

## ПАТОГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ ВЗАЄМОЗВ'ЯЗКІВ ОКИСЛЮВАЛЬНОГО МЕТАБОЛІЗМУ НА ЕТАПАХ РОЗВИТКУ ХРОНІЧНОЇ ХВОРОБИ НИРОК

О.І. Ромаданова

*Харківська медична академія післядипломної освіти МОЗ України*

### Вступ

Хронічна хвороба нирок (ХХН) залишається актуальною проблемою для наукових досліджень та у галузі клінічної нефрології [19, 20]. Останні ниркові реєстри свідчать про те, що від значна кількість випадків термінальної ХХН пов'язані з потребою удосконалення патогенетичної корекції у системі комплексного лікування. Патогенез ХХН є предметом чисельних наукових досліджень у всьому світі [11, 21]. Ключовим ланцюгом у розвитку ХХН є клітинні механізми, порушення локальної гемодинаміки та порушення клубочкової фільтрації. Останнім часом зростає інтерес до ролі цитокінів у прогресуванні ХХН, особливо так званих прозапальних цитокінів, які активують метаболізм сполучної тканини, стимулюють проліферацію фібробластів, епітеліальних клітин, мезанхіального матриксу, включаються до ланок імунзапальних процесів у якості медіаторів [1, 25]. Клініко-метаболічні особливості хворих на ХХН пов'язуються з формування термінальної ниркової недостатності, незалежно від її генезу, а корекція порушень окислювального гомеостазу (ОГ) на рівні клітинних механізмів при первинних та вторинних гломерулярних ураженнях дозволяє уповільнити розвиток та прогресування ниркової недостатності. [22, 23]. У цьому контексті актуальним є вивчення клініко-патогенетичних взаємозв'язків порушень окислювального метаболізму клітин на етапах розвитку хронічної хвороби нирок.

**Мета дослідження** полягала у вивченні клініко-патогенетичних взаємозв'язків порушень окислювального метаболізму клітин на етапах розвитку хронічної хвороби нирок.

### Матеріали та методи досліджень

Дослідження впливу ХХН на формування метаболічних порушень окислювального гомеостазу та біоенергетики клітин, зокрема оцінку стану про-, антиоксидантного захисту хворих з ХНН-I ( $n_1=26$ ; з тривалістю захворювання  $(12,2\pm 0,6)$  р.) та хворих з ХНН-II-III ( $n_2=78$ ; з тривалістю захворювання  $(18,9\pm 1,2)$  р.), проведено за

результатами порівняльного аналізу показників залежно від тривалості перебігу основного захворювання та стадій ХХН. У системі клініко-біохімічного моніторингу хворих з різними стадіями ХХН, окрім загально клінічних методів лабораторної діагностики, виконано дослідження стану окисно-відновного метаболізму (ОВМ) на рівні трьох базових підсистем: ОМБ та НК, біоенергетики клітин, ферментативного ланцюга та ПОЛ і NO-залежних метаболітів.

