

Оксидативен стрес – отключващ и регулиращ механизъм в патогенезата на гломерулонефрита

П. Пенева; Д. Паскалев; В. Икономов

Клиника по нефрология и диализа

Университетска болница „Света Марина” - Варна

Резюме:

Повишеният оксидативен стрес е ключов момент в прогресията на бъбречните болести. Смята се, че свободните кислородни форми са важни интрацелуларни молекули в патоген-активирани процеси, имащи отношение към патогенезата на гломерулонефритите.

Дисрегулацията в оксидантните и антиоксидантни ензими при различните типове гломерулонефрити водят до повишени нива на гломерулните свободни радикали. Детайлното познаване на този механизъм може да доведе до нови терапевтични подходи.

По-нататъшни клинични проучвания с антиоксиданти ще покажат препоръки базирани на доказателствата за лечението на гломерулонефритите.

Ключови думи: оксидативен стрес; свободни кислородни форми; антиоксиданти

Адрес за кореспонденция:

Доц. д-р В. Икономов, д.м., Клиника по нефрология
и диализа

УМБАЛ „Св. Марина”, бул. „Хр. Смирненски” 1, Варна 9010

Тел/Факс: 052 / 302951, E-mail: r.radeva@yahoo.com

Oxidative stress – trigger and regulating mechanism in the pathogenesis of glomerulonephritis

P. Peneva; D. Paskalev; V. Ikonov

Clinic of Nephrology and Dialysis

University Hospital „St. Marina”- Varna

Summary:

Enhanced oxidative stress is involved in the progression of renal diseases.

Reactive oxygen species /ROS/ are increasingly believed to be important intracellular molecules in mitogenic pathways involved in the pathogenesis of glomerulonephritis.

Dysregulation of pro-oxidative and antioxidative enzymes in different types of glomerulonephritis, lead to a net increase in glomerular ROS level.

Detailed knowledge of such pathways may lead to new therapeutic approaches. Further well-designed clinical trials with antioxidants will establish evidence-based recommendations for the treatment of glomerulonephritis.

Key words: oxidative stress; reactive oxygen species; antioxidants

Address for correspondence:

Ass. Prof. V. Ikonov, Clinic of Nephrology and Dialysis

University Hospital „ St. Marina”, Bul. „Hristo Smirnenski” 1

Tel/Fax: 052 / 302951, E-mail: r.radeva@yahoo.com

Оксидативен стрес е състояние на дисбаланс между процесите на свободно радикално окисление и антиоксидантната система, с превес на първите.

Напоследък все повече се говори за свободните кислородни форми - ROS и за ролята им в патогенезата на гломерулонефритите. Ранната мезангиална пролиферация с последваща фиброза е отличителен белег на пролиферативните гломерулонефрити, която може да доведе до хронична бъбречна недостатъчност (ХБН). Свободните кислородни форми упражняват пряка увреда върху интегритета на гломерулните структури, като особено въздействие имат продуктите на липидната пероксидация. (1,2)

Липидите са най-предпочитаният обект за свободно-радикално увреждане, тъй като са най-лесно окисляеми. Липидната пероксидация е главният молекулен механизъм, чрез който се осъществява свободно-радикалната токсичност. Значимостта ѝ се определя както от нейната деструктивна същност, така и от жизнената важност на нейните мишени – биологичните мембрани.

Липидната пероксидация дава голямо разнообразие от токсични продукти – липидни радикали, синглетен кислород, хидроксилен радикал, липидни хидропероксиди, алдехиди, кетони, алкохоли и др. Тя уврежда всички липидни компоненти на клетките, променяйки техните нормални биологични функции. Повечето от нейните молекулни и радикални продукти активно взаимодействат и с други биомолекули. Пероксидационните промени в мембранните липиди водят до повишен мембранен пермеабилитет, нарушен пасивен и активен транспорт и променен йонен градиент, инхибиране на протеинния синтез, повлияване на възпалителния отговор и хемотаксисната активност. Някои мембранносвързани ензими се инактивират, а други се активират, което води до метаболитен дисбаланс и намалена мембранна флуидност. Фрагментацията на мастнокиселинни вериги във фосфолипидните молекули и увреждането на протеини води до нарушен мембранен интегритет и до клетъчен лизис.

