

Оценка переноса гомоцистеина белками и метаболические нарушения у пациентов, получающих лечение хроническим гемодиализом

А.А. Жлоба, Т.Ф. Субботина, Е.С. Алексеевская, Р.В. Голубев
Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации,
197022, Санкт-Петербург, ул. Л. Толстого, д. 6-8, Россия

Evaluation of protein related homocysteine transportation and metabolic disorders in patients treated with chronic hemodialysis

A.A. Zhloba, T.F. Subbotina, E.S. Alekseevskaya, R.V. Golubev
Pavlov First Saint Petersburg State Medical University,
L'va Tolstogo str. 6/8, Saint Petersburg, Russia, 197022

Ключевые слова: общий гомоцистеин, гемодиализ, гомоцистеинилирование белков, ультрафильтрация, митохондриальная дисфункция, сукцинат, глутатион

Цель исследования: Изучить изменения транспорта гомоцистеина (Гци) белками крови и показателей функционирования митохондрий в условиях гемодиализа.

Материалы и методы: Исследовали образцы плазмы здоровых доноров и пациентов, получающих лечение хроническим гемодиализом с двумя типами диализирующих растворов – стандартным бикарбонатным и с добавлением сукцината. Уровень Гци и глутатиона определяли ВЭЖХ-методом, содержание аминокислот в форме связанной с крупномолекулярной фракцией белков плазмы крови оценивали с помощью процедуры ультрафильтрации через устройства, задерживающие белки с массой более 300 кДа. Для оценки фильтруемости аминокислот введен фактор фильтрации (F), представляющий собой отношение концентрации аминокислоты в ультрафильтрате к его общей концентрации в препарате плазмы крови. Уровень молочной и пировиноградной кислот определяли фотоколориметрическим и кинетическим методами соответственно.

Результаты: В группе здоровых доноров 25-ый перцентиль F Гци составил 0,44. Это значение было принято в качестве нижней границы референтного интервала. У пациентов на хроническом гемодиализе, имевших выраженную гипергомоцистеинемию (ГГЦ), выявлено снижение фильтруемости Гци, но не глутатиона. Низкая фильтруемость ($F < 0,44$) указывает на связывание Гци преимущественно с крупномолекулярными белками или комплексами белков, а не с альбуминовой фракцией. Возможно, высокий уровень F характеризует «менее опасную» ГГЦ, тогда как низкие значения F могут сопровождаться повышенной вероятностью удерживания Гци в клетках сосудистой стенки за счет рецепторного эндоцитоза вместе с альфа-2-макроглобулином или апопротеином В даже в отсутствие ГГЦ.

Заключение: В работе продемонстрированы снижение транспорта Гци альбумином у пациентов, получающих лечение гемодиализом, а также возможность применения процедуры ультрафильтрации для изучения связывания Гци крупномолекулярной фракцией белков крови. Применение сукцинат-содержащего диализирующего раствора сопровождалось лучшими показателями фильтруемости Гци и показателями функционирования митохондрий в сравнении с пациентами, получающими стандартный бикарбонатный гемодиализ.

Адрес для переписки: Жлоба Александр Анатольевич
Телефон: +7 (812) 338-71-08 E-mail: zhloba@mail.spbnit.ru

Objective: The aim of the study was the evaluation of homocysteine transportation by plasma proteins and metabolic abnormalities associated with mitochondrial dysfunction in patients treated with chronic hemodialysis.

Materials and Methods: Plasma samples from healthy donors and patients treated with chronic hemodialysis using two types of dialysis solution were studied: commonly used bicarbonate or one with succinate. Homocysteine and glutathione were quantified with HPLC. For evaluation of the filterability protein-bound aminosulfhydryls by ultrafiltration procedure we introduce filtering factor (F) that is the ratio of the aminosulfhydryl concentration in the ultrafiltrate to its overall concentration in the plasma.

Results: In the group of healthy donors the value of 25th percentile of factor F for homocysteine was 0.44. Patients with moderate hyperhomocysteinemia showed the decreased filterability of homocysteine, but not glutathione. Low homocysteine filterability ($F < 0.44$) shows the predominant binding of homocysteine to high molecular weight proteins or to protein aggregates, but not to the albumin fraction. Perhaps, the high value of F characterizes the “less dangerous” hyperhomocysteinemia.

Conclusion: In this paper, we demonstrated the evaluation of decreased homocysteine transportation by plasma albumin in patients treated with chronic hemodialysis, and introduced the ultrafiltration procedure to estimate the homocysteine binding to macromolecular fraction of blood proteins. Application of succinate-containing dialysis solution was associated with the improvement in the homocysteine filterability of and with decreased level of the mitochondrial dysfunction markers compared to patients receiving bicarbonate hemodialysis.