Стан ферментативного ланцюга оцінювали за показниками вмісту супероксиддесмутази (СОД), глутатіонпероксидази (ГПР), каталази (Кат) у еритроцитах та  $\alpha$ -токоферолу ацетату ( $\alpha$ -ТФА) у сироватці крові хворих [10, 13]. Вміст ГПР визначали за методом R. Olinescu [7, 16]. Вміст каталази визначався спектрофотометрично [3, 28]. Вміст МДА, як індикатора ВРО в плазмі визначено за методом Стальної І.Д. та Гаришвілі М.С. [7, 27]. Вміст ДК в плазмі [14, 29]. Вміст NO-залежних метаболітів ( $NO_{MET}$ ) в плазмі визначено за методикою Гресса [8, 30]. Дослідження закономірностей ОМБ та НК виконано за показниками вмісту білкових компонентів у сироватці крові – 2,4 – динітрофенілгідрозонів (ДНФГ) та альдегідних і карбонільних продуктів ОМБ у спонтанних та індукованих залізом реакціях [12]. Для оцінки ступеня окисної деструкції визначали дрібні ( $\lambda=254$  нм) ОМБ, виявлені в індукованих реакціях ( $I_d$ ), середні ( $\lambda=270$  нм) ОМБ, виявлені в індукованих реакціях ( $I_c$ ), крупні ( $\lambda=280$  нм) ОМБ, виявлені в індукованих реакціях ( $I_k$ ) та відповідно - у спонтанних реакціях ( $C_k$ ,  $C_c$ ,  $C_d$ ) [1, 5]. Оцінку активності аеробного та анаеробного окислення виконано шляхом визначення вмісту малату (М), пірувату (П), лактату (Л) у еритроцитах [18]. Рівень вмісту аденілових нуклеотидів визначали хроматографічним методом в системі діоксанізопропанол-вода-аміак (4:2:4:1), а ідентифікацію аденозиндифосфору (АДФ), аденозинмонофосфору (АМФ) та аденозинтрифосфору (АТФ) кислот виконано в УФ-зоні на «УФС – 365» при  $\lambda=260$  нм [15].

При виконанні дослідження застосовано клініко-статистичні та клініко-інформаційні методи: анамнестичний кількісний аналіз, експертна оцінка з подальшим кількісним аналізом результатів; клініко-статистичні, зокрема: варіаційна статистика [17, 24], застосовано кореляційний аналіз [31].

### Отримані результати та їхнє обговорення

Кореляційний аналіз показників окисної модифікації нуклеїнових кислот та білків у хворих на ХХН передбачав вивчення внутрішньосистемних взаємозв'язків між ОМБ та ступенем їх деструкції. За результатами кореляційного аналізу виявлено, що кількість окисно модифі-

кованих крупних білкових компонентів залежить від вмісту окисно модифікованих білкових компонентів малих розмірів у спонтанних ( $r_{xy}=+0,538$ ) та індукованих реакціях ( $r_{xy}=-0,493$ ) та вміст карбонільних продуктів ОМБ залежить ( $r_{xy}=+0,532$ ) від кількості окисно модифікованих білкових компонентів малих розмірів. Водночас, вміст альдегідних та карбонільних продуктів ОМБ у реакціях індукції визначається вмістом окисно модифікованих білкових компонентів середніх розмірів, що можна пояснити особливостями процесу окисної модифікації на етапах розвитку ХХН. Отже, стан про-, антиоксидантного захисту хворих з ХХН при оцінці ОМБ характеризується системоутворюючим впливом окисно модифікованих компонентів крупних та малих розмірів, а вміст альдегідних та карбонільних продуктів залежить від вмісту ОМБ в спонтанних реакціях. Інформативним критерієм стану ОМБ є вміст 8-гідроксигуаніну, як найбільш чутливого показника окисної модифікації (кореляційні взаємозв'язки з показниками ОМБ менше 0,3, що свідчить про його незалежність та можливість застосування у якості самостійного біохімічного критерію).

Кореляційний аналіз показників окислення фосфоліпідів та NO- залежних метаболітів у хворих з ХХН передбачав вивчення внутрішньосистемних взаємозв'язків між показниками ферментативної ланки про-, антиоксидантного захисту, процесом накопичення первинних продуктів ПОЛ та вмісту нітританіону, як індикатора стану NO- залежних механізмів окислення.

