

Факторы оксидативного повреждения крови пациентов при остром инфаркте миокарда и хронической сердечной недостаточности

С.С.Алексанян, Р.М.Симонян, А.А.Степанян, М.А.Симонян

Институт биохимии им. Г.Х. Бунятыана НАН РА, Кардиологическое отделение Гюмрийской областной больницы, Гюмрийский гос.пед.институт им. М.Налбандяна

375014, Ереван, ул. П.Севака, 5/1

Ключевые слова: металлопротеины, инфаркт миокарда, сердечная недостаточность, кровь, оксидативное повреждение

Сердечная недостаточность часто является результатом болезни коронарной артерии, при которой наблюдается оксидативное повреждение крови, обусловленное повышением уровня липидной пероксидации, тиолов, церулоплазмينا (ЦП) в плазме крови с небольшим снижением уровня Cu,Zn-супероксиддисмутазы (СОД) в эритроцитах [20]. При кардиомиопатии наблюдается повышение уровня трансферрина (ТФ) в сыворотке крови и моче крупного рогатого скота [14]. При этом активные формы кислорода (АФК), в частности нитроксильный радикал (NO^*), вызывают оксидативное повреждение скелетных мышц на фоне снижения уровня ключевых антиоксидантных ферментов СОД, каталазы, глутатионпероксидазы (ГПО), вызывая сердечную недостаточность. При сердечной недостаточности, вызванной у мышей, в сердечной ткани наблюдается увеличение перекисного окисления липидов (ПОЛ) и продуцирования АФК с соответственным снижением антиоксидантной активности. Эти изменения являются причиной оксидативного повреждения скелетных мышц при сердечной недостаточности в эксперименте [22]. АФК приводят к оксидативному повреждению клеток миокарда, вызывая сердечную недостаточность. При этом активность СОД, ГПО и каталазы не снижается [23]. При сердечной недостаточности у крыс, вызванной адриамицином, препарат пробуккол регулирует уровень ГПО и Mn-СОД в сердечной ткани, снижая оксидативный стресс [19]. В конечной стадии сердечной недостаточности повышается каталазная активность, но активность Cu,Zn-СОД и Mn-СОД не изменяется [10]. Причем, сердечная недостаточность приводит к инфаркту миокарда на фоне подавления антиоксидантной активности сердечной ткани и оксидативного повреждения в левом и правом желудочках сердца [15]. Потенциальная роль липопротеинов высокой и низкой плотности в патогенезе сердечной недостаточности известна [16], и в результате оксидативного

повреждения клеток миокарда происходит не только их перекисное окисление, но и выброс цитохрома С в кровь. Наличие цитохрома С в крови используется как диагностический тест острого инфаркта миокарда [9, 10]. При сердечно-сосудистых заболеваниях ЦП окисляет липопротеины сыворотки ионами меди, локализованными на "поверхности" этого металлопротеина. Это свидетельствует о качественном изменении ЦП при сердечно-сосудистых заболеваниях [13]. При этом инфаркт миокарда вызывает повышение уровня ЦП в сыворотке крови больных [17, 18, 20]. При инфаркте миокарда и нестабильной ангине в тромбоцитах наблюдается повышение уровня прооксидантной системы (ксантиноксидаза), малонового диальдегида (МДА) и снижение активности антиоксидантной системы [21]. Активность ГПО, глутатионредуктазы и уровень витаминов Е и С в эритроцитах и плазме крови не меняются, а активность каталазы снижается при инфаркте миокарда до и после тромболитической терапии пациентов [11]. При инфаркте миокарда у больных ощутимо изменяются и структурные компоненты мембран эритроцитов – липид-белковые компоненты как результат гипоксии и оксидативного стресса с увеличением уровня гемоглобинов A_2 и F [24].

Приведенные данные свидетельствуют о важной роли АФК в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний. Более детальное и комплексное определение состояний систем крови (регуляторов метаболизма АФК) при этих заболеваниях расширит и углубит имеющиеся знания.

Целью работы является определение количественных и качественных изменений металлопротеинов крови антиоксидантного и прооксидантного действия при остром инфаркте миокарда (ОИМ) и хронической сердечной недостаточности (ХСН) для выявления их патогенетических молекулярно-биохимических механизмов.

