижуватися в крові, а саме його функціональна активність щодо транспортування заліза до зон еритропоезу [4].

**Метою дослідження** було вивчення ефективності застосування антиоксидантного препарату (0,4% розчин трансферину) в умовах *in vitro* моде-

льованого окислення ліпідів та протеїнів на моделі зразків крові пацієнтів з ХХН.

**Об'єкт і методи дослідження.** В якості біологічного матеріалу використовували зразки крові умовно-здорових донорів (група 1) та хворих з бактеріально-запальним процесом в нирках (група 2), імунозапальним процесом в нирках (3 група) та хворих з хронічним запаленням, які лікувалися гемодіалізом (4 група, ХХНVD). Кров для дослідження забирали після 12-годинного голодування. Попередньо в зразках крові цих хворих досліджували активність процесів перекисного окислення ліпідів (ПОЛ), окисної модифікації протеїнів, вміст ТР, церулоплазміна. В результаті проведених досліджень були сформовані групи з урахуванням діагнозу та особливостей О/А дисбалансу, що надалі використовували під час експерименту *in vitro*. У зразках крові визначали інтенсивність спонтанного та Фериндукованого окиснення по накопиченню малонового діальдегіду (МДА) та карбонільних груп протеїнів (КГП) при моделюванні *in vitro* [1,2]. Для цього до дослідних та контрольної проб вносили 0,1 мл крові плазми, додавали 1,5 мл трис HCl-буфера з рН 7,4. Спонтанну оксидацію визначали після інкубації (37 °С) протягом 30 хв зразків крові з буфером (дослідна серія К) та з додаванням 0,2 мл 0,4% розчину ТР (дослідна серія КА). Для ініціації Фериндукованого ПОЛ і ОМП використовували середовище I – 25 ммоль/л трис-HCl-буфер рН7,4 та 20 мкмоль/л  $FeSO_4$  (дослідна серія І) та з додаванням розчину ТР (дослідна серія ІА). До складу другої модельної системи входило середовище II (- 0,85 мл 0,1 моль/л трис-HCl-буфера рН 7,4, по 0,05 мл 1 ммоль/л ЕДТА і  $FeSO_4$  та 0,3 ммоль/л  $H_2O_2$ ) оцінювали більш сильну металіндуковану оксидацію (дослідна серія ІІ) та з додаванням розчину ТР (дослідна серія ІІА). Проби інкубували при 37 °С годину, денатурували 20% розчином трихлороцтової кислоти та центрифугували при 3000g 20 хв. В супернатанті за реакцією з тіобарбітуровою кислотою визначали вміст МДА. До денатурованих протеїнових осадів додавали 1,0 мл 0,1 моль/л розчину 2,4-дінітрофенілгідрозину для визначення вмісту КГП. Підбір концентрацій ТР був емпіричним з урахуванням описаних в літературі концентрацій.

В роботі було використано реактиви: 2,4-дінітрофенілгідрозин, ЕДТА, фірми «Sigma-Aldrich» (США), сечовина, трис, трихлороцтова та тіобарбі-

Вплив застосування *in vitro* ТР при моделюваннях оксидативних реакцій пацієнтів з хронічною хворобою нирок