З'ясовано, ферментативна ланка про-, антиоксидантного захисту (ГПР, Кат, СОД) і рівень вмісту  $\alpha$ -ТФА взаємозв'язані з рівнем вмісту продуктів ПОЛ. Із урахуванням кількості достовірних ( $p<0,05$ ) взаємозв'язків та середньої сили цих взаємозв'язків для кожного із аналізованих факторів визначені коефіцієнти системоутворення ( $K_{\cdot}$ ), які в узагальненому вигляді характеризують найбільш впливові фактори (показники ПОЛ) системи про-, антиоксидантного захисту. Системоутворюючим фактором ферментативної ланки АОЗ з найвищим коефіцієнтом ( $K_{\text{ГПР}}=0,233\pm 0,077$ ) є активність ГПР; саме цей фермент, як показав аналіз, має найбільшу кількість кореляційних взаємозв'язків, що визначає його значимість у формуванні компенсаторних реакцій антиоксидантного захисту у хворих на етапах формування ХХН. Зв'язок між вмістом ГПР та іншими ферментами реалізується через вміст каталази ( $r_{xy}=+0,590$ ), активність якої, в свою чергу, взаємозв'язана як з активністю СОД ( $r_{xy}=+0,179$ ), так і з вмістом вільних радикалів під впливом яких формується рівень NO - залежних метаболітів.

Системоутворюючим фактором накопичення продуктів ПОЛ є вміст ДК ( $K_{\text{ДК}}=0,201\pm 0,036$ ). У порівнянні з іншими продуктами ПОЛ, рівні вмісту яких корелюють з ДК, останній відрізняється тим, що має прямий взаємозв'язок з рівнем  $\alpha$ -ТФА у сироватці крові, що є додатковою ланкою механізму формування ферментативної відповіді, переважно на NO - залежну пероксидацію. Отже, стан про-, антиоксидантного захисту хворих з ХХН характеризується системоутворюючим впливом двох основних індикаторів: активність ГПР у еритроцитах периферичної крові (ферментативний ланцюг) та вміст нітританіону (продукти ПОЛ) в сироватці крові хворих на ХХН.

Кореляційний аналіз показників активності аеробного та анаеробного окислення у хворих з ХХН передбачав вивчення внутрішньо системних взаємозв'язків між показниками анаеробного гліколізу (за вмістом лактату і пірувату у еритроцитах периферичної крові хворих), активності окислення у циклі Кребса та показниками біоенергетики (за рівнем аденілових нуклеотидів).

Із урахуванням кількості достовірних ( $p<0,05$ ) взаємозв'язків та середньої сили цих взаємозв'язків для кожного із аналізованих факторів визначені коефіцієнти системоутворення ( $K_{\cdot}$ ), які в узагальненому вигляді характеризують найбільш впливові фактори.

Системоутворюючим фактором стану біоенергетичних процесів у хворих з ХХН з найбільшим коефіцієнтом ( $K_{\text{ГПР}}=0,213\pm 0,020$ ) є рівень вмісту АТФ ( $p<0,05$ ). Цей аденіловий нуклеотид, як показав аналіз, має найбільшу кількість кореляційних взаємозв'язків, що визначає його значимість у формуванні особливостей біоенергетичних процесів при ХХН.

Зв'язок АТФ з іншими аденіловими нуклеотидами характеризується наявністю різноспрямованих залежностей (АМФ - зворотній зв'язок:  $r_{xy}=-0,190$ , АДФ - прямий:  $r_{xy}=+0,180$ ), а найбільш виразним є кореляційний взаємозв'язок з показником активності окислення у циклі Кребса (аеробний гліколіз). Водночас, звертає на себе увагу значна кількість взаємозв'язків між рівнем АМФ та показниками активності окислення як в аеробних так і анаеробних механізмах. Слід зазначити, що у системі біоенергетичних взаємозв'язків АМФ є біоенергетичним антагоністом інших аденілових нуклеотидів, що можливо, забезпечується його метаболічним синергізмом з піруватом.

Отже, якщо АТФ - має прямий взаємозв'язок з активністю аеробного гліколізу ( $r_{xy}=+0,263$ ), то АМФ пов'язана з активністю анаеробного гліколізу ( $r_{xy}=+0,156$ ). Зважаючи на слабкі кореляційні залежності у сис-

темі показників біоенергетичного обміну можна дійти висновку щодо наявності патогенетично зумовленого пригнічення біоенергетичних процесів на етапах формування та розвитку ниркової недостатності.