Материал и методы

Обследована венозная кровь, взятая у пациентов после ОИМ (11 больных обоего пола в возрасте 37–62 года) и у пациентов с ХСН (14 больных обоего пола в возрасте 45–55 лет с давностью заболевания 2–3 года). Кровь стабилизировали 2% цитратом натрия с 3% раствором глюкозы. У каждого больного было взято по 20 мл крови. В качестве контроля была использована донорская кровь.

Выделение и очистку металлопротеинов крови осуществляли ионообменной хроматографией (на целлюлозах DE-52 и KM-52 и сефадексе DEAE A-50) и гель-фильтрацией (на биогеле P-100) белковых фракций сыворотки крови и растворимой части эритроцитов и мембран эритроцитов, солюбилизируя из последних белковые фракции без использования детергента [7, 8]. Были получены следующие металлопротеины крови: металлопротеины прооксидантного действия – МПД (цитохром b_5 из растворимой фракции эритроцитов, суммарная фракция цитохромов b_{558I} и b_{558II} из сыворотки крови, суммарная фракция эритроцитарных мембранных цитохромов b_{558III} и b_{558IV} ; супероксидпродуцирующий липопротеин сыворотки – супрол [4–6]) и металлопротеины антиоксидантного действия – МАД (СОД и каталаза из растворимой фракции эритроцитов, ЦП и ТФ – из сыворотки крови). Количество полученных металлопротеинов определяли измерением плотностей оптического поглощения, характерных для цитохрома b_5 при 525 нм (β -форма), цитохромов $b_{558I-IV}$ – 530 нм, супрола – 430 нм, ЦП – 610 нм, ТФ – 470 нм (голоформа). Супероксиддисмутазную активность фракций и супероксидпродуцирующую способность супрола и цитохрома b_{558III} определяли нитротетразолиевым методом (НТС) путем вычисления процента подавления (в случае СОД) или стимулирования (в случае супрола или цитохрома b_{558III}) образования формазана (при 560 нм). За единицу активности СОД принимали то количество фракции, которое вызывает 50% ингибирование образования формазана при восстановлении НТС супероксидными радикалами (O_2^-). За единицу O_2^- -продуцирующей активности супрола или цитохрома b_{558III} принимали то количество фракции, которое способно стимулировать на 50% образование формазана супролом. Удельную активность каталазы определяли перманганатометрией, рассчитывая количество фракции, расщепляющее 0,1 М перекиси водорода за 1 мин при 20°. Удельная активность СОД и каталазы была определена в расчете на 1 мл эритроцитов, а O_2^- -продуцирующая активность супрола и цитохрома b_{558III} на 1 мл сыворотки или 1 мл эритроцитов соответственно.

Оптические спектральные измерения проводили на

спектрофотометре "Specord UV VIS" (Германия) с длиной оптического пути 1 см. Ионообменную хроматографию и гель-фильтрацию белковых фракций осуществляли на стеклянных колонках с фильтрами различных размеров (3х20, 2х20, 2х80 и 1х20 см). В процессе получения и очистки металлопротеинов были использованы центрифуги К-24 и К-70 (Германия).

Статистическую обработку полученных результатов проводили методом вариационной статистики Стьюдента-Фишера с определением критерия "Р".

