

УДК 615.9: 616.61

*Л.А. ДЕМИДЧИК*¹, В.В ЛИ¹, И.В. БЕЙНИКОВА¹, Д.А. КЛЮЕВ¹*

¹Карагандинский государственный медицинский университет, Караганда, Казахстан

ИССЛЕДОВАНИЕ КЛЕТОК КРОВИ У БОЛЬНЫХ С ЭКЗОГЕННЫМИ ТОКСИЧЕСКИМИ НЕФРОПАТИЯМИ

АННОТАЦИЯ

Основываясь на эпидемиологической картине отравлений этанолом, уксусной кислотой и лекарственными препаратами, изучение механизмов их влияния на организм является весьма актуальным. Наши знания о поражении почек и развитии нефропатии в данных случаях ограничены. Полагается, что одним из возможных механизмов развития осложнений при отравлениях является окислительный стресс, но маркеры окислительного стресса клеток крови при токсических нефропатиях мало изучены и практически не изучена окислительная модификация белков. Целью нашего исследования было изучить интенсивность окислительной модификации белков эритроцитов крови у пациентов с экзогенными токсическими нефропатиями. Исследовались эритроциты крови 18 пациентов с нефропатией вызванной острым отравлением уксусной кислотой, 30 больных с нефропатией, вызванной острым отравлением алкоголем, 20 пациентов с нефропатией, индуцированной психотропными средствами и 20 здоровых доноров. Интенсивность окислительной модификации белков эритроцитов оценивалась по содержанию карбонильных производных белков и мембранно-связанного гемоглобина (МСГ). Данные были получены спектрофотометрически. Во всех исследуемых нами группах пациентов с токсическими нефропатиями, независимо от иницирующего нефротоксина, мы наблюдали общий тренд: статистически значимое повышение содержания карбонильных производных белков эритроцитов и в разной степени снижение МСГ относительно значений контрольной группы. Единый тренд изменения содержания карбонильных производных белков эритроцитов для всех исследуемых нами видов экзогенных нефропатий обусловлен, по нашему мнению, общими точками приложения в действии данных нефротоксинов. А именно, в их общей способности дестабилизировать мембраны эритроцитов, провоцировать в той или иной степени гемолиз и окислительный стресс, за счет высвобождения гемоглобина. Снижение МСГ может служить компенсаторным механизмом, тем не менее, отражает гипознергетическое состояние эритроцитов, что в совокупности с окислительным стрессом, гемолизом части эритроцитов способствует снижению их газотранспортной функции и, несомненно, вносят вклад в развитие гипоксии тканей и прогрессирование поражения почек.

Ключевые слова: токсическая нефропатия, эритроциты, окисленно-модифицированные белки, мембранно-связанный гемоглобин, нефротоксины

«Токсическая нефропатия» используется как собирательный термин, обозначающий поражение клубочкового аппарата и ткани почек с нарушением ее детоксикационной и экскреторной функций вследствие повреждения экзогенными или эндогенными нефротоксинами. Главными представителями нефротоксинов экзогенного происхождения являются лекарственные средства, некачественный алкоголь и уксусная кислота. В структуре острых отравлений, отравления лекарственными препаратами составляют 44,73%, спиртами - 34,67%, прижигающими жидкостями - 6,21% [1, 2]. Из отчета по отделению токсикологии г. Алматы (в период с 2000 – по 2014 гг.): 80 % от общего количества умерших по причине острого экзогенного отравления приходится на острую алкогольную интоксикацию (ОАИ), на втором месте - в результате приёма прижигающих веществ (около 10%), главным образом отравления уксусной кислотой, на третьем месте - отравления медикаментами и наркотическими веществами - 3% и 5% [3]. Расстройство функции почек, вызванное

применением лекарственных средств, является частым нежелательным явлением. Тем не менее, наши знания о поражении почек в данном случае ограничены, что связано, прежде всего, с неполной оценкой сопутствующих факторов риска и недостаточностью долгосрочных исследований о влияниях препаратов на почки [4]. Основываясь на эпидемиологической картине отравлений этанолом, уксусной кислотой и лекарственными препаратами, изучение механизмов их влияния на организм является весьма актуальным.