Key words: total homocysteine, hemodialysis, homocysteinylated proteins, ultrafiltration, mitochondrial dysfunction, succinate, glutathione

Введение

Повышение суммарного содержания различных фракций гомоцистеина (Гци) в крови выше 12 мкМ принято называть гипергомоцистеинемией (ГГЦ). Термин «общий гомоцистеин» плазмы крови (oГци, tHcy) обозначает сумму концентраций аминотиола в восстановленной (-SH) и окисленных (-S-S-) формах [3, 6]. ГГЦ у пациентов, находящихся на лечении с применением хронического гемодиализа, отличается длительным и тяжелым течением [1, 2, 8]. Предполагают, что S- и, частично, N-гомоцистеинилирование белков играет основную роль в токсических эффектах Гци [14, 15, 16, 24]. Благодаря прочной связи с 34 цистеиновым остатком альбумина, Гци в норме транспортируется в крови, в основном, с этим белком [23]. Участие в патофизиологических реакциях данного аминотиола объясняется образованием смешанных дисульфидов с другими белками, включая фибронектин, транстиретин и металлотионеин. S-гомоцистеинилирование белков по остаткам цистеина частично объясняет механизм цитотоксичности высокого уровня Гци [15]. Возможно, гомоцистеинилирование апопротеина В (apoB) в составе липопротеидов может приводить к переносу Гци в клетки сосудистой стенки, включая эндотелиоциты [28].

Основная часть транспортируемого белками Гци может быть отделена от белков при помощи влияний, направленных на тиол-дисульфидный обмен [9].

В предыдущих исследованиях показано, что у пациентов с хронической болезнью почек наблюдается значительное изменение транспорта Гци белками плазмы со сдвигом в сторону транспорта крупномолекулярными белками и белковыми ком-

плексами с молекулярной массой выше 300 кДа. В соответствии с полученными ранее данными, при ГГЦ значительная доля Гци переносится высокомолекулярными фракциями, содержащими альфа-2-макроглобулин ($\alpha 2M$) [3, 4, 7, 11, 26].

Показано, что применение диализирующих растворов, содержащих интермедиат цикла Кребса – сукцинат, способствует положительным сдвигам тканевого метаболизма в целом [10, 19]. Влияние данного вида диализирующего раствора на транспорт Гци белками крови не изучено. Кроме этого, отсутствуют четкие рекомендации по применению тестов оценки функции митохондрий при гемодиализе с применением интермедиатов цикла Кребса.

Цель настоящего исследования состояла в изучении изменения транспорта Гци белками крови в условиях гемодиализа с применением сукцинат-содержащего диализирующего раствора. Контроль системной митохондриальной дисфункции (МД) осуществляли с применением тестов на лактат (молочная кислота) и пируват (пировиноградная кислота) в условиях тщательного соблюдения температурного и временного режимов получения препаратов плазмы крови.

Материалы и методы

Исследование с образцами здоровых доноров и пациентов ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова проведено с 2009 по 2013 гг. Во всех случаях имелось информированное согласие на анонимное использование полученных в результате исследования данных. Исследование уровней oГци, глутатиона (Глт), молочной (МК) и пировиноградной кислот (ПВК), а также содержание аминотиолов в форме, связан-

Таблица 1

Характеристика обследованных групп

Группа	1	2	3	
	Пациенты с терминальной стадией почечной недостаточности на гемодиализе	Пациенты с высоким уровнем холестерина и ГГЦ	Доноры	
			После замораживания и оттаивания	Образцы без заморозки
	Группа 1	Группа 2	Группа 3	
N	23	8	22	9
Мужчины/ женщины	11/12	2/6	8/14	3/6
Возраст, лет	46-73	> 55	19-58	27-58
Общий гомоцистеин, мкМ M±SD (Me)	31,8±14,4 (28,9)	17,2±0,81 (17,4)	7,4±2,5 (6,9)	7,2±2,3 (6,9)
Комментарии	Средняя продолжительность лечения гемодиализом – более 9 лет; Терапия фолиевой кислотой (52%) и витаминами B6, B12 (33%); Креатинин 1078 (818-1167) мкМ; Мочевина 29,6 (24,2-35,2) мМ; Общий холестерол 4,56 (3,91-5,47) мМ; С-реактивный белок 3,8 (2,0-6,6) мг/л; Общий белок 65,0 (61,0-68,0) г/л; Альбумин 34,8 (30,0-36,6) г/л. Образцы плазмы крови на исследование брали непосредственно перед процедурой гемодиализа; Использовали «свежий» биоматериал, а также образцы после предварительной заморозки при -80°C.	Общий холестерол 5,28-7,33 мМ; С-реактивный белок 1,7-9,6 мг/л.	Без приема витаминно-содержащих препаратов.	Использовались при исследовании влияния заморозки образца на фильтруемость аминокислот.

Примечание: ГГЦ – гипергомоцистеинемия

ной с фракциями белков плазмы крови, проводили в отделе биохимии НИЦ ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова.

