

УДК 616.611-002:576.8.094.7

СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНІ КОМПОНЕНТИ МЕМБРАН У ХВОРИХ НА ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТ РІЗНОГО ВІКУ

Дудар І.О., Нікуліна Г.Г.

*Інститут урології та нефрології АМН України, м. Київ***Ключові слова:** гломерулонефрит, клітинні мембрани, ліпіди, піпоксія

Вступ. Вивчення нефропатій привело дослідників до висновку, що всі захворювання нирок в тій чи іншій мірі пов'язані з патологією базальних або клітинних мембран [2, 4, 17]

Суттєві зміни складу клітинних мембран виникають під впливом продуктів пероксидації ліпідів, фосфоліпаз, протеїназ, комплементу, цитотоксичних факторів, гуморального клітинного- імунітету [9]

На думку J. Diamond et al. [16], хімічними медіаторами пошкодження клітинних мембран клубочка при гломерулонефриті є вільні радикали. У нейтрофільних лейкоцитах та макрофагах після їх активації імунними комплексами та компонентами комплементу відбувається "респіраторний вибух". Проявом його є активація НАДФН - оксидази в мембранах лейкоцитів, внаслідок чого використання кисню збільшується в 2 - 20 разів з утворенням великого надлишку вільних кисневих радикалів у формі супероксидних аніонів O_2^- , перекису водню та гідроксильних радикалів $OH\cdot$. Вільні радикали є токсичними для ендотеліальних, мезангіальних та епітеліальних клітин, а також для гломерулярної базальної мембрани та інших складових частин клубочку. В першу чергу дія токсичних вільних радикалів спрямована на поліненасичені жирні кислоти, які є основною фосфоліпідів(ФЛ). Дослідженнями багатьох авторів [2, 9, 11] доведено, що ФЛ є основною структурною

частиною мембранних ліпідів. Крім цього, поліненасичені жирні кислоти(ПНЖК), які входять до складу ФЛ, вважаються найбільш вразливим структурним компонентом біологічних мембран. Вони в першу чергу пошкоджуються активними метаболітами кисню, що вивільняються при імунопатологічних реакціях. Вільний холестерин (ВХ) забезпечує рухомість ліпідних ланцюгів біомембран, що дозволяє грати йому основну роль як регулятора агрегатного стану клітинних мембран та забезпечувати необхідну плинність та в'язкість двухшарової ліпідної частини мембран. У вивченні патогенезу гломерулонефриту (ГН) велике значення надається мембранодестабілізаційним процесам, та змінам фосфоліпідного складу мембран [10, 13].

Метою нашої роботи було вивчення структурно-функціональних компонентів клітинних мембран у хворих на ГН при різних синдромах захворювання та у різних вікових групах.

Матеріал та методи. Обстежено 81 хворого на ГН різного віку (40 хворих на ГН з сечовим синдромом (СС) та 40 хворих на ГН з нефротичним синдромом (НС)). Порівняння структурно-функціональних компонентів клітинних мембран проводилося серед хворих різного віку (до 21 року, 21-50 років, понад 50 років) в межах одного варіанту захворювання: СС та НС.

Дослідження виконували, використовуючи еритроцити. Еритроцити ізолювали шляхом

центрифування крові, яка містила цитрат натрію, при 3000 оборотів/хв. на протязі 10 хвилин. Після цього осад еритроцитів тричі промивали холодним фізіологічним розчином.

В клітинах еритроцитів ліпіди розташовані на поверхні мембран, синтез нових молекул ліпідів в них не відбувається; ліпідна структура мембран еритроцитів універсальна та повністю відповідає ліпідній структурі мембран в інших клітинах організму [15], в тому числі і нирок [1]. Еритроцити розглядаються як модель клітин організму найбільш доступну для досліджень в клінічних умовах [14], в тому числі і у нефрологічних хворих [7]. Із структурно-функціональних компонентів клітинних мембран визначали концентрацію загальних ФЛ, відсотковий склад індивідуальних ФЛ, а також рівень ВХ. Хроматографію індивідуальних ФЛ проводили у суміші хлороформ-метанол-вода (75:22:3). Виявлені у парах йода пята ідентифікували за допомогою реактивів Драгендорфа (холінутримуючі ФЛ) та нінгидронового (аміноутримуючі ФЛ), величини R_f [6, 12]. На хроматограмах ідентифікували фосфонові кислоти(ФК), лізофосфатидилхолін (ЛФХ), сфінгомієлін(СФМ), фосфатидил-холін(ФХ) та фосфатидилетаноламін(ФЕА)

В ліпідному екстракті визначали колориметрично концентрацію загальних та індивідуальних ФЛ за кількістю мінералізованого фосфору P_H [12], концентрацію ВХ за кольоровою реакцією Лібермана-Бурхарда[8].