Режими стимуляції	Групи		Вміст КГБс, ум. од /мл				Вміст МДАс, мкмоль/л			
	Група 1 n = 20	Група 2 n = 16	Група 3 n = 10	Група 4 n = 22	Група 1 n = 20	Група 2 n = 16	Група 3 n = 10	Група 4 n = 22		
	1	2	3	4	1	2	3	4		
Спонтанна (К)	1,09 ± 0,10	1,94 ± 0,21	2,49 ± 0,21	2,36 ± 0,19	119 ± 35	312 ± 11	331 ± 19	478 ± 31		
Спонтанна +ТР (КА)	0,93 ± 0,15	1,66 ± 0,15	1,89 ± 0,27	1,79 ± 0,17*	94 ± 39	256 ± 27*	268 ± 27	352 ± 27*		
Металіндукована (I)	1,38 ± 0,18	1,98 ± 0,18	3,12 ± 0,24	3,11 ± 0,17	172 ± 27	372 ± 29	392 ± 24	567 ± 31		
Металіндукована (I) + ТР	1,12 ± 0,15	2,04 ± 0,108	2,77 ± 0,13	2,73 ± 0,17	166 ± 39	304 ± 31*	362 ± 19	422 ± 28*		
Металіндукована (II)	1,84 ± 0,14	3,66 ± 0,21	6,02 ± 0,15	5,92 ± 0,17	279 ± 43	416 ± 25	548 ± 23	769 ± 29		
Металіндукована (II)+ ТР	1,62 ± 0,14	2,99 ± 0,35	5,58 ± 0,18	4,76 ± 0,17*	222 ± 41	342 ± 23*	494 ± 30	592 ± 34*		

Примітка: \* – вірогідна різниця порівняно з рівнем стимуляції

турова кислоти фірми «Merck» (Німеччина), трансферин «Fluka», інші реактиви вітчизняного виробництва. Вірогідність різниці оцінювали за t-критерієм Стьюдента. Статистичний аналіз результатів проводили за допомогою програм Microsoft Excel 5,0.

**Результати дослідження та їх обговорення.**

На першому етапі експерименту проводилося дослідження активності процесів спонтанної та стимульованої оксидації протеїнів та ліпідів. Аналіз результатів продемонстрував підвищення спонтанного утворення КГПс та МДАс у всіх дослідних групах (табл.).

Внесення до дослідних зразків крові 0,2 мл 0,4% розчину ТР (з подальшою інкубацією) сприяло частковому зниженню спонтанної продукції МДАс на 18% ( $p_{до/ст} < 0,05$ ) у 2-й групі та КГПс на 24% ( $p_{до/ст} < 0,05$ ) і МДАс на 26% ( $p_{до/ст} < 0,05$ ) у 4-й групі (з ХХНВД).

Застосування ТР при моделюванні *in vitro* Fe<sup>2+</sup> стимульованого неензимного окиснення сприяло зменшенню продукції МДАс ( $p_{до/ст} < 0,05$ ) у 2-й та 4-й групах (пацієнтів з бактеріальнозапальним процесом та ХХНВД). Використання розчину ТР в моделях з застосуванням більш потужного оксиданта сприяло зниженню утворення КГПс на 20% ( $p_{до/ст} < 0,05$ ), МДАс на 23% ( $p_{до/ст} < 0,05$ ) у 4-й групі (хворих на ХХНВД) та МДАс на 18% ( $p_{до/ст} < 0,05$ ) у 2-й групі (хворих з бактеріальнозапальним процесом в нирках). Найбільш ефективним було використання препарату ТР у 4-й групі. Малоефективним, за даними *in vitro* моделювання процесів окиснення протеїнів та ліпідів, було застосування ТР у 3-й групі (пацієнти з імунозапальними ураженнями нирок), що, скоріш за все, може бути зумовлено досить низькими рівнями церулоплазміну в сироватці крові у таких хворих, котрий бере участь в окисненні Fe<sup>2+</sup> в плазмі крові, а утворене Fe<sup>3+</sup> потім вбудовується в молекулу апо-ТР і транспортує в кістковий мозок, де відбувається синтез гему [4].

Оскільки фізіологічна та антиоксидантна роль ТР пов'язана саме з транспортуванням Fe<sup>3+</sup>, то недостатнє його утворення, внаслідок низької функціональної активності церулоплазміну, не дає можливості насичуватися ТР залізом та проявляти антиоксидантну активність даного протеїну плазми. У 2-й та 4-й дослідних групах (пацієнтів з бактеріальнозапальним процесом в нирках та ХХНВД) рівні церулоплазміну в сироватці крові знаходилися в межах фізіологічної норми, що сприяло виявленню необхідної активності системи окислення Fe<sup>2+</sup> і потенціювало антиоксидантний ефект ТР при *in vitro* моделюванні процесів оксидації. Якщо екстраполювати дані експерименту на можливу клінічну ефективність застосування препаратів ТР, то, ймовірно за все, ефективними для застосування препаратів, до складу яких входить ТР, є стани, що характеризуються його функціональним недостатністю та супроводжуються нормальним або підвищеним рівнем церулоплазміну в крові.