Почка является основной точкой приложения нефротоксинов, поскольку представляет собой основную систему контроля и поддержания гомеостаза. По оценкам, нефропатия, обусловленная воздействием лекарственных средств, составляет 19-25% всех случаев острой почечной недостаточности (ОПН) [5]. ОПН является одним из поздних осложнений, приводящих к летальному исходу при отравлении уксусной кислотой. Считается, что ОПН, в данном случае, развивается вследствие некупируемого гемоглобинурийного нефроза [6]. Неблагоприят-

* lusenok2008@mail.ru

ные исходы ОПН не исчерпываются лишь высокой смертностью. Факт перенесения ОПН определяет не только плохой прогноз, но и связан с существенными дополнительными расходами на госпитальное лечение, также больших материальных затрат требует оказание квалифицированной медицинской помощи. Неоспорим факт развития ОПН на фоне ОАИ. Тем не менее, молекулярные механизмы повреждения почек в данных случаях по-прежнему плохо изучены. Считается, что одним из возможных механизмов повреждения является окислительный стресс. Однако маркеры окислительного стресса клеток крови при токсических нефропатиях мало изучены. Следует отметить, что практически не изучен такой важный аспект окислительного стресса как окислительная модификация белков при экзогенных токсических нефропатиях, вызванных как отравлениями алкоголем, так и отравлениями лекарственными средствами или уксусной кислотой. В настоящее время идентифицирован целый ряд биомаркеров для диагностики острого повреждения почек [7], хотя некоторые из них не обладают абсолютной специфичностью и чувствительностью. Для эффективной профилактики токсических нефропатий необходимо открытие новых биомаркеров, которые могут диагностировать повреждение почек раньше и точнее [4].

Цель. Изучить интенсивность окислительной модификации белков эритроцитов крови у пациентов с экзогенными токсическими нефропатиями.

Материалы и методы. Исследование проводилось на базе лаборатории кафедры биохимии совместно с токсикологическим отделением Областного медицинского центра, где осуществлялась диагностика, подбор пациентов и забор крови. Верификация диагноза базировалась на истории болезни и результатах объективного обследования. Диагностика отравлений этанолом и определение степени тяжести интоксикации проводилась на основе протокола «Токсическое действие алкоголя (взрослые и дети)», а отравлений уксусной кислотой - на основании протокола диагностики «Токсическое действие разъедающих веществ (взрослые и дети)», рекомендованных Экспертным советом Министерства здравоохранения и социального развития Республики Казахстан от 30 октября 2015 г. Токсическое поражение почек устанавливали на основании комплексной оценки основных клинических и лабораторных показателей функционального состояния почек. Основными клиническими и лабораторными признаками нефропатии считались снижение суточного диуреза, появление мочевого синдрома с протеинурией, гематурией, лейкоцитурией, повышенные креатинина и мочевины крови, электролитные