Обстеженню підлягало 20 здорових осіб, які і склали групу контролю.

Результати досліджень та їх обговорення. Вивчення структурно-функціональних показників клітинних мембран у хворих на ГН з СС свідчило про однотипні зміни, які визначалися зменшенням концентрації ВХ ($0,92 \pm 0,02$ мг/мл при нормі $1,0 \pm 0,03$; $p < 0,05$) та загальних ФЛ ($96,6 \pm 2,0$ мкгР/мг при нормі $105,0 \pm 3,0$; $p < 0,01$). Зміни спектру індивідуальних ФЛ обмежувалися тенденцією до підвищення відсоткового рівня ЛФХ ($10,9 \pm 0,82$ при нормі $9,7 \pm 1,0$; $p > 0,05$) та тенденцією до зниження СФМ ($31,1,32 \pm 0,92$ при нормі $30,6 \pm 1,27$ $p > 0,05$) а також ФХ ($p > 0,05$). Аналіз змін індивідуальних ФЛ у хворих на ГН з СС майже повністю відповідав фізіологічним механізмам підтримки стаціонарного рівня інтенсивності окислювальних реакцій в ліпідах біомембран, що описані Е.Б.Бурлаковою [3]. Таким чином, ми бачимо, що у хворих на ГН, СС не визначено істотних дестабілізаційних змін в клітинних мембранах організму, що свідчить, що незалежно від віку фізіологічні механізми адаптації спрацьовують.

Показники складу ліпідів мембран еритроцитів хворих різного віку на ГН, НС подано у таблиці. Отримані дані свідчать, що незалежно від віку ГН, НС супроводжується значними процесами дестабілізації клітинних мембран, які свідчать про

декомпенсацію захистних механізмів адаптації.

Рівень ВХ зменшувався у всіх хворих, особливо у хворих підліткового та юнацького віку, що створювало чудові умови для дії цитопатологічних чинників на клітинні мембрани організму (так як підвищувалась плинність та в'язкість бішару клітинної мембрани). У хворих старшої вікової групи рівень ВХ зменшувався у меншому ступені ($0,97 \pm 0,07$), що було достовірно вище, ніж у хворих попередніх двох груп. Збереження щільності мембрани за рахунок незначного зниження структурно-функціонального компоненту мембран-ВХ може вважатися з однієї сторони процесом індукованим онтогенезом та в деякій мірі захищати мембрани від подальшого ушкодження, а з другого боку – сприяти більш швидкому розвитку артеріальної гіпертензії, або бути її наслідком [2].

Зменшення загального рівня ФЛ істотне у хворих всіх вікових груп, не можна виключити, що в результаті саме цього процесу тотальної дестабілізації клітинних мембран в клінічну картину ГН з НС залучаються клітини усього організму). Аналіз показників загальних ФЛ у хворих на ГН, НС різного віку свідчив про найбільше зменшення їх у хворих підліткового та юнацького віку ($90 \pm 0,8$ мкгР/мг в порівнянні з $96,4 \pm 1,4$ та $95,0 \pm 0,2$ у хворих наступних вікових груп).

При аналізі індивідуальних ФЛ (табл.) найбільші дестабілізаційні процеси спостерігалися у хворих підліткового та юнацького віку (рівень ЛФХ збільшувався в порівнянні з іншими віковими групами у найбільшому ступені (на 39%; у хворих зрілого віку відповідно на 20%, в той час як у старшій віковій групі рівень ЛФХ майже не змінювався ($p > 0,05$)). Значне збільшення ЛФХ у юнаків та підлітків повністю відповідає “ стадії аварійної адаптації” на рівні клітинних мембран, що супроводжується зміною мікрров'язкості клітинних мембран та їх фізико-хімічних параметрів. Необхідно зазначити, що ця стадія особливо виразно вимальовується в молодому віці.

Аналіз змін СФМ та ФХ (табл) у загальній структурі ФЛ показав істотне зменшення цих структурно-функціональних компонентів, особливо у хворих підліткового та юнацького віку, що свідчить про повне порушення адаптаційних процесів у хворих цього віку (СФМ та ФХ становлять $27,4 \pm 0,8$ та $23,3 \pm 0,6$, що в порівнянні з нормою, а також хворих інших вікових груп достовірно). Ці зміни також можуть бути наслідком пролонгації першої фази стресу “ стадії аварійної адаптації”. У хворих старших вікових груп процеси адаптації клітинних мембран реалізуються іншим шляхом та рівень ФХ зменшується неістотно.

Вважаємо необхідним проаналізувати зміни рівня ФЕА, беручи до уваги особливе місце ФЕА в метаболічному ланцюзі ФЛ, а саме його близьку “спорідненність” з фосфатидилсеріном, завдяки

переходу однієї фракції в іншу через процеси декарбоксілювання та можливість взаємодії з метильною групою та утворенням ФХ. Цей факт має вагоме значення, так як дає можливість розцінювати ФЕА, як своєрідний показник резервних можливостей клітинних мембран відповідно процесам відновлення своїх структурно-функціональних характеристик[13].