Засягането на лизозомите от оксидативния стрес предизвиква освобождаване на хидролитични ензими в цитозола.

Митохондриите могат да бъдат и самостоятелен източник на радикали, което при някои условия допълнително потенцира ефектите на липидната пероксидация.

За откриване на нейните продукти се използват спектрофотометрични, флуоресцентни и хроматографски методи, които могат да изследват нивото на конюгирани диени, концентрацията на липидни хидропероксиди, количеството на издишан етан и пентан и др.

Най-често като показател за протичане на пероксидацията се използва образуването на малондиалдехид (MDA - определя се спектрофотометрично при реакцията му с тиобарбитуровата киселина – ТВА и по-точно се определя TBARM - ТВА – реагиращ материал, тъй като подобна цветна реакция може да се получи и с други съединения (1).

Обект на радикално увреждане са и нуклеиновите киселини - чрез хидроксилиране на бази, деполимеризация и фрагментация на ДНК . Най-чувствителни са тиамин и цитозин, а по-слабо аденин, гуанин и дезоксирибоза. Свободните кислородни форми могат да засегнат ДНК - репаративните ензими, което води до дефекти в генетичния апарат, мутации, клетъчна смърт, отключване на канцерогенеза. Маркер за оксидативно променената ДНК е 8-ОН деоксигуанозин /оксидативно модифициран гуанин (1).

Аминокиселините също попадат под прицела на оксидативния стрес, като това води до тяхната агрегация, фрагментация на полипептидните вериги, податливост към протеолитично разрушаване. (1)

Кои са интрацелуларните медиатори, които трансформират сигналите от екстрацелуларното пространство и водят до отключване на патогенезата на гломерулонефрита? Каква е патогенетичната роля на ROS?

Точната представа за този механизъм е важно да бъде разкрита, защото това би позволило забавяне прогресията на бъбречната недостатъчност или предпазване от нея.

ROS могат да бъдат интрацелуларни сигнални молекули – с индиректен ефект - като митогенен стимул, причинявайки активация на ERK (митоген активирана протеин киназа – от семейството на серин-треонин киназите) с последваща мезангиална пролиферация, трансформация

с продукция на TGF β_1 (трансформиращ растежен фактор β_1 , определящи клиничната картина на гломерулонефрита. Пролиферацията може да бъде стимулирана и от растежни фактори (GF), цитокини, активиране на комплемента, ЦИК (циркулиращи имунни комплекси).

Едно от съвременните обяснения за механизма на действие на свободните кислородни форми е, че могат да задвижат патогенезата на пролиферация, чрез активиране на ERK, която регулира експресията на гени, имащи отношение към растежа на клетките, главно чрез фосфорилация на транскрипционни фактори, включително c-мук, c-Jun, т.н. Stat proteins, NFIL6, ATF2, ETS1, ELK1.

Преносът на екстрацелуларни лиганди до G протеини или тирозин-киназа- свързани рецептори, водят до серия от протеин – протеин реакции, които активират фосфорилацията на ERK киназата - (MEK), която е специфичен активатор на ERK. Така активираната ERK се транслоцира до ядрото, където активира специфични транскрипционни фактори, водещи до клетъчна пролиферация и други ефекти, свързани с функциите на клетката.

В пролиферацията на клетки главни координатори са растежните фактори.

В едно от проучванията е проследена ролята на антиоксидантите върху активирането на ERK и тежестта на гломерулните увреждания. Мезангиална пролиферация у клетъчни култури от плъх е била стимулирана с ERF (епидермален растежен фактор), bFGF (фибробластен растежен фактор), PDGF (тромбоцитен растежен фактор) и тромбин, където е наблюдавано повишаване на фосфорилацията на ERK съответно с 350%, 250%, 150% и 450 %. В присъствието на антиоксиданти обаче - α -липоева киселина – 250 μ M и NAC (N ацетил-L цистеин) в доза 30 mM, тя намалява до 50% – 60 % за всеки тестван растежен фактор. Самостоятелно α -липоевата киселина в доза 100 μ M понижава умерено фосфорилацията на ERK до 20% - 30%. Растежните фактори нямат ефект върху тоталната ERK и нито α -липоевата киселина, нито NAC използвани самостоятелно, водят до сигнификантно намаляване ERK фосфорилацията. Тези факти демонстрират способността на два различни по своя химичен състав антиоксиданта сигнификантно да понижават индуцираната от РФ ERK фосфорилация в култура от мезангиални клетки, а това предполага, че тя е частично медирана и от ROS (2).