сдвиги, снижение скорости клубочковой фильтрации. До начала исследования было получено информированное согласие от больных и здоровых лиц для участия в исследовании и само исследование было одобрено Комитетом по этике. Обследуемые получили полную информацию о возможных осложнениях взятия образцов крови, прежде согласия на участие. Исследовались эритроциты крови 18 пациентов с нефропатией вызванной острым отравлением уксусной кислотой (1 группа), 30 больных нефропатией, вызванной острым отравлением алкоголем (2 группа), 20 пациентов с нефропатией, индуцированной психотропными средствами (3 группа) и 20 здоровых доноров (контрольная группа). Возраст участников исследования - от 20 до 50 лет. Во всех исследуемых группах преобладали мужчины. В исследовании учитывалось также влияние степени тяжести отравления алкоголем (средняя степень, $n=18$; тяжелая степень, $n=12$). Критериями исключения пациентов из исследования были острые или хронические пиелонефриты инфекционной этиологии, острые или хронические гломерулонефриты, нефропатия беременных, а также возраст обследуемых моложе 18 или старше 50 лет. Забор крови осуществлялся рано утром, в качестве антикоагулянта использовали гепарин. Плазму отделяли от эритроцитов центрифугированием. Все анализы крови проводились в течение двух часов после её сбора. Интенсивность окислительной модификации белков эритроцитов оценивалась по содержанию окисленно-модифицированных белков: карбонильных производных (КП) белков и мембранно-связанного гемоглобина (МСГ). Уровень КП белков определяли по методу, предложенному Levine R. L. [8] с использованием динитрофенилгидразина, а содержание МСГ определяли по методу Токтамысовой З.С. и Биржановой Н.Х. [9]. Все данные были получены спектрофотометрически. Биохимические измерения осуществлялись на спектрофотометре PD-303UV A PEL (Япония). Различия в исследуемых группах оценивали с помощью рангового дисперсионного анализа Краскела-Уоллиса и считали достоверными при уровне статистической значимости $p < 0,05$.

Результаты. При исследовании содержания МСГ эритроцитов в исследуемых группах (Таблица 1), мы выявили значительное снижение его уровня ($p=0,002$) в 1 группе, а также тенденцию к снижению уровня МСГ (на 19%) во 2 группе относительно значений контрольной группы, однако без статистически значимого влияния степени тяжести отравления алкоголем. В 3 группе уровень МСГ статистически значимо не отличался от контроля, тем не менее,

можно отметить его некоторое снижение. Статистически значимых отличий по уровню МСГ между пациентами 1, 2 и 3 групп, по нашим данным, не выявлено. Однако и в контрольной группе уровень МСГ был подвержен существенным колебаниям и имел широкий диапазон размаха значений. Мы наблюда-

ли, что в физиологических условиях уровень МСГ зависит от ряда факторов. В частности, у людей, занимающихся спортом этот показатель выше, чем у тех, кто ведет более пассивный образ жизни. Наличие анемии в анамнезе и приверженность к курению также влияли на значения МСГ.

Таблица 1. Данные описательной статистики по уровню МСГ эритроцитов в исследуемых группах

Показатель	Группы			
	Контроль (n=20)	Нефропатия, вызванная острым отравлением уксусной кислотой (n=18) (1 группа)	Нефропатия, вызванная острым отравлением алкоголем (n=30) (2 группа)	Нефропатия, индуцированная психотропными средствами (n=20) (3 группа)
Медиана	9,3	6,40*	7,51	7,98
Нижний квартиль	6,93	5,55*	6,08	6,51
Верхний квартиль	10,93	7,76*	8,06	9,69

Примечание: * - достоверность отличий от контрольной группы, $p=0,002$.

Во всех исследуемых нами группах пациентов с нефропатией, независимо от инициирующего нефротоксина, мы наблюдали общий тренд в изменении содержания другого типа окисленно-модифицированных белков эритроцитов – КП (Таблица 2). В группе пациентов с нефропатией, вызванной острым отравлением уксусной кислотой было выявлено повышение уровня КП ($p<0,001$) белков эритроцитов относительно значений контрольной группы. Подобные статистически значимые изменения были выявлены и в двух других группах: в группе пациентов с нефропатией, вызванной острым отравлением алкоголем - повышение уровня КП в 2 раза относительно

контроля ($p=0,005$), в группе пациентов с нефропатией, индуцированной психотропными средствами - повышение уровня КП в 1,8 раз относительно контроля ($p=0,035$). Статистически значимых отличий по содержанию КП эритроцитов между пациентами 1, 2 и 3 групп не выявлено. Обнаруженные изменения в содержании окисленно-модифицированных белков эритроцитов в группе с нефропатией, вызванной острым отравлением уксусной кислотой мы наблюдали и ранее [10], тогда мы установили, что содержание КП в эритроцитах зависит от степени тяжести отравления, и было максимальным при присоединении нефропатии.