Материал исследования. В исследовании использовали плазму крови, взятой из кубитальной вены утром натощак в вакутейнеры с ЭДТА в качестве антикоагулянта. В ходе работы были строго выдержаны временной и температурный режимы процессирования биоматериала. Кровь объемом не менее 5 мл после взятия помещали на лед (температура около 0°C). Процедуру отделения форменных элементов крови проводили в течение не более 20 минут от момента взятия крови. Кровь центрифугировали 15 минут при 580 g (3000 об./мин). Образцы плазмы до анализа хранили при температуре -80°C и после оттаивания сразу включали в анализ. Также все образцы пациентов группы 1 и 9 из 22 образцов плазмы доноров включали в исследование сразу после отделения форменных элементов, не подвергая замораживанию.

Всего в исследование было включено четыре группы образцов плазмы крови (табл. 1).

В первую группу отобрано 23 образца, взятых у пациентов (11 мужчин и 12 женщин) старше 45 лет с терминальной стадией почечной недостаточности, получающих лечение в отделении хроническо-

го гемодиализа ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова и имеющих ГГЦ. Этиология терминальной почечной недостаточности у данных пациентов включала хронический гломерулонефрит (30,5%), поликистоз почек (17,4%), артериальную гипертензию (17,4%), интерстициальный нефрит (17,4%), сахарный диабет (8,7%), системный васкулит (4,3%) и вторичный амилоидоз (4,3%). Все пациенты получали сеансы гемодиализа три раза в неделю с использованием капиллярных диализаторов с площадью поверхности мембраны от 1,4 до 2,0 м². Продолжительность одной процедуры гемодиализа составляла 3,5-5 часов. Скорость объемного кровотока через диализатор была 250-300 мл/мин, поток диализирующего раствора – 500 мл/мин. 14 пациентов получали гемодиализ с использованием безацетатного сукцинат-содержащего бикарбонатного диализирующего раствора Асолосукцинат (НПО «Нефрон», Россия) не менее полугода до взятия биоматериала в исследование, остальные (n=9) – гемодиализ со стандартным бикарбонатным раствором, содержащим ацетат в концентрации 3,0 ммоль/л, также произведенным в НПО «Нефрон». Образцы плазмы крови на исследование брали до процедуры гемодиализа.

Вторая группа включала 8 образцов плазмы крови пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями

ями в возрасте старше 55 лет с гипергомоцистеинемией и гиперхолестеринемией. Данные образцы были использованы для сравнения фильтрующей способности фильтров Vivaspin 100,000 и 300,000 MWCO PES фирмы «Sartorius» (Германия).

Третью группу составили образцы от 22 здоровых доноров в возрасте от 19 до 58 лет с уровнем оГци в пределах референтного интервала (до 12 мкМ) – от 5 до 11,7 мкМ. Данная группа являлась контрольной при исследовании фильтруемости аминокислот. Образцы 9 доноров анализировали дважды – без замораживания и после предварительной заморозки согласно описанным выше условиям.

Дополнительно для определения референтных уровней МК и ПВК использовали образцы плазмы крови еще 22 здоровых доноров в возрасте от 20 до 25 лет со средним уровнем оГци 5,7 (от 2,9 до 8,3 мкМ). Данная группа являлась контрольной при оценке показателей, характеризующих МД (не представлена в Таблице 1).

Результаты рутинных лабораторных тестов и клиническая характеристика пациентов получены ретроспективно.

Ультрафильтрация плазмы крови. Были определены уровни оГци и ГЛТ в препаратах плазмы и их ультрафильтратах. Это позволило рассчитать параметр фильтруемости Гци в виде коэффициента фильтрации. Получение фракций Гци и ГЛТ в фильтрах плазмы крови было проведено с использованием центрифужных устройств Vivaspin 500 фирмы «Sartorius» (Германия) с порами 300,000 и 100,000 MWCO PES. Ультрафильтрация препаратов плазмы была проведена в соответствии с рекомендациями производителя и ранее описанной модификацией [7, 26]. Образцы разведенной 1:4 0,9% раствором NaCl плазмы центрифугировали при 6000 об/мин (2000 g) в течение часа при комнатной температуре. Фильтруемость аминокислот сравнивали по коэффициенту фильтрации. Коэффициент или фактор фильтрации (*F*) представлял собой соотношение концентрации Гци или ГЛТ в ультрафильтрате к общей концентрации соответствующего аминокислота в препарате плазмы крови. $F = \text{оГци в ультрафильтрате} / \text{оГци в препарате плазмы}$. Фактор *F* для ГЛТ оценивали так же.

Определение гомоцистеина и других аминокислот в плазме крови и ее препаратах определяли так, как описано ранее [25, 26]. Пробоподготовку для определения оГци и ГЛТ в ультрафильтратах осуществляли так же, как и в отношении цельной плазмы крови.

Оценка митохондриальной дисфункции на системном уровне. Концентрацию МК в плазме крови определяли колориметрически с помощью лактатоксидазного теста по набору ОАО «Витал Девелопмент Корпорэйшн» (Россия).