В ранните фази на гломерулонефрита, свободните кислородни форми се генерират основно от неутрофили, моноцити, а по-късно и от подоцити, ендотелни и мезангиални клетки (3, 4, 5).

Целта на настоящето изложение е да се привлече вниманието върху ROS в патогенезата на гломерулонефрита, които са първичните основни медиатори, отговорни за промените, свързани с мембранният пермеабилитет и протеинурията, морфологичните лезии и нарушенията в гломерулната хемодинамика, както и някои насоки в лечението на тези отклонения - част от тях дори още в етап на проучване.

Участието на оксидативния стрес е проучено чрез регистриране на продуктите на липидна пероксидация в бъбречни тъкани или урина и чрез приложение на антиоксиданти, предпазващи от тези нарушения (6, 7).

При тежките гломерулонефрити са характерни някои хемодинамични нарушения: спазъм на еферентните артериоли, повишено интрагломерулно налягане, намален бъбречен и перитубулокапилярен плазмоток. Овладеяването на хемодинамичните нарушения и намаляването на оксидативния стрес предпазват от по-бърза прогресия на хроничните гломерулонефрити (8, 9).

Проучване след тринадесет месечно лечение с медикаменти от групите: ARB (ангиотензин II рецепторен блокер), ACE инхибитор и калциев блокер, показва подобряване на креатининовия клирънс и корекция на хемодинамичните нарушения, постигнати на фона на високи дози витамини А и Е (8, 10, 11).

Някои автори съобщават за ефекта на Ramipril в дози 2,5-5мг/ден, намаляващ оксидативния стрес, чрез изследване на MDA, AGEs (крайни гликирани продукти) и AOPPs (крайни продукти на оксидирани протеини). Като резултат на това те отчитат понижаване на артериалното налягане и редукция на протеинурията (12).

Установено е също, че ангиотензин II рецепторните блокери (Losartan 50 мг (ден) намаляват сигнификантно нивата на MDA, оксидирания албумин и моноцитния хемотаксисен протеин-1 (MCP-1) в урината, докато в плазмата MDA и нивото на оксидирания протеин не се

променят. Тази връзка между промяната на уринния MCP-1 и намаления оксидативен стрес подкрепя ролята на последния в бъбреците по отношение на фиброзата и прогресивната бъбречна увреда. (13)

Пододитната увреда е сигурен механизъм в патогенезата на протеинурията. Простагландин E₂ (PG E₂) е с протектиращ ефект върху тези клетки. Индуцирайки генната му експресия у подоцити, чрез клон наречен Stra 13, напоследък описван като индуциран от ретиноевата киселина ген, се постига повишен синтез на Stra 13 mRNA и протеинна експресия у подоцити. Клетките с експресиран Stra 13 имат понижена NADPH-зависим супероксид анион генерация. Освен това е повишена експресията на хемоксигеназа-1 (HO-1), която играе главна роля в защитата от свободните кислородни форми. След стимулация на тези подоцити с ROS, те са по резистентни на оксидативния стрес в сравнение с тези от контролната група (14).

Проучени са оксидантните и антиоксидантните системи при експериментален мезангиопролиферативен гломерулонефрит, като през цялото време са регистрирани повишени нива на свободните кислородни форми и конкретно на супероксидни аниони и хидроген пероксид. Активността на NADH зависимите и NADPH зависимите оксидационни системи също е била повишена, докато активността на ксантиноксидазата е била в нормални граници. Въпреки повишения оксидативен стрес в гломерулите, не е регистрирана повишена антиоксидантна активност. От друга страна каталазата (CAT), супероксиддисмутазата (SOD) и глутатионпероксидазата (GPX) дори са били понижени. В същото време не са регистрирани увеличени нива на свободните кислородни форми в тубулоинтерстициалното пространство. (15, 16, 17)

