АННОТАЦИЯ
диссертационной работы на соискание степени доктора PhD на тему «Молекулярно-клеточные предикторы хронической болезни почек» Нургалиевой Асель Сериковны

Актуальность

Хронической болезнью почек (ХБП) в настоящее время страдают более 10% населения земного шара. Такой масштаб распространения болезни позволяет рассматривать её как эпидемию (Тугушева Ф.А., Зубина И. В., 2009).

Развитие ХБП сопровождается мембранодеструктивными процессами, результатом которых является структурно-функциональная дезорганизация почечных мембран. Одной из причин развития мембранодеструкции является окислительный стресс (ОС). Одним из важных выводов исследований последних лет является то, что процессы липопероксидации развиваются на самых ранних стадиях развития ХБП, увеличивая риск формирования дисфункции эндотелия, сердечно-сосудистых заболеваний и других осложнений и сопутствующих заболеваний (Тугушева Ф.А., Зубина И. В., 2009; Gall J., Seibold S., 2003). Процессы липопероксидации также рассматриваются как один из факторов прогрессирования ХБП и развития терминальной почечной недостаточности (Spimizu M.N.M., Coimbra T.M., 2005).

Активные формы кислорода и токсичные продукты липопероксидации способны взаимодействовать с белками и нуклеиновыми кислотами. В первом случае образуются различные окисленные белки, во – втором модифицированные нуклеиновые кислоты. Интенсивное воздействие прооксидантов может привести к фрагментации белков и нуклеиновых кислот (Gutowski M., Kowalczyk S., 2013). Актуальность исследования в этом направлении документируется тем, что окисленные белки способны оказывать как непосредственный детримальный эффект, так и опосредованный, влияя на редокс-регуляцию или путем стимулирования образования реактивных метаболитов кислорода. С этих позиций предложено, в частности, рассматривать АОРР как новый класс почечных патогенных медиаторов (Плешкова Е.М., 2014). Соотношение различных типов окисленных белков, а также и направленность их изменения в плазме и клетках крови больных ХБП различной стадии практически не изучены.

Окислительное повреждение нуклеиновых кислот рассматривается как одна из причин увеличения внеклеточных нуклеиновых кислот (вкНК). К другим причинам выхода нуклеиновых кислот в кровоток являются различные формы клеточной гибели, включая образование нейтрофильных внеклеточных ловушек (НВЛ). Исследование НВЛ при хронической болезни почек не проводилось.

Увеличение содержания фрагментов внеклеточной ДНК в циркуляции в настоящее время позиционируется как фактор стресс-сигнализации при окислительном стрессе (Ermakov, A.V., Konkova M.S., Kostyuk S.V. et al., 2013). Кроме этого, показана роль внНК как модификаторов иммунного ответа, а также их влияние на состояние эндотелия и систему гемостаза (Муравлева Л.Е., Молотов-Лучанский В.Б., Клюев Д.А. и соавт., 2010; Туаева Н.О., Абрамова З.И., Мустафина Д.М., 2008.; Gahana P B., Swaminathan R., 2008 ; Pisetsky D. S. , 2007).

Ранее проведенными исследованиями установлена неоднозначная направленность изменения вкНК у больных с гломерулопатиями и тубулопатиями (Муравлева Л.Е., Молотов-Лучанский В.Б., Телеуов М.К. и соавт., 2010). При ХБП различной стадии исследования вкНК не проводилось.

Представляется перспективным исследование внеклеточных пуриновых нуклеотидов и продуктов их катаболизма в крови больных ХБП различной стадии. Необходимость исследования внеклеточных пуринов и продуктов их катаболизма обусловлено их участием в регуляции функции почек и сосудистого тонуса, а также выступать в качестве молекул- аларминов.