Результаты и обсуждение

Количественные изменения эндогенного уровня МПД и МАД, а также их удельной активности после ОИМ и ХСН существенно отличаются не только от показателей донорской крови (они принимаются за 100%), но и между собой (таблица). После ОИМ на фоне небольшого снижения эндогенного уровня цитохромов b_5 (субстрата НАДН-зависимой цитохром b_5 редуктазы) заметно снижен суммарный уровень двух изоформ эритроцитарных мембранных цитохромов b_{558III} (имеет кислый характер) и b_{558IV} (имеет основной характер). Расчеты показывают, что суммарный уровень МПД в эритроцитах после ОИМ снижен на $80.1 \pm 5.3\%$. Это снижение в основном связано с уменьшением уровня эритроцитарных мембранных цитохромов b_{558} , которые являются новыми структурно-функциональными компонентами мембран эритроцитов, что свидетельствует о снижении стабильности эритроцитарных мембран непосредственно после инфаркта миокарда. При этом НАДН-зависимая O_2^- -продуцирующая активность цитохрома b_{558III} не изменяется. Данный факт говорит о том, что цитохром b_{558III} претерпевает только количественные, а не качественные изменения. С другой стороны, при ОИМ наблюдается снижение удельной активности ключевых антиоксидантных металлопротеинов СОД и каталазы (снижение их суммарного уровня составляет $34.6 \pm 2.6\%$ по сравнению с контрольными показателями). Фактически суммарный уровень МПД снижен больше ($-80.1 \pm 5.3\%$), чем расчетный суммарный уровень МАД ($-34.6 \pm 2.6\%$), что свидетельствует о дисбалансе между МПД и МАД при ОИМ. В сыворотке на фоне небольшого снижения уровня супрола и практически неизменного уровня ТФ наблюдается повышение уровня белка острой фазы антиоксидантного действия – церулоплазмينا [1]. Полученные данные коррелируют с литературными данными [10, 23]. При этом O_2^- -продуцирующая активность супрола повысилась (таблица), что может быть связано с нарушением метаболизма меди, следы которой могут стимулировать продуцирование супролом супероксидных радикалов как *in vitro*, так и *in vivo* [2]. Не исключается, что в процессе активирования супрола участвуют и

Таблица

Относительные изменения (%) эндогенного уровня МПД и МАД в крови пациентов при ХСН и после ОИМ по сравнению с контрольными показателями, принятыми за 100% ($n=10$, $p<0.05$)

Металлопротеины и их активность	ОИМ	ХСН
Цитохром b_5	-7.2 ± 0.7 ($p<0.01$)	-121.5 ± 7.4 ($p<0.02$)
Суммарная фракция цитохрома b_{558} мембран эритроцитов	-20.8 ± 2.1	-31.6 ± 2.5
Цитохром $b_{558}III$	-68.2 ± 4.4 ($p<0.02$)	-73.4 ± 5.0 ($p<0.02$)
Цитохром $b_{558}IV$	$+16.1 \pm 1.1$	-16.7 ± 1.2
Супрол	-11.1 ± 0.9	$+110.5 \pm 6.8$
O_2^- -продуцирующая активность супрола	$+44.2 \pm 2.9$	$+120.9 \pm 7.2$
O_2^- -продуцирующая активность цитохрома $b_{558}III$	нет изменений	нет изменений
ЦП	$+25.7 \pm 2.3$	$+53.1 \pm 4.1$
ТФ	-1.6 ± 0.2	-21.6 ± 2.2
СОД	-14.3 ± 1.2	-16.6 ± 2.1
Каталаза	-20.3 ± 2.0 ($p<0.01$)	$+120.0 \pm 7.1$ ($p<0.02$)

поверхностные ионы меди молекулы ЦП [13], причем, увеличение O_2^- -продуцирующей активности супрола происходит на фоне увеличения уровня ЦП после ОИМ. Таким образом, после ОИМ антиоксидант-

ный статус (суммарный расчетный уровень МАД) и прооксидантный статус в эритроцитах существенно отличаются от нормы.

При ХСН наблюдается существенное уменьшение уровня цитохрома b_{558} и эритроцитарных мембранных цитохромов b_{558} . В отличие от ОИМ при ХСН уровень цитохрома $b_{558}IV$ также понижен, а суммарный уровень МПД в эритроцитах снижен на $243.2 \pm 11.5\%$ (по сравнению с контрольными показателями), что примерно в три раза меньше, чем при ОИМ. Этот факт свидетельствует о том, что при ХСН интенсивность метаболических процессов с участием АФК, в частности O_2^- , существенно понижена. В сыворотке крови при ХСН наблюдается несколько иная картина. Происходит заметное увеличение O_2^- -продуцирующей активности супрола с соответствующим увеличением уровня ЦП. В отличие от ОИМ при ХСН наблюдается нарушение метаболизма железа в сыворотке крови за счет снижения уровня ТФ. Антиоксидантный статус в эритроцитах при ХСН заметно понижается ($+103.4 \pm 6.7\%$) в основном за счет каталазы. Это свидетельствует о существенном повышении уровня перекиси водорода в эритроцитах. Возможно, это является причиной существенного снижения уровня эритроцитарных мембранных цитохромов b_{558} , которые денатурируются этим активным соединением кислорода [3]. С другой стороны, стабильность эритроцитарных мембран при ХСН снижена больше, чем при ОИМ.