Концентрацию ПВК определяли в безбелковом ультрафильтрате плазмы энзиматическим методом

с использованием лактатдегидрогеназы. По данным литературы концентрация ПВК в крови у здоровых лиц может колебаться в пределах до 100 мкМ [17]. Для получения безбелкового ультрафильтрата плазмы крови смешивали с 0,9 % раствором NaCl в соотношении 1:4. Ультрафильтрат плазмы получали центрифугированием при 2000 g в течение 1 часа при 4°C с использованием центрифужных приспособлений вместимостью 500 мкл Vivaspin 3,000 MWCO PES («Sartorius», Германия). Реакционная смесь объемом 330 мкл включала: 130 мкл ультрафильтрата, 130 мкл 50 мМ трис-HCl буфера pH 7,8, 15 мкл препарата лактатдегидрогеназы (ЛДГ; «Sigma-Aldrich», США) с удельной активностью 50 U/мл и 45 мкл 1 мМ раствора NADH. Измеряли падение оптической плотности при 340 нм. Падение оптической плотности завершалось в описанных условиях через 10 мин после прибавления препарата ЛДГ при различном содержании ПВК до полного его исчерпания в реакционной смеси. Концентрацию ПВК определяли по данным предварительно полученной калибровочной кривой. В качестве холостых проб служили реакционные смеси без добавления пирувата или препарата ЛДГ для определения стартового значения оптической плотности.

Дополнительные тесты. Уровень $\alpha 2\text{M}$ определяли с использованием иммунотурбидиметрического набора фирмы Beckman Coulter, Inc, США. Белок в препаратах определяли биуретовым методом. Определение концентраций креатинина, мочевины, общего холестерина, С-реактивного белка и общего белка выполнено с использованием стандартного оборудования и наборов для клинико-диагностических лабораторий.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием методов параметрической и непараметрической статистики. Методом дескриптивной статистики проводили оценку среднего арифметического и среднеквадратичного отклонения ($M \pm SD$), а также медианы и квартилей ($Me(Q1-Q3)$). Степень соответствия параметров наблюдаемого статистического распределения теоретическим распределениям оценивали с помощью критериев Колмогорова-Смирнова и Пирсона. Для оценок межгрупповых различий использованы непараметрические тесты Вилкоксона (зависимые данные) и Манна-Уитни (независимые данные). Использовались также методы корреляционного анализа – критерий Спирмена (r_s). Критический уровень достоверности нулевой статистической гипотезы принимали равным 0,05. Статистическую обработку материала выполняли с использованием SPSS16 и SAS 9.3.

Результаты исследования

Целью серии предварительных опытов было определение типа фильтра, не пропускающего

в ультрафильтрат молекулы (или диссоциированные субъединицы) $\alpha 2M$. Для этого была использована плазма пациентов группы 2 с умеренной ГЦ (табл. 1). Сравнение фильтрующей способности в отношении белков плазмы крови было необходимо, так как единицы MWCO PES использованных фильтров приблизительно указывают на способностью удерживать растворенные белки выше 100 или 300 кДа, соответственно.

При использовании фильтров с порами 100,000 MWCO PES в ультрафильтратах плазмы обнаружены от 8 до 37% Гци (Me=21%) и от 7 до 33% белка (Me=21%). После фильтрации этих же препаратов плазмы через фильтры 300,000 MWCO PES в ультрафильтратах обнаружено от 20 до 39% Гци (Me=28%) и от 37 до 56% белка. По данным иммуноферментного анализа $\alpha 2M$ определялся в не фильтрующемся высокомолекулярном материале, но не выявлялся в фильтрах. В связи с этим, в дальнейшем были использованы фильтры 300,000 MWCO PES.

Для оценки воспроизводимости фильтруемости Гци было взято 7 мембранных устройств с порами 300,000 MWCO PES. В опытах использовали один и тот же препарат плазмы крови с содержанием оГци 55 мкМ. В 7 параллельных опытах в ультрафильтратах было обнаружено в среднем 14,2 мкМ Гци, коэффициент вариации составил 7,75%.

Проведенные эксперименты позволили перейти к оценке фильтруемости Гци, содержащегося в препаратах плазмы крови исследуемых групп. Фильтруемость Гци была снижена у пациентов групп 1 и 2: $0,39 \pm 0,13$ и $0,28 \pm 0,06$ соответственно – в сравнении

с группой доноров $0,60 \pm 0,19$ ($p < 0,05$, критерий Манна-Уитни). Снижение фильтруемости Гци (понижение F) отражает повышение степени связывания Гци белками плазмы крови с молекулярной массой более 300 кДа.

В образцах пациентов на гемодиализе фильтруемость Гци, в отличие от Глт, была снижена в сравнении с референтной группой доноров, как в «свежих», так и в образцах после замораживания и оттаивания (табл. 2). Значимых различий в фильтруемости Глт в зависимости от вида применяемого диализирующего раствора не выявлено в отношении свежих образцов (табл. 2, столбцы 1 и 2), тогда как после замораживания с последующим оттаиванием фильтруемость Гци и Глт на фоне длительного лечения стандартным гемодиализом статистически достоверно снижается (табл. 2, столбцы 1 и 4). На фоне гемодиализа с сукцинат-содержащим раствором влияние замораживания с последующим оттаиванием не сказывается на фильтруемости Глт (табл. 2, столбцы 2 и 5).