До того ж, дана методика дослідження може бути використана з метою прогнозування ефективності застосування таких препаратів з індивідуальним підходом до пацієнта, ще до використання їх *in vivo*. Це дасть можливість спрогнозувати їх майбутню ефективність. Особливо актуальним це є для пацієнтів з ХХН VD, яким необхідне призначення цього препарату з метою корекції залізодефіцитних станів та анемії.

**Висновки.** Встановлено, що використання ТР при моделюванні *in vitro* процесів оксидації сприяло частковому зниженню спонтанної та металіндукованої продукції МДАс у пацієнтів з бактеріально-запальним процесом в нирках, атакож КГПс і МДАс – у пацієнтів з ХХНВД. Використання ТР в моделях з застосуванням більш потужного оксиданта сприяло зниженню продукції КГПс та МДАс у групі хворих на ХХНВД та МДАс – у групі хворих з бактеріально-запальним процесом в нирках. Малоефек-

тивним було застосування *in vitro* TP у 3-й групі (при імунзапальному процесі в нирках), що може бути зумовлено досить низькими рівнями церулоплазміну в сироватці крові у таких хворих. Ймовірніше за все, що ефективним для застосування препаратів, до складу яких входить TP, будуть стани, що характеризуються його функціональною недостатністю

та супроводжуються нормальним або підвищеним рівнем церулоплазміну в сироватці крові.

**Перспективи подальших досліджень** пов'язані з вивченням та впровадженням в практику методик прогнозування ефективності лікарських засобів антиоксидантної дії на моделі клітин пацієнтів до застосування *in vivo*.

### Література

1. Біохімічні методи оцінки оксидативного статусу у хворих на хронічну хворобу нирок: Методичні рекомендації / [Король Л. В., Мигаль Л. Я., Нікуліна Г. Г., Колесник М. О.]. – Київ, 2013. – 30 с.
2. Дубинина Е. Е. Окислительная модификация белков плазмы крови больных психическими расстройствами (депрессия, деперсонализация) / Е. Е. Дубинина, М. Г. Морозова, Н. В. Леонова [и др.] // Вопросы медицинской химии. – 2000. – № 4. – С. 6-9
3. Куценко Л. А. Место церулоплазмينا среди белков острой фазы как маркера системного воспаления /Л. А. Куценко, И.П. Кайдашев // Лабораторна діагностика. – 2011. – № 3 (57). – С. 59-68.
4. Меньшикова Е. Б. Окислительный стресс: Патологические состояния и заболевания / Е. Б. Меньшикова, Н. К. Зенков, В.З. Ланкин [и др.]. – Новосибирск: АР-ТА, 2008. – 284 с.
5. Ніженковська І. В. Дослідження антиокислювальної активності тіаміну та піридоксину на моделі окисної модифікації протеїнів / І. В. Ніженковська, О. В. Афанасенко, Л. Ф. Осінська // Ukr. Biochem. J. – 2014. – Vol. 86, № 5 (Suppl. 1). – P.70-71
6. Пат. № 2243559 RU, МПК (2004) G01N 33/48 (2008.01), А61Р 13/12 (2008.01) Способ определения уровня неспецифической резистентности организма / Ободников А. А., Коханевич Е. В., Гончарова Я. А.; опуб. 27. 12. 2004. Бюл. №. – 4 с.
7. Intervention strategies to inhibit protein carbonylation by lipoxidation-derived reactive carbonyls / G. Aldini, I. Dalle-Donne, R.M. Facino, [et al.] // Med Res Rev. – 2007. – Vol. 6 (27). – P. 817-868.
8. Pedzik. A. Oxidative stress in nephrology [Text] / Pedzik A., Paradowski M., Rysz J. // Pol. Merkur Lekarski. – 2010. – Vol. 28 (163). – P. 56-60.