Таблица 1. Данные описательной статистики по содержанию КП эритроцитов в исследуемых группах

Показатель	Группы			
	Контроль (n=20)	Нефропатия, вызванная острым отравлением уксусной кислотой (n=18) (1 группа)	Нефропатия, вызванная острым отравлением алкоголем (n=30) (2 группа)	Нефропатия, индуцированная психотропными средствами (n=20) (3 группа)
Медиана	9,42	18,65*	18,18*	16,53*
Нижний квартиль	8,01	15,55*	14,94*	12,48*
Верхний квартиль	10,47	21,65*	21,65*	18,71*

Примечание: * - достоверность отличий от контрольной группы, $p < 0,035$.

Наши результаты выявили разнонаправленные изменения в содержании окисленно-модифицированных белков эритроцитов. Мы наблюдали общий тренд для всех пациентов с нефропатией: статистически значимое повышение уровня КП при тенденции к снижению МСГ в эритроцитах.

Тяжесть острого отравления алкоголем определяется мембранотропным действием этилового спирта, эффектами токсичных продуктов, образующихся в процессе метаболизма этанола, развитием ацидоза, а также влиянием «неэтанольного» компонента. Помимо прямого мембранотоксического действия этанола

* lusenok2008@mail.ru

[11] и уксусной кислоты на мембраны эритроцитов, общим для данных видов отравлений является развитие ацидоза, который также способствует «разрыхлению» клеточных мембран и повышению их проницаемости, что, в конечном итоге, приводит к гемолизу эритроцитов и развитию гипоксемии. Кроме того, согласно данным литературы, интенсивность проницаемости мембран эритроцитов имеет тесную корреляционную зависимость с ростом тяжести эндогенной интоксикации. Также известна способность ряда психотропных средств, особенно при их комбинации с другими препаратами, вызывать ацидоз. Уникальность гемолиза эритроцитов обусловлена дальнейшим метаболизмом высвободившегося свободного гемоглобина и его катаболизм до ионов Fe^{2+} , способных потенцировать процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) мембран, как собственно эритроцитов, так и других клеток крови и не только. Таким образом, повышение уровня КП белков эритроцитов у пациентов с токсической нефропатией, на наш взгляд, отражает структурное повреждение эритроцитарных мембран, являясь следствием активации ПОЛ, а единый тренд изменения КП белков эритроцитов для всех исследуемых нами видов экзогенных нефропатий обусловлен, по нашему мнению, общими точками приложения данных нефротоксинов. В условиях активации ПОЛ снижаются энергетические ресурсы красных клеток крови, еще не подвергшихся гемолизу, либо компенса-