В группе здоровых доноров 25-ый перцентиль F в отношении Гци составил 0,44. Это значение было принято в качестве нижней границы референтного интервала.

В образцах группы сравнения 2 пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями и высоким уровнем общего холестерина крови и С-реактивного белка в сочетании с ГЦ (15,6-18,5 мкМ) обнаружены значительно пониженные значения F Гци, каждое из которых не достигало уровня референтной границы 0,44 (рис.). В группе 1 пациентов на гемодиализе также наблюдалось значительное снижение фильтруе-

Таблица 2

Влияние замораживания образца на фильтруемость (F) гомоцистеина и глутатиона через мембраны Vivaspin 300,000 MWCO PES

Показатели	«Свежие» образцы			Образцы, хранившиеся при -80°C		
	1	2	3	4	5	6
	Стандартный гемодиализ $n=9$	Гемодиализ с применением Асолосукцината $n=14$	Доноры (из группы 3) $n=9$	Стандартный гемодиализ $n=9$	Гемодиализ с применением Асолосукцината $n=14$	Доноры (группа 3) $n=22^a$
оГци, мкМ	25,6 [#] (16,4 – 36,3)	32,8 [#] (23,3 – 36,2)	6,9 (6,0 – 8,1)	24,8 [#] (16,1 – 35,9)	30,8 ^{*#} (21,8 – 34,2)	6,9 (6,1 – 8,8)
Коэффициент фильтрации F для Гци	0,45 [#] (0,37 – 0,52)	0,40 [#] (0,35 – 0,48)	0,81 (0,77 – 0,84)	0,33 ^{*#&} (0,31 – 0,35)	0,39 [#] (0,35 – 0,43)	0,62 (0,44 – 0,79)
Глт, мкМ	7,5 [#] (7,3 – 8,6)	8,8 [#] (7,7 – 11,5)	6,0 (4,7 – 7,4)	7,2 [#] (6,9 – 8,4)	8,1 [#] (7,1 – 10,8)	5,5 (4,4 – 7,3)
Коэффициент фильтрации F для Глт	0,85 (0,78 – 0,97)	0,81 (0,75 – 0,87)	0,83 (0,75 – 0,88)	0,76 ^{*#} (0,62 – 0,82)	0,78 (0,73 – 0,85)	0,81 (0,75 – 0,86)

Примечания: Глт – глутатион; Гци – гомоцистеин; оГци – общий гомоцистеин; данные представлены как Me (Q1-Q3).

^a $n=9$ в парном тесте Вилкоксона для сравнения со свежими образцами;

^{*} – $p < 0,05$ в сравнении с соответствующим свежим образцом (тест Вилкоксона);

[#] – $p < 0,05$ в сравнении с показателями доноров (тест Манна-Уитни для независимых выборок);

[&] – $p < 0,05$ в сравнении с группой пациентов на гемодиализе с сукцинат-содержащим буфером (тест Манна-Уитни).

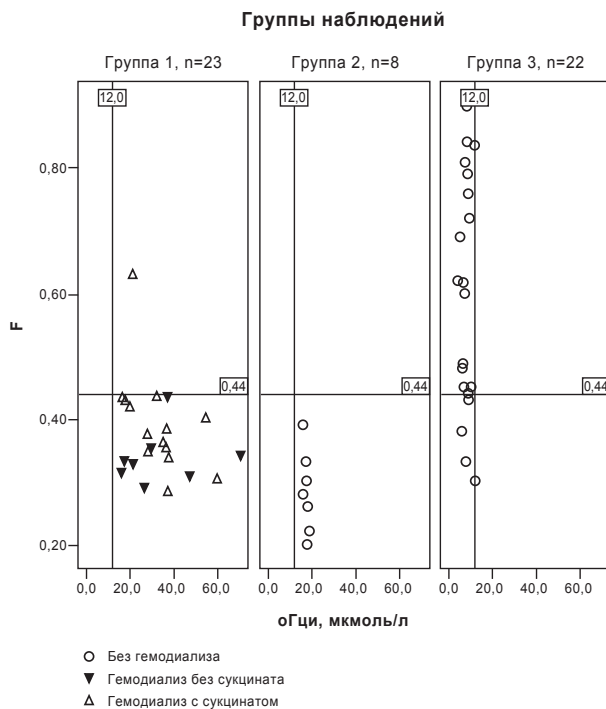


Рис. Диаграммы рассеяния фактора F в зависимости от уровня общего гомоцистеина

Примечание: oГци – общий гомоцистеин;
F – фактор фильтрации,

$F = \text{oГци в ультрафильтрате} / \text{oГци в препарате плазмы}$;
группа 1 – пациенты с терминальной стадией почечной недостаточности на гемодиализе;
группа 2 – пациенты с высоким уровнем холестерина и гипергомоцистеинемией;
группа 3 – здоровые доноры.