#### Висновки

1. Тривалість основного захворювання і тяжкість ХХН тісно пов'язані з особливостями клітинного метаболізму. Так, залежно від тривалості основного захворювання окислення фосфоліпідів та NO-залежний метаболізм характеризується метаболічними індикаторами (ГПР та ТК), ОМБ – одним (ступенем дефрагментації) та зміною окисної активності як в аеробних, так і анаеробних механізмах.

2. Тяжкість ХХН, як клінічний еквівалент метаболічних розладів характеризується п'ятифакторним комплексом індикаторів: зниженням активності ферментативного ланцюга про-, антиоксидантного захисту (ГПР та Кат), зниження базових показників біоенергетичного стану клітин (АДФ, АТФ), а також – зміною вмісту продуктів окисної модифікації нуклеїнових кислот.

3. Стадійність ХХН – найбільш впливовий та інформативний клінічний еквівалент метаболічних порушень, пов'язаних з пероксидацією та зміною біоенергетичного потенціалу функціонуючих клітин. Зі стадією ХХН пов'язується комплекс достовірних метаболічних змін на рівні ПОЛ, ОМБ та біоенергетики клітин. Зокрема, у механізмах ПОЛ, стадія ХХН достовірно впливає на ферментативний ланцюг (ГПР), накопичення кінцевих продуктів ПОЛ (МДА) та формування рівня NO – залежних метаболітів. Зниження активності анаеробних окислювальних процесів (лактат) та зниження біоенергетичного потенціалу клітин (АТФ, АДФ) – також достовірно (на рівні  $p < 0,05$ ) залежать від стадії процесу. В системі окисної модифікації білків та нуклеїнових кислот найбільш достовірним метаболічним індикатором, пов'язаним зі стадією ХХН є вміст нуклеїнових кислот. Наведене свідчить про наявність значимих взаємозв'язків між особливостями клінічного перебігу ХХН (стадії, тяжкості, давності захворювання) та ступенем виразності порушень окислювального гомеостазу, що дозволяє обґрунтовувати індивідуалізоване застосування антиоксидантних засобів у якості корекції властивих для ХХН клітинно - метаболічних порушень.

4. Перспективними напрямками подальших досліджень є розробка клініко-метаболічної класифікації реакцій системи окислювального гомеостазу при ХХН з метою індивідуалізації комплексного лікування та сповільнення прогресування ХХН.

#### Література

1. Абакумова Ю.В. Физиологическое и патологическое свободнорадикальное окисление: сущность, методика распознавания, теоретическое и практическое значение / Ю.В. Абакумова // *Врачевание и его методология*. - 1996. - № 4. - С. 33-38.
2. Ардаматский Н.А. Методика определения физиологического и патологического перекисного окисления / Н.А. Ардаматский, Ю.В. Абакумова, Е.Н. Корсунова // *Экоген*. - 1994. - № 4. - С. 9-14.
3. Арутюнян А.В. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма / А.В. Арутюнян, Е.Е. Дубинина, Н.Н. Зыбина. - СПб: ЛИК, 2000. - С. 44-49.
4. Аткинс Р. Гломерулонефриты / Р. Аткинс // *Нефрология и гемодиализ*. - 2000. - Т. 2, № 4. - С. 225-230.
5. Беленічев І.Ф. Продукти вільно радикального перекисного окислення та методи їх ідентифікації / І.Ф. Беленічев, Є.Л. Левицький, С.І. Коваленко // *Современные проблемы токсикологии*. - 2002. - № 4. - С. 9-18.
6. Гаврилов Б.В. Спектрофотометрическое определение содержания ГПР в плазме крови / Б.В. Гаврилов, М.И. Мишкорудная // *Лабораторное дело*. - 1983. - № 3. - С. 33-36.
7. Гаврилов Б.В. Анализ методов определения продуктов перекисного окисления липидов в сыворотке крови по тесту с ТБК / Б.В. Гаврилов, А.Р. Гаврилова, Л.М. Мажуль // *Вопросы медицинской химии*. - 1987. - Т.33, № 1. - С. 118-123.
8. Горбунов Н.В. Активация образования окиси азота, опосредованная метаболитами глутаматными рецепторами в первичных культурах клеток – зёрен мозжечка / Н.В. Горбунов // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. - 1995. - № 7. - С. 40-48.
9. Гунський Ю.І. Методи оцінки антиоксидантних властивостей фізіологічно активних сполук при ініціюванні вільнорадикальних процесів у досліді *in vitro*: метод. рекомендації / Ю.І. Гунський, В.В. Дунаєв, І.Ф. Беленічев. - Київ, 2002. - 26 с.
10. Гуревич В.С. Сравнительный анализ двух методов определения активности супероксиддисмутазы / В.С. Гуревич, К.Н. Конторидинова, С.В. Шапилина // *Лабораторное дело*. - 1990. - № 4. - С. 44-47.
11. Доказательная медицина: ежегодный международный справочник. - Вып. 3. - Пер. с англ. - М.: Медиа-Сфера, 2004. - 687 с.
12. Дубинина Е.Е. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека. Методы ее определения / Е.Е. Дубинина, С.О. Бурмистров, Д.А. Ходов // *Вопросы медицинской химии*. - 1995. - Т. 42, № 1. - С. 24-26.
13. Костюк В.А. Простой и чувствительный метод определения супероксиддисмутазы, основанной на реакции окисления кверцетина / В.А. Костюк, А.И. Потапович, Ж.В. Ковалёва // *Вопросы медицинской химии*. - 1990. - № 32. - С. 88-91.