Ранее проведенными исследованиями показано изменение соотношения внеклеточных пуринов и продуктов их катаболизма у больных с тубулопатиями и гломерулопатиями и сформулирована рабочая гипотеза участия внеклеточных пуринов в развитии патологии почек, ассоциированной с артериальной гипертензией (Muravlyova L.E., Molotov-Luchanskiy V.B., Teleuov M.K. et al., 2010; Muravlyova L.E., Molotov-Luchanskiy V.B., Kulmagambetov I.R. et al., 2011).

Практически не изучен метаболизм нейтрофилов крови больных при прогрессировании ХБП. Исследования в этом направлении представляют безусловный интерес, поскольку возможные метаболические изменения в нейтрофилах, в том числе развитие внутриклеточного окислительного стресса, не может не оказывать существенного влияния на поведение этих клеток при прогрессировании ХБП.

Не проводился анализ структурообразующих свойств плазмы крови больных при ХБП различной стадии. Выявление различных паттернов структурообразования, сопоставление с биохимическими параметрами плазмы крови больных ХБП представляет безусловное значение как для понимания механизмов прогрессирования ХБП, так и с поиска новых диагностических и прогностических маркеров.

В целом, следует отметить, что исследования в декларируемых направлениях позволят углубить теоретические представления об особенностях метаболических изменений на различных стадиях ХБП, что является необходимой основой для разработки новых терапевтических подходов к замедлению темпов прогрессирования ХБП.

Цель исследования

Определить молекулярно-клеточные предикторы развития и прогрессирования хронической болезни почек.

Задачи исследования

1. Определить уровень циркулирующих нуклеиновых кислот, внеклеточных интермедиатов катаболизма пуринов в плазме крови больных с хронической болезнью почек различных стадий.
2. Определить возможность образования внеклеточных нейтрофильных ловушек в крови больных с хронической болезнью почек различных стадий.
3. Изучить показатели окислительной модификации белков и перекисного окисления липидов в плазме крови и лизатах нейтрофилов больных с хронической болезнью почек различной стадии
4. Изучить паттерны морфотипов тезиограмм плазмы крови больных с хронической болезнью почек различной стадии.
5. Выявить молекулярные предикторы развития и прогрессирования хронической болезни почек.

Научная новизна и теоретическая значимость исследования

Впервые установлено последовательное увеличение внеклеточных пуриновых оснований (аденин, гуанин) и интермедиатов катаболизма пуринов (ксантина и гипоксантина) в плазме крови больных в зависимости от стадии ХБП.

Впервые установлен достоверный рост вкРНК в плазме крови больных ХБП 1 и 2 стадии. Развитие хронической почечной недостаточности сопровождается резким снижением вкРНК в плазме крови больных.

Впервые установлено, что уровень вкДНК достоверно увеличивается в плазме крови больных ХБП, но резко снижается у больных ХБП 5 стадии при антибатном росте кислоторастворимых предшественников.

Впервые установлено, что у больных ХБП 3 стадии в дебюте хронической почечной недостаточности в плазме крови и лизате нейтрофилов достоверно возрастает содержание реактивных карбониловых производных белков.

Впервые установлено образование спонтанных внеклеточных нейтрофильных ловушек в крови у 33% больных с ХБП 1 стадии, у 5% больных ХБП 2 стадии, у 25% больных ХБП 3 стадии, у 29% больных ХБП 4 стадии и у 35% больных ХБП 5 стадии.

Впервые установлены различия как по количеству морфотипов тезиограмм плазмы крови, так и по паттернам их структуропостроения у больных ХБП различной стадии.

Впервые предложено рассматривать в качестве предикторов развития ХБП такие показатели как внеклеточные нуклеиновые кислоты. Для прогноза хронической почечной недостаточности предложено определять интермедиаты катаболизма пуринов (гипоксантин и ксантин), а также реактивные карбонильные производные белков в плазме крови больных.

Практическая значимость

Для внедрения в практику предлагается определение морфотипов тезиограмм плазмы крови для получения динамической картины изменения биохимического статуса плазмы крови, при прогрессировании ХБП, а также для оценки эффективности гемодиализа у больных с ХБП 5 стадии.