мости Гци (рис.). Как отмечено в таблице 2 (столбцы 4 и 5) фильтруемость Гци после замораживания уменьшается в большей степени после стандартного гемодиализа. Это может быть связано с меньшей по сравнению с гемодиализом с применением Асоло-сукцината устойчивостью структуры белков.

В состав диализирующих растворов могут быть включены субстраты митохондриального метаболизма (ацетат, сукцинат, цитрат и др.). В ряде работ показано повреждающее влияние процедуры гемодиализа на функцию митохондрий [13, 20]. В связи с этим представляет интерес изучение системных сдвигов маркеров функции митохондрий. С учетом направленности этих сдвигов при коррекции/нарушении функции митохондрий возможно судить о динамике органических изменений у пациентов на хроническом гемодиализе.

При сравнении с контрольной группой здоровых доноров (табл. 3, столбец 2) уровень МК в целом в первой группе был выше и составил 0,90 (0,63-1,05) мМ (критерий Манна-Уитни, $p=0,02$). При включении в ходе статистического анализа вида применяемого диализирующего раствора в качестве фактора (табл. 3, столбец 1) было обнаружено, что статистические различия в уровне МК в сравнении с контрольной группой остались лишь в отношении пациентов, получающих гемодиализ на диализирующем растворе без сукцината (табл. 3). Уровень ПВК и соотношение лактат/пируват между подгруппами пациентов и в сравнении с контрольной группой не различались. Надо отметить, что пациенты из обеих подгрупп не различались также и по другим лабораторным показателям – уровню oГци, креатинина, мочевины, общего холестерина, С-реактивного белка и общего белка. Таким образом, в данном исследовании МД выявлена по большим количествам МК. Это стало возможным благодаря соблюдению временного и температурного режимов преаналитической стадии, что наряду с данными о фильтруемости аминокислот позволило выявить преимущество сукцинат-содержащего раствора для гемодиализа (табл. 3). Однако требуются исследования с использованием дополнительных маркеров МД, менее чувствительных к температурным и временным факторам подготовки образцов плазмы крови к аналитической стадии исследования.

Корреляционный анализ в отношении данных группы пациентов на гемодиализе без применения сукцината выявил положительную статистическую связь между соотношением МК/ПВК и концентрациями oГци, креатинина и мочевины до диализа ($r=0,63, 0,62$ и $0,58$ соответственно; критерий Спирмена, $p<0,05$), в то время как у пациентов на гемодиализе с сукцинат-содержащим диализирующим раствором данные взаимосвязи не обнаружены. Следует отметить, что повышенные соотношения МК/ПВК характерно для МД,

Таблица 3

Показатели митохондриальной дисфункции у пациентов на хроническом гемодиализе

Группа	1		2
	Пациенты на бикарбонатном гемодиализе		Контрольная группа доноров, n=22
	Сукцинат-содержащий раствор, n=14	Стандартный (ацетат-содержащий) раствор, n=9	
Молочная кислота, мМ	0,83 (0,63-1,08)	0,93* (0,85-1,05)	0,62 (0,50-0,75)
Пировиноградная кислота, мкМ	53,8 (38,7-63,4)	55,6 (41,1-73,7)	51,5 (30,9-78,5)
Соотношение лактат/пируват	20 (12-23)	17 (13-21)	14 (8-24)

Примечание: данные представлены как Me (Q1-Q3);

* – статистически значимое различие при сравнении с контрольной группой, критерий Манна-Уитни, $p<0,05$.

сопровождающейся нарушением работы дыхательной цепи [21].

Обсуждение результатов исследования

В образцах пациентов в сравнении со здоровыми донорами выявлено существенное снижение величины F ГЦи, но не Глт. Значения F группы доноров были использованы для выявления нижнего референтного уровня, характеризующего фильтруемость связанного белками плазмы ГЦи, у здоровых лиц. На рисунке эта граница отображена на высоте 0,44 (25-й перцентиль) по оси y , параллельно оси x . Высокая фильтруемость ($F > 0,44$) указывает на связывание ГЦи преимущественно с альбуминовой фракцией, а не с крупномолекулярными белками или комплексами белков, с размерами близкими и большими, чем у $\alpha 2M$ или апоВ. Механизм снижения фильтруемости ГЦи в группах пациентов до конца не ясен. В опытах с очищенными препаратами продемонстрирована способность $\alpha 2M$ связывать ГЦи [12]. По-видимому, при патологических состояниях, сопровождающихся активацией протеолитических систем, происходит увеличение доли ГЦи, транспортируемого в составе активированного $\alpha 2M$. Известно, что активированный $\alpha 2M$ быстро извлекается из кровотока макрофагами, экспрессирующими рецептор LRP (Lipoprotein-Related-Protein-receptor). Активированные макрофаги в большом количестве обнаруживаются при развитии атеросклероза в субэндотелиальном пространстве [5]. Показано, что апоВ (Mr=550 кДа) ЛПНП также может связывать ГЦи. Следует учитывать, что к рецепторам ЛПНП также имеет высокое сродство активированный $\alpha 2M$ [18, 22].