Аналіз показників ФЕА свідчить про збереження його рівня у хворих підліткового та юнацького віку, що можна розцінювати як збереження резервних можливостей щодо відновлення структурно-функціональних компонентів клітинних мембран, в той час як у хворих на ГН старшої вікової групи рівень ФЕА падає ($21,0 \pm 0,8$ при нормі $26,4 \pm 1,0$), що свідчить про вичерпання компенсаторних можливостей

клітинних мембран. Не можна виключити, що саме невеликі показники дестабілізації клітинних мембран у хворих старшої вікової групи пояснюються включенням мобілізації резервних можливостей клітинних структур, однак підтримка стабілізаційних процесів відбувається за рахунок вичерпання цих механізмів, що можна трактувати як виснаження клітинних резервних можливостей, щодо відновлення стабільної клітинної структури..

На сьогодні, одним з ведучих механізмів патогенезу ГН, вважається гіпоксія, яка признається багатьма дослідниками як самий потужний фактор стресової дії на організм, та супроводжується значними метаболічними змінами. Гіпоксія стимулює зміни метаболізму ФЛ, які залежать від віку хворого.

Таблиця 1

Показники складу ліпідів в мембранах еритроцитів на гломерулонефрит різного віку

Ліпіди мембран еритроцитів	Контроль	Вік хворих			P	
		до 21 року	21-50 років	понад 50 років		
Групи	0	1	2	3		
N	n=20	n=15	n=24	n=11		
Вільний холестерин мг/мл	$1,0 \pm 0,03$	$0,86 \pm 0,07$	$0,93 \pm 0,02$	$0,97 \pm 0,07$	$p1-0 < 0,001$; $p2-0 < 0,05$; $p3-0 > 0,05$; $p1-2 < 0,05$; $p3-1 < 0,01$; $p2-3 > 0,05$	
Загальні фосфоліпіди МкгР/мг	$105,0 \pm 3,0$	$90 \pm 0,8$	$96,4 \pm 1,4$	$95,0 \pm 0,2$	$p1-0 < 0,001$; $p2-0 < 0,01$; $p3-0 < 0,01$; $p1-2 < 0,05$; $p3-1 < 0,05$; $p2-3 > 0,05$	
Індивідуальні Ф	Фосфонові кислоти	$12,3 \pm 0,8$	$13,3 \pm 2,0$	$13,2 \pm 0,3$	$13,9 \pm 0,7$	$p1-0 > 0,05$; $p2-0 > 0,05$; $p3-0 > 0,05$; $p1-2 > 0,05$; $p3-1 > 0,05$; $p2-3 > 0,05$
	Лізофосфатидилхолін	$8,45 \pm 1,0$	$14,5 \pm 0,9$	$11,0 \pm 0,98$	$9,0 \pm 1,0$	$p1-0 < 0,001$; $p2-0 < 0,05$; $p3-0 > 0,05$; $p1-2 > 0,05$; $p3-1 < 0,05$; $p2-3 > 0,05$
	Сфінгомелін	$30,2 \pm 0,4$	$27,4 \pm 0,8$	$32,0 \pm 1,0$	$31,0 \pm 0,9$	$p1-0 < 0,05$; $p2-0 > 0,05$; $p3-0 > 0,05$; $p1-2 < 0,05$; $p3-1 < 0,05$; $p2-3 > 0,05$
	Фосфатидилхолін	$25,6 \pm 0,8$	$22,3 \pm 0,6$	$24,8 \pm 0,7$	$26,1 \pm 0,7$	$p1-0 < 0,05$; $p2-0 < 0,05$; $p3-0 < 0,05$; $p1-2 > 0,05$; $p3-1 < 0,05$; $p2-3 > 0,05$
	Фосфатидилетаноламін+ Фосфатидилсерин	$23,9 \pm 1,0$	$22,4 \pm 0,6$	$20,5 \pm 0,5$	$19,0 \pm 0,8$	$p1-0 > 0,05$; $p2-0 < 0,05$; $p3-0 < 0,001$; $p1-2 > 0,05$; $p3-1 < 0,05$; $p2-3 > 0,05$

Висновки. Наші клінічні дослідження показують:

- у хворих на ГН, СС не визначено істотних дестабілізаційних змін в клітинних мембранах організму, що свідчить, що незалежно від віку фізіологічні механізми адаптації спрацьовують;

- аналіз змін індивідуальних ФЛ у хворих на ГН, СС повністю відповідав фізіологічним механізмам підтримки стаціонарного рівня інтенсивності окислювальних реакцій в ліпідах біомембран, що супроводжується збагачення клітинних мембран більш стійкими до окислення фракціями фосфоліпідів, а саме СФМ та ФХ;