Много съобщения има и за участието на оксидативния стрес, конкретно при IgA гломерулонефритите. У пациенти с IgA гломерулонефрит са регистрирани повишени нива на азотен окис (NO) в плазмата и липопероксид (LPO) в плазмата и еритроцитите. В същото време са понижени нивата на витамини С, Е и β-каротен в плазмата и супероксиддисмутазата, каталазата и глутатион пероксидазата в еритроцитите. Установено е също, че с нарастване нивата на NO и LPO и понижаване нивата на витамини С, Е, А в плазмата и SOD, CAT и GPX в еритроцитите, се повишава степента на хистологичните промени в интерстициума. Промените се задълбочават пропорционално с продължителността на болестта. Ето защо приложението на подходящи дози антиоксиданти могат да бъдат обмислени за намаляване на оксидативния стрес, съответно ограничаване на морфологичните промени. (10, 11, 16, 17)

Освен антиоксиданти, безспорно групата на Ангиотензин II рецепторните инхибитори е доказала своето място в лечението на всички типове гломерулонефрити.

При изследване на група пациенти с IgA гломерулонефрит е установено, че интратеналната реактивност на хемоксигеназа-1 и ангиотензиноген са сигнификантно повишени. Въпреки това, тези пациенти не показват значителни морфологични увреди, но тези факти предполагат активирана интратенално повишено образуване на свободните кислородни форми, като ангиотензиногена играе роля в развитието на гломерулонефрита в ранните стадии и това е в подкрепа на тезата за ефективността от блокиране на ренин-ангиотензин системата. Известно е, че протеинурията - над 1 г/ден, хипертонията и AOPP /крайни продукти на оксидирани протеини/ са важни прогностични фактори по отношение прогресията на заболяването. Ангиотензин II рецепторните инхибитори забавят прогресията, но повишеният оксидативен стрес предполага и включване на антиоксиданти, с определяне на AOPP-ниво в серум, като маркер за последващ ефект (13, 18, 19).

У експериментален модел на IgA гломерулонефрит са наблюдавани: повишен оксидативен стрес, чрез изследване нивата на MDA, свръхпроизводство на TRF β₁. При суплементация с високи дози витамин Е (α токоферол) - 250 IU/kg, се понижават нивата на бъбречния MDA и TRF β₁, както и тежестта на протеинурията, а с това и вторично се потиска гломерулната склероза. (6, 16, 20)

Друга група медикаменти, имащи отношение към оксидативния стрес са 3-ω-полиненаситените мастни киселини.

При IgA нефропатия е установено, че приложението на Омакор 4g/дневно (еквивалент на

1,88 g ейкозапентаенова киселина - EPA и 1,48 g докозахексаенова киселина - DHA) в продължение на 6 месеца понижава сигнификантно нивата на:

1. Триглицеридите
2. β_2 микроглобулина в урината
3. MDA в плазмата и крайните продукти на оксидативния стрес, а се

повишава нивото на:

1. HDL холестерола,

но няма отношение към:

1. стойностите на артериалното налягане,
2. гломерулната филтрация
3. серумния креатинин
4. протеинурията

Изследването показва, че 3- ω -полиненаситените мастни киселини могат да бъдат прилагани за подобряване на тубулната дисфункция, липидния статус и понижаване на оксидативния стрес, без да имат отношение към протеинната загуба и гломерулната филтрация. (2, 6, 7, 21)

Заклучение:

Много факти са натрупани в подкрепа на ролята на оксидативния стрес в патогенезата на гломерулонефритите. Същевременно различни групи медикаменти – ARB, ACE инхибитори, витамини (A,C,E), 3- ω -полиненаситените мастни киселини, N ацетил L цистеин – могат да редуцират свободно радикалните процеси и да подобрят значително патофизиологичните механизми, възникнали като резултат на оксидативния стрес. Съвместни усилия в клинични проучвания с тези медикаменти може да доведе до изготвяне на подходящ терапевтичен план, имащ отношение към забавяне на прогресията на гломерулонефритите.