Важно отметить, что между уровнем оГЦи и значением F ГЦи не было найдено статистической связи ни в одной из исследованных групп. Фильтруемость ГЦи не у всех пациентов группы 1 была существенно ниже, чем в группе здоровых доноров. В работе А. Zinellu и соавт. также выявлена слабая связь между повышенным уровнем гомоцистеинилирования апоВ и концентрацией оГЦи у пациентов с хронической болезнью почек, но показано, что степень связывания ГЦи с данным белком зависела от степени почечной недостаточности [27]. Эти данные указывают на необходимость дальнейшего изучения диагностической значимости фактора фильтруемости ГЦи в оценке рисков при ГЦЦ.

При сравнении двух вариантов диализирующего раствора у пациентов группы 1 выявлены преимущества гемодиализа с сукцинат-содержащим раствором. При изучении влияния замораживания плазмы на фильтруемость аминотиолов в образцах пациентов на гемодиализе без сукцината выявлено снижение F ГЦи и Глт в сравнении со «свежей» плазмой. Возможно, ацетат в составе диализирующего раствора у пациентов данной подгруппы способствовал повышению агрегации белков и увели-

чивал их денатурацию в условиях замораживания/оттаивания, что привело к увеличению крупномолекулярной фракции белков после заморозки и, соответственно, снижению фильтруемости аминотиолов.

При оценке показателей МД уровень МК также оказался повышенным у пациентов на гемодиализе без добавления сукцината, в то время как в подгруппе с сукцинат-содержащим диализирующим раствором данный показатель статистически не отличался от уровня здоровых лиц. Также выявлена положительная корреляционная связь между показателем МД – соотношением МК/ПВК – и лабораторными маркерами тяжести уремии (креатинин, мочевины) в группе пациентов на гемодиализе без сукцината. Таким образом, на основании полученных данных можно сделать вывод, что введение сукцината в диализирующий раствор способствовало улучшению митохондриального метаболизма у обследованных пациентов.

Заключение

Цитотоксические эффекты ГЦи связаны с его способностью образовывать соединения с белками. У пациентов с хронической болезнью почек наблюдается значительное изменение транспорта ГЦи белками плазмы со сдвигом в сторону транспорта крупномолекулярными белками и белковыми комплексами с молекулярной массой выше 300 кДа. В данной работе продемонстрирована возможность изучения связывания ГЦи крупномолекулярной фракцией белков крови при помощи процедуры ультрафильтрации. Для оценки фильтруемости аминотиолов введен фактор фильтрации (F), представляющий собой соотношение концентрации аминотиола в ультрафильтрате к его общей концентрации в препарате плазмы крови. У пациентов на хроническом гемодиализе, имевших выраженную ГЦЦ, выявлено снижение F ГЦи. Механизм снижения фильтруемости ГЦи до конца не понятен, а также не ясно, какие именно белки из крупномолекулярной фракции преимущественно подвергаются гомоцистеинилированию. Возможно, высокий уровень F характеризует «менее опасную» ГЦЦ, тогда как отсутствие ГЦЦ при низких значениях F могут сопровождаться повышенной вероятностью удерживания ГЦи в клетках сосудистой стенки за счет рецепторного эндцитоза вместе с $\alpha 2M$ или апоВ. Также в работе продемонстрировано, что применение сукцинат-содержащего диализирующего раствора сопровождается улучшением показателей фильтруемости ГЦи и МД в сравнении с пациентами, получающими стандартный бикарбонатный гемодиализ.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