- збільшення ЛФХ повністю відповідає "стадії аварійної адаптації" на рівні клітинних мембран,

що супроводжується зміною мікров'язкості клітинних мембран та їх фізико-хімічних параметрів. Необхідно зазначити, що ця стадія особливо виразно вимальовується в молодому віці;

- у хворих старших вікових груп процеси адаптації клітинних мембран спрацьовують за рахунок використання ФЕА, в той час як рівень ФХ залишається майже нормальним;

- невеликі показники дестабілізації клітинних мембран у хворих старшої вікової групи пояснюються включенням мобілізації резервних можливостей клітинних структур. Підтримка стабілізаційних процесів у хворих старших вікових груп відбувається за рахунок вичерпання цих механізмів, що можна трактувати як виснаження

клітинних резервних можливостей, щодо відновлення стабільної клітинної структури.

ЛІТЕРАТУРА

1. Апуховская Л.И., Ивашкевич С.П., Омельченко Л.И. Изменение липидного состава эритроцитарных, плазматических и митохондриальных мембран коркового слоя почки при экспериментальном рахите //Вопр.мед.химии.-1982.-№3.-С.105-110.
2. Бергельсон Л.Д. Мембраны, молекулы, клетки.- М.; Наука, 1982.-183с.
3. Бурлакова Е.Б. Молекулярные механизмы действия антиоксидантов при лечении сердечно-сосудистых заболеваний // Кардиология.-1980.-№8.-С.41-48.
4. Бурова В.Я., Цветкова Е.И., Ржевская О.Н. Структурно-функциональные нарушения мембран клеток крови, мочи и почечного эпителия при пиелонефрите у детей.// Проблемы мембранной патологии.-Москва.-1984.- С.106-111.
5. Вельтишев Ю.Е., Клембовский А.И. Проблемы мембранной патологии в педиатрии. Сборник научных трудов.- 1984.-185с.
6. Джавадов А.К. Определение фосфолипидов методом тонкослойной хроматографии с последующей денситометрией //Лаб. дело.- 1989.-№2.-С.28-29
7. Жмуров В.А., Крылов В.И., Иванова Е.Е., Содержание в крови и моче продуктов перекисного окисления и ферментативная активность мочи при остром и хроническом гломерулонефрите у детей // Урология и нефрология.-1983.-№4.- С.56-59.
8. Колб В.Г., Камышников В.С. Клиническая биохимия.-Минск: Беларусь.1976.-303с.
9. Крепс Е.М. Липиды в биологических мембранах.-М.:Наука, 1982.-340с.
10. Курилова А.И., Митрофанова О.В., Козлов В.В., Барановская С.В. Изменение фракционного состава фосфолипидов эритроцитов и плазмы крови у больных с хроническим гломерулонефритом// Нефрология.-1998.-Т.2.-№1.-С.37-41
11. Крылов В.И., Вельтишев Ю.Е., Петрушина А.Д., Чимаров В.М. Липидный обмен у детей // Проблемы мембранной патологии в педиатрии.-М.,1984.-С.35-47.
12. Маркова М.Н. Методы изучения состояния липидного обмена //Биохимические методы исследования в клинике.-М.:Медицина,1969.-С.283-341.
13. Смирнова Н.Н., Козлов В.В., Флеров М.А. Фосфолипидный состав плазмы крови как показатель организации фосфолипидного матрикса мембран почек и печени// Нефрология.-1998.-Т.2,№2.-С.81-84.
14. Черницкий Е.А., Воробей А.В. Структура и функция эритроцитарных мембран.-Минск: Наука и техника,1981.- 216с.
15. Уайт А., Хандлер Р., Смитт Э., Хелл Р., Летан И. Основы биохимии. Пер.с англ.-М.,Медицина, 1981.-Т.2.-С.541-1152.
16. Diamond J.R. The role of reactive oxygen species in animal models of glomerular disease //Am.J.Kidn.Dis.-1992.-V. 19.-P. 292-300.
17. Parves L., Kahman M.A. Moncada K. Contrast-media-induced peroxydation in the rat kidney //Invest.Padid.- 1989.- V.24.-№99.-P.697-702.

SUMMARY

STRUCTURALLY FUNCTIONAL COMPONENTS OF MEMBRANES AT THE PATIENTS OF GLOMERULONEPHRITIS OF DIFFERENT AGE

Dudar I., Nikulina G.

The structurally functional components of cytomembranes at the patients of glomerulonephritis with urine and nephrotic syndrome of different age are investigated. It is shown, at the patients with urine syndrome irrespective of age of change cytomembranes carry adaptive character, the changes of membranes at the patients of glomerulonephritis with nephrotic syndrome more essential and at the patients of the senior age are accompanied by an exhaustion of reserve components.