торно высвободившихся из костного мозга. На наш взгляд, тенденция к уменьшению уровня МСГ отражает гипознергетическое состояние эритроцитов, что, в совокупности с активацией ПОЛ, гемолизом части эритроцитов способствуют снижению их газотранспортной функции и, несомненно, вносят вклад в развитие гипоксии тканей и прогрессированию поражения почек. Одновременно с этим организм лишается переносчика кислорода, что усугубляет тканевую гипоксию и способствует развитию ацидоза с накоплением лактата, и снова порочный круг замыкается, провоцируя новую волну гемолиза. Эта ситуация особенно характерна, на наш взгляд, для отравлений уксусной кислотой. С другой стороны, считается, что МСГ может стать дополнительным источником свободных радикалов в патологии [12] и усугубить структурно-функциональное состояние липидного бислоя мембран. В данном аспекте снижение МСГ может носить и компенсаторный механизм, повышающий стабильность эритроцитарных мембран при острых отравлениях алкоголем, уксусной кислотой или лекарственными препаратами. Данные последних лет показывают, что МСГ имеет множество биологических функций, в числе которых регуляция метаболизма глюкозы и свойств цитоскелета в зависимости от концентрации кислорода, формирование сигнала об окислительном повреждении эритроцита, а также участие в сигнальном пути гипоксической вазодилатации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лужников Е.А., Суходолова Г.Н. Клиническая токсикология // М., Медицинское информационное агенство, 2008. – 576 с.
2. Краева Ю.В., Брусин К.М., Кондрашов Д.Л., Сенцов В.Г., Ховда К.Е. Исследование структуры острых отравлений на догоспитальном и госпитальном этапах // *Фундаментальные исследования*. – 2013., Т. 14. – С. 750-761.
3. Тойбаева М., Джаркимбекова Г.К., Ахметова Ф.У., Камалова Г.Т. Отчёты отделения токсикологии с 1999 по 2012 гг. // Алматы, 2012. – 234 с.
4. Awdishu L., Mehta R.L. The 6R's of drug induced nephrotoxicity//*BMC Nephrol*. - 2017 Apr 3; 18(1). – P. 124. doi: 10.1186/s12882-017-0536-3.
5. Mehta R.L., Pascual M.T., Soroko S., Savage B.R., Himmelfarb J., Ikizler T.A., Paganini E.P., Chertow G.M. Spectrum of acute renal failure in the intensive care unit: the PICARD experience// *Kidney Int*. - 2004, Oct; 66(4) - P.1613-21.
6. Лужников Е.А. Медицинская токсикология: национальное руководство. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012. – 85 с.
7. Vishal S. Vaidya, Michael A. Ferguson, and Joseph V. Bonventre. Biomarkers of Acute Kidney Injury// *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. - 2008, 48 - P.463–493.
8. Levine R.L., Garland D., Oliver C.N. (1990) Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins// *Method Enzymol*.- 1990,186. – P. 464-478.
9. Toktamysova Z., Birzhanova N. (1990) About the membrane-bound hemoglobin. *Biophysics*; 35: 1019-1020.
10. Демидчик Л.А., Бейникова И.В., Муравлёва Л.Е., Молотов-Лучанский В.Б., Бакирова Р.Е., Клюев Д.А., Утибаева Р.А. Окисленные белки в крови больных с острым отравлением уксусной кислотой // *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. – 2018. – № 5-1. – С. 82-86;

11. А.А. Белов. Токсическое действие алкоголя на кровь. Эритроциты и алкоголь // Вестник АГИУВ. - 2013, №4. - С. 75-78.

12. Созарукова М.М., Владимиров Г.К., Измайлов Д.Ю. Мембранно-связанный гемоглобин эритроцитов как возможный источник свободных радикалов / Science and Practice: new Discoveries. — Чехия, Карловы Вары-Москва. - 2015.

ТҮЙІНДІ

Этанолмен, сірке қышқылымен және дәрілік препараттармен уланудың эпидемиологиялық сипатына негізделе отырып, олардың ағзаға әсер ету механизмдерін зерттеу өте өзектілігі болып табылады. Бүйректің зақымдануы және нефропатияның дамуы туралы біздің біліміміз осы жағдайларда шектеулі. Улану кезіндегі асқинулардың дамуының мүмкін механизмдерінің бірі тотығу стресс болып табылады. Алайда, уытты нефропатиялар кезінде қан жасушаларының тотығу стресс маркерлері аз зерттелген және ақуыздардың тотығу модификациясы сияқты тотығу стресстің маңызды аспектісі зерттелген жоқ. Біздің Зерттеудің мақсаты экзогенді уытты нефропатиясы бар емделушілерде қан эритроциттері белоктарының тотығу модификациясының қарқындылығын зерттеу болды.