1. Голубев Р.В., Блашко Э.А., Доброфранов В.А. и др. Повышение уровня гомоцистеина и глутатиона плазмы крови у больных с почечной недостаточностью. Биомедицинская химия. 2005. 51(5): 549-551.
2. Доброфранов В.А., Жлоба А.А., Голубев Р.В. Гипергомоцистенемия и сердечно-сосудистые заболевания у больных на хроническом диализе. Нефрология. 2003. 7(1): 13-19.
3. Жлоба А.А. Диагностика, патогенез и интерпретация лабораторного исследования при гипергомоцистенемии. В кн.: Клиническая и экспериментальная кардиология / под ред. Е.В. Шляхто. СПб.: Академический медицинский центр, 2005. С. 198-208.
4. Жлоба А.А., Блашко Э.А., Шляхто Е.В. Связывание гомоцистеина высокомолекулярными белками α_2 -макроглобулином в плазме крови у пациентов с гипергомоцистенемией // Бюлл. научно-исслед. института кардиологии им. В.А. Дамазова. 2005. 1: 67.
5. Жлоба А.А., Ивановна С.Ю. Изучение свойств и выявление экспрессии рецептора активированного α_2 -макроглобулина человека. Клиническая лабораторная диагностика. 2002. 4: 7-11.
6. Жлоба А.А., Никитина В.В. Выявление и лечение гипергомоцистенемии: пособие для врачей. М.: Дружба народов, 2004. 40 с.
7. Жлоба А.А., Субботина Т.Ф. Оценка связывания гомоцистеина с фракцией белков плазмы, ассоциированных с ремоделированием сосудистой стенки. Артериальная гипертензия. 2013. 19(2): 184-188.
8. Смирнов А.В., Доброфранов В.А., Голубев Р.В. и др. Распространенность гипергомоцистенемии в зависимости от стадии хронической болезни почек. Нефрология. 2005. 9(2): 48-52.
9. Смирнов А.В., Доброфранов В.А., Жлоба А.А. и др. Новый способ коррекции гипергомоцистенемии у больных, получающих лечение хроническим гемодиализом. Нефрология. 2006. 10(3): 31-37.
10. Смирнов А.В., Нестерова О.Б., Суглобова Е.А. и др. Клинико-лабораторная оценка эффективности лечения больных с терминальной стадией почечной недостаточности с использованием хронического гемодиализа и ацидосукцината. Тер. арх. 2013. 85(1): 69-75.
11. Catanescu C.O., Barbato J.C., DiBello P.M. et al. Molecular targeting of α_2 -macroglobulin by homocysteine: stoichiometry and possible implications in inflammatory diseases. FASEB J. 2007. 21 (Meeting Abstract Supplement): 641-8.
12. Catanescu C.O., Willard B.B., Kinter M.T. et al. Structural modifications of homocysteinylation- α_2 -macroglobulin. FASEB J. 2008. 22 (Meeting Abstract Supplement): 1057-3.
13. Eleftheriadis T., Pissas G., Antoniadis G. et al. Damage-associated molecular patterns derived from mitochondria may contribute to the hemodialysis-associated inflammation. Int. Urol. Nephrol. 2014. 46(1): 107-112.
14. Fridman O., Fuchs A.G., Porcile R. et al. Paraoxonase: its multiple functions and pharmacological regulation. Arch. Cardiol. Mex. 2011. 81(3): 251-260.
15. Glushchenko A.V., Jacobsen D.W. Molecular Targeting of Proteins by L-Homocysteine: Mechanistic Implications for Vascular Disease. Antioxid. Redox. Signal. 2007. 9(11): 1883-1898.
16. Jakubowski H., Głowacki R. Chemical biology of homocysteine thiolactone and related metabolites. Adv. Clin. Chem. 2011. 55: 81-103.
17. Kazmierczak S.C. Pyruvic acid. In: Clinical chemistry: theory, analysis, and correlation, 3rd ed / eds. L.A. Kaplan, A.J. Pesce. St. Louis (MO): Mosby-Year Book Inc, 1996. P. 482-483.
18. Luoma J., Hiltunen T., Särkioja T. et al. Expression of α_2 -macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein and scavenger receptor in human atherosclerotic lesions. J. Clin. Invest. 1994. 93(5): 2014-2021.
19. Nesterova O.B., Suglobova E.D., Golubev R.V. et al. The first experience of hemodialysis with succinate-containing dialysis fluid: a cross-over study. Nephrol. Dial. Transplant. 2012. 27(2): ii213.
20. Raj D.S., Boivin M.A., Dominic E.A. et al. Haemodialysis induces mitochondrial dysfunction and apoptosis. Eur. J. Clin. Invest. 2007. 37(12): 971-977.
21. Rodenburg R.J.T. Biochemical diagnosis of mitochondrial disorders. J. Inher. Metab. Dis. 2011. 34(2): 283-292.
22. Schulz S., Birkenmeier G., Schagdarsurengin U. et al. Role of LDL receptor-related protein (LRP) in coronary atherosclerosis. Int. J. Cardiol. 2003. 92(2-3): 137-144.
23. Sengupta S., Chen H., Togawa T. et al. Albumin thiolate anion is an intermediate in the formation of albumin-S-S-homocysteine. J. Biol. Chem. 2001. 276(6): 30111-30117.
24. Ueland P.M., Mansoor M.A., Guttormsen A.B. et al. Reduced, oxidized and protein-bound forms of homocysteine and other amino thiols in plasma comprise the redox thiol status – A possible element of the extracellular antioxidant defense system. J. Nutr. 1996. 126(4): 1281S-1284S.
25. Zhloba A.A., Blashko E.L. Liquid chromatographic determination of total homocysteine in blood plasma with photometric detection. Journal of Chromatography B. 2004. 800(1-2): 275-280.
26. Zhloba A.A., Subbotina T.F. Homocysteinylation score of high-molecular weight plasma proteins. Amino Acids. 2014. 46(4): 893-899.
27. Zinellu A., Loriga G., Scanu B. et al. Increased Low-Density Lipoprotein S-Homocysteinylation in Chronic Kidney Disease. Am. J. Nephrol. 2010. 32(3): 242-248.
28. Zinellu A., Zinellu E., Sotgia S. et al. Factors affecting S-homocysteinylation of LDL apoprotein B. Clin. Chem. 2006. 52(11): 2054-2059.

Дата получения статьи: 24.11.2014

Дата принятия к печати: 01.04.2015