Внедрения результатов в практику

Полученные данные внедрены и используются в учебном процессе кафедры биологической химии при проведении занятий по элективным дисциплинам «Молекулярные основы патологии» (бакалавриат) и «Биохимия патологических процессов» (магистратура).

Основные положения, выносимые на защиту

В плазме крови больных ХБП увеличивается содержание внеклеточных пуриновых оснований (аденин, гуанин) и интермедиатов катаболизма пуринов (ксантин и гипоксантин), при этом степень увеличения зависит от стадии заболевания.

В плазме крови больных ХБП 1 и 2 стадии увеличивается содержание вкРНК. При присоединении и прогрессировании ХПН содержание вкРНК в плазме крови больных резко снижается.

В плазме крови больных ХБП увеличивается содержание вкДНК. При развитии терминальной ХПН уровень вкДНК резко снижается, а уровень кислоторастворимых предшественников возрастает.

В плазме крови и лизате нейтрофилов больных ХБП 3 стадии достоверно увеличивается содержание реактивных карбониловых производных белков

В крови части больных ХБП происходит образование спонтанных внеклеточных нейтрофильных ловушек.

У больных ХБП различной стадии происходит изменение структурообразующих свойств плазмы крови с формированием нескольких динамических типов при разных прогнозах исхода заболевания.

Внеклеточные нуклеиновые кислоты могут рассматриваться как предикторы развития ХБП.

Определение концентрации гипоксантина, ксантина и реактивных карбонильных производных белков в плазме крови больных ХБП может быть использовано для прогноза развития и прогрессирования ХПН.

Связь диссертации с другими научно-исследовательскими работами

Диссертация выполнялась на кафедре биологической химии в рамках научно-исследовательского проекта МОН РК «Молекулярно-клеточные механизмы развития хронической почечной недостаточности» (2013-2015), ГР №0113РК00410.

Апробация работы

Результаты исследования доложены на Международной конференции молодых ученых «Мир науки и молодежь: традиции и инновации» (19 февраля 2014, Караганда, Казахстан); на научной сессии Пермского государственного медицинского университета

имени академика Е.А. Вагнера «Навстречу 100-летию высшего медицинского образования на Урале» Пермь, 2015; на международной конференции «Молодые ученые Оренбуржья – науке 21 века», Оренбург, 2015), на 40 FEBS Congress "The Biochemical basis of life" (Berlin Germany, 4-9 July 2015); на VI Всероссийской школе-конференции с международным участием «Физиология кровообращения» (Москва, Россия, 2-5 февраля 2016 г).

Публикации

По результатам исследования опубликована монография «Структурообразующие свойства крови у больных хронической болезнью почек» (утвержденная Республиканским центром развития здравоохранения), 12 публикаций, в том числе 2 статьи и 1 тезис – в изданиях, индексируемых в Scopus и Thomson-Reuter; 3 статьи в изданиях, входящих в перечень ККСОН, получено 3 свидетельства о регистрации объекта авторского права.

Материалы и методы

На базе филиала городской больницы №1 города Караганды, клиники ТОО «Гиппократ», поликлиники КГМУ и в Научно-биохимической лаборатории при кафедре Биологической химии КГМУ было проведено клиническое обследование пациентов, страдающих хронической болезнью почек (ХБП) в 5 группах (контрольная группа; группы пациентов с ХБП 1, ХБП2, ХБП3, ХБП4 и ХБП5 соответственно). Всего в исследовании приняло участие 117 человек. Всем участникам исследования были проведены следующие методы обследования: основные (расспрос, объективное исследование, в том числе пальпацию, перкуссию, аускультацию внутренних органов) и дополнительные (измерение артериального давления, ЭКГ, специальные пробы мочи по Нечипоренко и Зимницкому, ультразвуковые исследования почек и органов брюшной полости). Осмотр у окулиста и невропатолога. Обязательными методами лабораторных исследований являлись общие анализы крови и мочи, биохимические тесты определения уровней креатинина и мочевины в крови. Оценка скорости клубочковой фильтрации и показателя канальцевой реабсорбции проводилась методом Реберга-Тареева и с помощью формулы Кокрофта и Голта (формула СКФ Cockroft-Gaul).