14. Косухин А.Б. Экстракция липидов смесью гептан изопропанол для определения диеновых конъюгатов / А.Б. Косухин, Б.С. Ахметова // Лабораторное дело. - 1987. - № 5. - С. 335-337.

15. Лабораторные исследования в клинике: справочник / Под ред. В.В. Меньшикова. - М.: Медицина, 1987. - 368 с.

16. Лемешко В.В. Глутатионпероксидаза и глутатионтрансфераза / В.В. Лемешко, Ю.В. Никитченко, И.В. Евич // Украинський біохімічний журнал. - 1987. - № 8. - С. 59-57.

17. Лицук В.А. Информатизация клинической медицине / В.А. Лицук // Клиническая информатика и телемедицина. - 2004. - № 1. - С. 7-13.

18. Методы биохимических исследований / Под ред. М.И. Прохоровой. - Ленинград: ЛГУ, 1982. - 278 с.

19. Пиріг Л.А. Дисліпідемія при гломерулонефриті та значення для прогресування захворювань нирок / Л.А. Пиріг, І.А.Дудар // Врачебная практика. - 2000. - № 2. - С. 13-20.

20. Пиріг Л.А. Механізми і шляхи подолання резистентності перебігу захворювань нирок в терапевтичній клініці / Л.А. Пиріг // Тези XIV з'їзду терапевтів України. - Київ, 1998. - С. 134.

21. Пиріг Л.А. Організація нефрологічної допомоги на засадах сімейної медицини / Л.А. Пиріг // Укр. журнал нефрології та діалізу. - 2005. - № 3. - С. 1-3.

22. Семидоцька Ж.Д. Интерлейкины - маркеры течения хронической болезни почек / Ж.Д. Семидоцька, Т.С. Оспанова, И.А. Чернякова // Матеріали III з'їзду нефрологів України. - Луганськ, 2009. - С. 44-48.

23. Семидоцька Ж.Д. Про чинники прогресування хронічної ниркової недостатності / Ж.Д. Семидоцька, Т.С. Оспанова, О.С. Більченко // Український журнал нефрології та діалізу. - 2005. - № 3 (6). - С. 57-60.

24. Соціальна медицина та організація охорони здоров'я: підручник / Заг. ред. В.М. Москаленко, Ю.В. Вороненко. - Тернопіль, 2002. - С. 50-75.