УДК 577.126:616.61-036.12

### АНТИОКСИДОВАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ ТРАНСФЕРИНУ ПРИ МОДЕЛЮВАННІ *IN VITRO* ПРОЦЕСІВ ОКСИДАЦІЇ ПРОТЕЇНІВ ТА ЛІПІДІВ ПРИ ХРОНІЧНІЙ ХВОРОБІ НИРОК

Король Л. В.

**Резюме.** Прогнозування *in vitro* ефективності лікарського засобу з урахуванням особливостей оксидантно/антиоксидантного дисбалансу в крові при патології є актуальними та пріоритетним. Мета роботи – дослідження ефективності застосування антиоксидантного препарату (0,4% розчин трансферину) в умовах *in vitro* модельованого окислення ліпідів та протеїнів на моделі зразків крові пацієнтів з хронічною хворобою нирок.

Об'єкт і методи дослідження. Інтенсивність спонтанного та металіндукованого окиснення визначали в зразках крові умовно-здорових донорів (1-ша гр.) та хворих з бактеріально-запальним процесом (2-га гр.), імунзапальним процесом в нирках (3-я гр.) та хворих з хронічним запаленням, які лікувалися гемодіалізом (4-та гр.).

Результати дослідження та їх обговорення. Аналіз результатів продемонстрував підвищення спонтанного утворення КГПс, МДАс та МДАе. Внесення до дослідних зразків крові 0,2 мл 0,4% розчину TP сприяло частковому зниженню спонтанної продукції МДАс на 18% у 2-й групі та КГПс на 24% і МДАс на 26% у 4-й групі. Застосування TP при моделюванні *in vitro* металстимульованого неензимного окиснення сприяло зменшенню продукції МДАс у 2-й та 4-й групах. Використання розчину TP в моделях з застосуванням потужнішого оксиданта сприяло більш виразному антиоксидантному ефекту.

**Ключові слова:** хронічна хвороба нирок, оксидативні процеси, трансферин.

УДК 577.126: 616.61-036.12

### АНТИОКСИДОВАЛЬНІ СВОЙСТВА ТРАНСФЕРИНА ПРИ МОДЕЛЮВАННІ *IN VITRO* ПРОЦЕСІВ ОКСИДОВАЛЬНЯ ПРОТЕЇНІВ І ЛІПІДІВ ПРИ ХРОНІЧЕСЬКОЇ БОЛЕЗНІ ПОЧЕК

Король Л. В.

**Резюме.** Прогнозирование *in vitro* эффективности лекарственного средства с учетом особенностей оксидантно/антиоксидантного дисбаланса в крови при патологии актуальны и приоритетны. Цель работы – исследование эффективности применения антиоксидантного препарата (0,4% раствор трансферрина) в условиях *in vitro* моделируемого окисления липидов и протеинов на модели образцов крови пациентов с хронической болезнью почек.

Объект и методы исследования. Использовали образцы крови условно-здоровых доноров (1-я гр.) и больных с бактериально-воспалительным процессом (2-я гр.), иммунно-воспалительным процессом в почках (3-я гр.) и больных с хроническим воспалением, которые лечились гемодиализом (4-я гр.). В крови определяли интенсивность спонтанного и металиндуцированного окисления по накоплению малонового диальдегида (МДА) и карбонильных групп протеинов (КГП) при моделировании *in vitro*.

Результаты исследования и их обсуждение. Анализ результатов продемонстрировал повышение спонтанного образования КГПс и МДАс. Внесение в опытные образцы крови 0,2 мл 0,4% раствора ТР способствовало частичному снижению спонтанной продукции МДАс на 18% во 2-й гр. и КГПс на 24% и МДАс на 26% в 4-й гр. Применение ТР при моделировании *in vitro* металстимулированного неэнзимного окисления способствовало уменьшению продукции МДАс во 2-й и 4-й группах. Использование раствора ТР в моделях с применением более мощного оксиданта способствовало более выразительному антиоксидантному эффекту.