Сірке қышқылымен жіті уланудан туындаған нефропатиясы бар 18 пациент, алкогольмен жіті уланудан туындаған нефропатиясы бар 30 науқас, нефропатиясы бар 20 пациент, индукцияланған психотроптық заттар бар 20 пациент және 20 сау донор қан эритроциттері зерттелді. Эритроциттер белоктарының тотығу модификациясының қарқындылығы ақуыздардың карбонильді туындылары мен мембраналық-байланысқан гемоглобиннің (МБГ) құрамы бойынша бағаланды. Деректер спектрофотометриялық алынды. Біз зерттеген токсикалық нефропатиясы бар пациенттердің барлық топтарында, бастамашы нефротоксиге қарамастан, біз жалпы тренді байқадық: эритроциттер ақуыздарының карбонильді туындылары құрамының статистикалық маңызды артуы және бақылау тобының мәндеріне қатысты МБГ-ның әртүрлі дәрежеде төмендеуі. Біз зерттейтін экзогенді нефропатиялардың барлық түрлері үшін эритроциттер ақуыздарының карбонильді туындылары құрамының өзгеруінің бірыңғай тренді біздің ойымызша, осы нефротоксиндердің іс-қимылындағы қосымшаның жалпы нүктелерімен шартталған. Атап айтқанда, эритроциттер мембраналары тұрақтандыруға, гемоглобинді босату есебінен қандай да бір дәрежеде гемолизді және тотығу стрессті тудыруға олардың жалпы қабілетілігінде. МСГ төмендеуі компенсаторлық механизм бола алады, дегенмен эритроциттердің гипознергетикалық жағдайын көрсетеді, бұл тотығу стрессімен, эритроциттер бөлігінің гемолизімен бірге олардың газ тасымалдау қызметінің төмендеуіне ықпал етеді және олардың, ұлпалардың гипоксиясының дамуына және бүйректің зақымдануының үдеуіне әсер етеді.

Кілт сөздер: улы нефропатия, қызыл қан клеткалары, тотықтырылған модификацияланған протеиндер, мембраналық гемоглобины, нефротоксикалық

SUMMARY

Based on the epidemiological picture of ethanol, acetic acid and drug poisoning, the study of the mechanisms of their influence on the body is very relevant. Our knowledge of kidney damage and the development of nephropathy in these cases is limited. It is believed that one of the possible mechanisms for the development of complications in cases of poisoning is oxidative stress. However, markers of oxidative stress in blood cells in toxic nephropathies have been little studied and such an important aspect of oxidative stress as oxidative modification of proteins has not been studied. The aim of our study was to study the intensity of the oxidative modification of red blood cell proteins in patients with exogenous toxic nephropathy. Erythrocytes of the blood were studied in 18 patients with nephropathy caused by acute poisoning with acetic acid, 30 patients with nephropathy caused by acute alcohol poisoning, 20 patients with nephropathy induced by psychotropic drugs and 20 healthy donors. The intensity of the oxidative modification of erythrocyte proteins was estimated by the content of carbonyl derivatives of proteins and membrane-bound hemoglobin (MSH). The data were obtained spectrophotometrically. In all the groups of patients with toxic nephropathies that we studied, regardless of the initiating nephrotoxin, we observed a general trend: a statistically significant increase in the content of carbonyl derivatives of erythrocyte proteins and in different degrees a decrease in MSH relative to the values of the control group. The single trend of changes in the content of carbonyl derivatives of erythrocyte proteins for all the types of exogenous nephropathy we studied is due, in our opinion, to the common points of application of these nephrotoxins in action. Namely, in their general ability to destabilize erythrocyte membranes, to provoke to some extent hemolysis and oxidative stress, due to the release of hemoglobin. Reduced MSH can serve as a compensatory mechanism, however, reflects the hypoenery state of red blood cells, which, together with oxidative stress, hemolysis of some red blood cells, reduces their gas transport function and undoubtedly contributes to the development of tissue hypoxia and progression of kidney damage.

Keywords: a toxic nephropathy, erythrocytes, the oxygenated -modified proteins, the membrane and connected hemoglobin, nefrotoksin.