25. Тареева И.Е. Пути торможения развития хронической почечной недостаточности / И.Е. Тареева, И.М. Кутырина, А.Ю. Николаев [и др.] // Терапевтический архив. - 2000. - Т. 72, № 6. - С. 9-14.

26. Щербань Н.Г. Лабораторные методики для изучения состояния антиоксидантной системы организма и уровня перекисного окисления липидов: методические рекомендации для докторантов, аспирантов, магистрантов. исполнителей НИР / Н.Г. Щербань, Т.И. Горбач, Н.Р. Гусева. - Харьков: ХДМУ, 2004. - 36 с.

27. Якушев В.С. Влияние гистидина на содержание МДА в тканях при экспериментальном инфаркте миокарда / В.С. Якушев, Р.И. Лифшиц // Вопросы медицинской химии. - 1979. - Т. 22, № 4. - С. 476-478.

28. Dillard C.J. Lipid peroxidation products in biological tissues / C.J. Dillard, A.L. Tappel // J. Free Radic. Biol. Med. - 1989. - Vol. 7. - P. 193-196.

29. Dormandi T. The experimental and clinical pathology of diene conjugation / T. Dormandi, D. Wickens // Chem. Phys. Lipids. - 1987. - Vol. 45. - P. 353-364.

30. Hevel S.M. Purification of the inducible murine macrophage nitric oxide synthase / S.M. Hevel, K.A. White // J. Biol. Chem. - 1991. - Vol. 266, № 11. - P. 789-791.

31. Poque J.Y. Overcoming the limitation of currents meta-analysis of randomized controlled trials / J.Y. Poque // Lancet. - 1998. - Vol. 351, № 7240. - P. 971-975.

32. Sarsunova M. Chromatografia na tenrych vrstvach vo farmacia a v klinickej biochemii / M. Sarsunova, V. Schwarz, C. Michalec. - Praha: Vydavatelstvo Osveta, 1980. - 621 p.

#### Резюме

**Ромаданова О.І.** Патогенетичний аналіз взаємозв'язків окислювального метаболізму на етапах розвитку хронічної хвороби нирок.

Досліджено взаємозв'язки підсистеми окисної модифікації білків, нуклеїнових кислот, анаеробного та аеробного окислення і біоенергетичного обміну клітин з прогресуванням ниркової недостатності. Вивчені внутрішньо системні взаємозв'язки між різними ланками окислювального гомеостазу, що дозволяє обґрунтовувати індивідуалізоване застосування антиоксидантних засобів у якості корекції властивих для ХН клітинно - метаболічних порушень.

**Ключові слова:** хронічна хвороба нирок, клітинні механізми прогресування, окислювальний гомеостаз.

#### Резюме

**Ромаданова О.И.** Патогенетический анализ взаимосвязей окислительного метаболизма на этапах развития хронической болезни почек.

Исследованы взаимосвязи подсистем окислительной модификации белков, нуклеиновых кислот, анаэробного и аэробного окисления и биоэнергетического обмена клеток с прогрессированием почечной недостаточности. Изучены внутрисистемные взаимосвязи между разными звеньями окислительного гомеостаза, что позволяет обосновывать индивидуализированное применение антиоксидантных средств в качестве коррекции свойственных для хронической болезни почек клеточно-метаболических нарушений.

**Ключові слова:** хроническая болезнь почек, клеточные механизмы прогрессирования, окислительный гомеостаз.

#### Summary

**Romadanova O.I.** Pathogenetic interrelation of oxidative metabolism on a developing stage of chronic kidney disease.

Investigated the relationship of subsystems of oxidative modification of proteins, nucleic acids, anaerobic and aerobic oxidation and bioenergetic exchange cells with the progression of renal failure. Studied the relationship between the various intra-functioning of oxidative homeostasis, which allows justifying the use of antioxidant individualized remedies as the correction of cellular metabolic disorders characteristic for chronic kidney disease.

**Key words:** chronic kidney disease, the cellular mechanisms of progression, oxidative homeostasis.

*Рецензент: д.мед.н., проф. Я.А. Соцька*