**Ключевые слова:** оксидативные процессы, хроническая болезнь почек, трансферрин.

UDC 577.126:616.61-036.12

### ANTIOXIDANT PROPERTIES OF TRANSFERRIN IN MODELING IN VITRO OXIDATION OF PROTEINS AND LIPIDS IN CHRONIC KIDNEY DISEASE

Korol L. V.

**Abstract.** Prediction of *in vitro* efficacy of the medicinal product allowing for the oxidant-antioxidant (O/A) imbalance in the blood are important in the pathology and priority. Actively developed and put into practice various model systems in which may confirm or predict the clinical efficacy of the future use of drugs or chemical compounds with antioxidant properties for correction O/A imbalance. The development of chronic kidney disease (CKD) is accompanied by increasing concentration of peroxidation products and decreased markers of antioxidant defense, in particular the content of transferrin (TR). Under conditions of prolonged oxidative stress and anemia in conjunction with this protein can decrease the blood. Purpose – to study the efficacy of antioxidant drug (0.4% solution TR) in a simulated *in vitro* oxidation of lipids and proteins in blood samples models of patients with CKD.

**Material and methods.** As biological material used blood samples healthy donors (1-st group) and patients with bacterial and inflammatory process in the kidneys (2-nd group), immunoinflammatory process in the kidneys (3-rd group) and patients with chronic inflammation treated with hemodialysis (4-th group). To study included patients with deficiency of transferrin in the blood. The blood was determined the intensity of spontaneous and induced oxidation of the metal by the accumulation of malondialdehyde (MDA) and protein carbonyl groups (PSG) in simulation *in vitro*.

**Results.** Analysis of the results showed increasing spontaneous formation PSG and MDA in serum blood. Adding to test samples of blood TR 0.4% solution helped reduce spontaneous partial MDA production by 18% ( $p < 0.05$ ) in 2-th group, and 24% PSG ( $p < 0.05$ ), and MDAs 26% ( $p < 0.05$ ) in the 4th group. The use of TR when simulating *in vitro* stimulated oxidation of metal products helped reduce MDA ( $p < 0.05$ ) in 2nd and 4th groups (patients with bacterial/inflammatory process and CKD VD). Use a solution of TR models using a powerful oxidant formation PSG helped reduce by 20% ( $p < 0.05$ ) MDA at 23% ( $p < 0.05$ ) in the 4th group (patients CKD VD) MDAs and 18% ( $p < 0.05$ ) in group 2 (at bacterial and inflammatory process in the kidneys). Application of TR in the 3rd group (at immunoinflammatory affected kidneys) were ineffective. This may be caused by low levels of ceruloplasmin in serum of these patients, and as TR binds  $Fe^{3+}$ , its formation is insufficient due to low functional activity of ceruloplasmin prevents iron saturated with TR and show antioxidant activity of plasma protein. The levels of ceruloplasmin in serum were within the physiological norm in the 2nd and 4th experimental groups. This helped identify the required activity of the oxidation of iron and potentiated antioxidant effect *in vitro* in TR modeling oxidation processes. This research method can be used to predict the efficacy of antioxidant preparations with an individual approach to the patient prior to their use *in vivo*. This will enable them to predict future performance, especially in patients with CKD VD, which required the appointment of the drug to correct anemia and iron deficiency, on the other – the use of protein drugs is limited by this disease.

**Conclusion.** Using TR during *in vitro* simulation processes facilitated partial oxidation and reduction of spontaneous induced oxidation of the metal metal-induced products in blood patients with bacterial and inflammatory process in the kidneys and PSG and MDA in patients with CKD VD. Using TR models with the use of more powerful oxidants helped reduce production PSG, for MDA in patients with CKD VD and MDA in patients with chronic renal failure.

**Keywords:** chronic kidney disease, oxidative stress, transferring.

Рецензент – проф. Дев'яткіна Г. О.  
Стаття надійшла 30.10.2015 року