Изследванията върху свободните радикали и антиоксиданти водят и до нови насоки за разбиране същността на човешкото здраве и наблягат върху профилактиката. Това създава нови интердисциплинарни връзки, засягащи молекулярните механизми, чрез които ROC причиняват болести, което ще доведе до развитието на чувствителни методи за ранно улавяне на оксидативните увреди и откриването на нови антиоксиданти за профилактика.

Библиография:

1. Цветков, Н.; Бочев, П.; Свободно-радикални увреждания. Перспективи на антиоксидантната профилактика и терапия; Сф, Център по информация за медицина; 1996 г.
2. Milos N. Budisavljevic, LeAnn Hodge et al. Oxidative stress in the pathogenesis of experimental mesangial proliferative glomerulonephritis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003, 285, 1138-1148.
3. Bauer V, F Bauer. Reactive oxygen species as mediators of tissue protection and injury, *Gen Physiol Biophys* 1999, 18, 7-14.
4. Rohrmoser MM, G Mayer. Reactive oxygen species and glomerular injury. *Kidney Blood Press Res.* 1996, 19, 5, 263-9.
5. Wójcicka G, J Bełtowski. Oxidative stress in glomerulonephritis. *Postepy Hig Med Dosw,* 2001, 55, 6, 855-69.
6. Hahn S et al. Vitamin E suppresses oxidative stress and glomerulosclerosis in rat remnant kidney. *Pediatr Nephrol*, 1999, 13, 3, 195-8.
7. Parinyasiri U et al. Effect of fish oil on oxidative stress, lipid profile and renal function in IgA nephropathy. *J Med Assoc Thai* 2004, 87, 2, 143-9.
8. Futrakul N et al. Treatments of hemodynamic maladjustment and oxidative stress prevent renal disease progression in chronically severe glomerulonephritides. *Ren Fail* 2003, 25, 5, 839-44.
9. Gaertner SA et al. Glomerular oxidative and antioxidative systems in experimental mesangioproliferative glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 2002, 13, 12, 2930-7.
10. Chen JX, JF Zhou, HC Shen. Oxidative stress and damage induced by abnormal free radical

reactions and IgA nephropathy. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2005, 6, 1, 61-8.

11. Zhou JF et al. Abnormal reactions of free radicals and oxidative damages in the bodies of patients with chronic glomerulonephritis. *Biomed Environ Sci*. 2002, 15, 3, 233-44.

12. Sebeková K et al. Effects of ramipril in nondiabetic nephropathy: improved parameters of oxidative stress and potential modulation of advanced glycation end products. *J Hum Hyperten*. 2003, 17, 4, 265-70.

13. Agarwal R. Proinflammatory effects of oxidative stress in chronic kidney disease: role of additional angiotensin II blockade. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003, 284, 4, F863-9.

14. Bek MJ, S Wahle et al. Stra13, a prostaglandin E2-induced gene, regulates the cellular redox state of podocytes. *FASEB J* 2003, 17, 6, 682-4.

15. Túri S et al. Oxidative stress and antioxidant defense mechanism in glomerular diseases, *Free Radic Biol Med* 1997, 22, 1-2, 161-8.

16. Chan W et al. Alpha-Tocopherol reduces proteinuria, oxidative stress, and expression of transforming growth factor beta 1 in IgA nephropathy in the rat. *Mol Genet Metab* 1998, 63, 3, 224-9.

17. Schäufele TG et al. Impaired basal NO activity in patients with glomerular disease and the influence of oxidative stress. *Kidney Int* 2006, 70, 6, 1177-81.

18. Descamps-Latscha B et al. Early prediction of IgA nephropathy progression: proteinuria and AOPP are strong prognostic markers. *Kidney Int* 2004, 66, 4, 1606-12.

19. Kobori H et al. Enhanced intrarenal oxidative stress and angiotensinogen in IgA nephropathy patients. *Biochem Biophys Res Commun* 2007, 22, 358, 1, 156-63.

20. Kuemmerle NB et al. Influence of alpha-tocopherol over the time course of experimental IgA nephropathy. *Pediatr Nephrol* 1999, 13, 2, 108-12.

21. Pavlova EL, MI Lilova, VM Savov. Oxidative stress in children with kidney disease 2005, 20, 11, 1599-604.