В плазме крови определяли содержание двух типов окисленно модифицированных белков: advanced oxidation protein products (AOPP) по методу Witko-Sarsat et al. Содержание реактивных карбониловых производных белков по методу R.L. Levine et al.

В плазме крови регистрировали уровень малонового диальдегида (МДА) в реакции с тиобарбитуровой кислотой по методу Гончаренко М.С., Латиповой А.М. Уровень гуанина (Г), аденина (А), гипоксантина (ГКс), ксантина (Кс) и мочевой кислоты (МК) определяли спектрофотометрически по методу Е.В. Орешникова и соавторов. В плазме крови также регистрировали содержание вкДНК, вкРНК и кислоторастворимую фракцию (КРФ) предшественников нуклеиновых кислот по методу Л.И Маркушевой и соавторов.

Для определения количества спонтанных внеклеточных нейтрофильных ловушек (ВНЛ) в крови обследованных лиц использовали методический прием И.И. Долгушина и Ю.С. Андреевой.

Паттерны структурообразования плазмы крови получали, используя метод клиновидной дегидратации по Шатохиной С.Н.

Для оценки степени взаимосвязи изучаемых показателей проводился непараметрический корреляционный анализ Спирмена.

Выводы

1. В плазме крови больных возрастает содержание внеклеточных нуклеиновых кислот, а также пуриновых оснований, ксантина и гипоксантина в зависимости от стадии хронической болезни почек.

2. В плазме крови больных ХБП зафиксированы неоднозначные тренды изменения внеклеточных нуклеиновых кислот. В плазме крови больных ХБП 1 и 2 стадии достоверное возрастало содержание вкРНК. При присоединении хронической почечной

недостаточности этот показатель резко снижался. Уровень вкДНК достоверно превышал значение контроля в плазме крови больных ХБП 2-4 стадий. В плазме крови больных ХБП 5 стадии содержание вкДНК падало ниже значений контроля при достоверном росте кислоторастворимых предшественников.

3. В лизатах нейтрофилов и плазме крови больных ХБП наблюдалась тенденция к увеличению содержание реактивных карбониловых производных белков, но достоверные отличия от контроля зафиксированы у больных ХБП 3 стадии. Уровень АОРР достоверно возрастал в плазме крови больных ХБП 5 стадии.

4. У 33% больных с ХБП 1 стадии, у 5% больных ХБП 2 стадии, у 25% больных ХБП 3 стадии, у 29% больных ХБП 4 стадии и у 35% больных ХБП 5 стадии в крови зафиксировано образование спонтанных внеклеточных нейтрофильных ловушек. Количество внеклеточных нейтрофильных ловушек варьировало от 1 до 14.

5. У больных с ХБП 1 стадии зафиксировано 6 морфотипов тезиограмм плазмы крови, тогда как у больных с ХБП 2 стадии число морфотипов сократилось до 2. У больных с ХБП 3 и 4 стадий наблюдалось по одному морфотипу тезиограмм, тогда как у больных с ХБП 5 зафиксировано 2 варианта морфотипов тезиограмм.

6. Предложено включить вк РНК в перечень DAMPs при ХБП 1 стадии. При ХБП 2 стадии оптимально добавить в перечень DAMPs вкДНК, вкРНК, пуриновые основания, ксантин, гипоксантин. В дебюте хронической почечной недостаточности целесообразно включить в перечень DAMPs включить гипоксантин, ксантин, реактивные карбонильные производные белков.

7. Предложено определение морфотипов тезограмм в качестве дополнительного критерия прогрессирования ХПН и оценки эффективности проводимого лечения.