Таким образом, как результат адаптационных механизмов организма, антиоксидантный статус и прооксидантный статус в крови больных при ХСН изменены больше, чем после ОИМ, вызывая соответственный фон оксидативного повреждения компонентов крови.

Поступила 17.02.03

Սրտամկանի սուր ինֆարկտով եւ խրոնիկական սրտային անբավարարությամբ հիվանդների արյան օքսիդատիվ վնասման գործոնները

Ս.Ս.Ալեքսանյան, Ռ.Մ.Միմոնյան, Ա.Ա.Սրեփանյան, Մ.Ա.Միմոնյան

Սրտամկանի սուր ինֆարկտից (ՍՄԻ) հետո դիտվում է էրիթրոցիտներում պրոօքսիդանտային կարգավիճակի (էրիթրոցիտների քաղաքային ցիտոքրոմ b_{558} -երի և ցիտոքրոմ b_5 -ի հաշվարկային գումարային մակարդակ) անկում համեմատած հակաօքսիդանտային հետ: Այս երևույթը խորանում է խրոնիկական սրտային անբավարարության (ԽՍԱ)

ժամանակ: ՍՄԻ-ից հետո և ԽՍԱ ժամանակ արյան շիճուկում սուպրոլի O_2^- գոյացման ակտիվության աճը զուգակցվում է ցերուլոպլազմինի մակարդակի բարձրացմամբ (Cu և Fe նյութափոխանակության շեղումներով): Ենթադրվում է, որ ԽՍԱ ժամանակ ավելի քան ՍՄԻ-ից հետո դիտվում է արյան շիճուկի և էրիթրոցիտների օքսիդատիվ վնասման ուժեղացում:

The factors of oxidative damage of the blood in patients with acute myocardium infarction and chronic heart failure

S.S.Alexanyan, R.M.Simonyan, A.A.Stepanyan, M.A.Simonyan

After acute myocardium infarction (AMI) it is observed a phenomenon of a significant decrease in the prooxidant status (pay-sheet total level of cytochromes b_{558} of the erythrocytes membranes and cytochrome b_5) in the erythrocytes of the patients, in comparison with the anti-oxidant status (pay-sheet total level of SOD and catalase). This phenomenon increases at chronic heart failure

(CHF). In the serum of patients after AMI and at CHF the increase in O_2^- -producing activity of superoxide is accompanied by the rise of the endogenous level of ceruloplasmin (the bleach of the Cu and Fe metabolism).

It is supposed that the oxidative damage of the erythrocytes and serum is more expressed at CHF than after AMI.

Литература

1. Мжелицкая Т.И. Бюлл.эксп.биол.мед., 2000,130, 124.
2. Симонян Г.М., Бабалян М.А., Симонян Р.М. Биол.журн.Армении, 1999, 1, с. 18.
3. Симонян Г.М., Григорян Г.Г., Симонян Р.М., Симонян М.А. Актуальные вопросы военной медицины. Ереван, 1999.
4. Симонян Г.М., Галоян А.А., Симонян М.А. Докл. НАН РА, 2001, 101, 183.
5. Симонян М.А., Карапетян А.А., Бабалян М.А., Симонян Р.М. Биохимия, 1996, 61, с. 932.
6. Симонян М.А., Симонян Г.М., Бабалян М.А. Биохимия, 1995, 60, с.1977.
7. Симонян М.А., Симонян Г.М., Григорян Г.Г., Симонян Р.М. Способ получения цитохромов b из мембран эритроцитов. Лицензия изобр. N908. Армения, 2001.
8. Симонян М.А., Симонян Г.М. Способ получения металлопротеинов. Лицензия изобр. N341. Армения, 1997.
9. Alleyne T., Josef J., Sampson V. Appl. Biochem. Biotechnol., 2001, 90, p. 97.
10. Deiterich S., Bielgk U., Beulich K. et al. Circulation, 2000, 101, p. 33.
11. Denisovic S., Mijalkovic D., Saicic Z.S. et al. J.Environ.Pathol.Oncol., 1998, 17, p. 281.
12. Engstrom G., Lind P., Hedbald et al. Circulation, 2002, 105, p. 2632.
13. Fox P.L., Mazumder B., Ehrenwald E., Makhopadhyay C.K. Free Rad.Biol.Med., 2000, 28, p. 1735.
14. Graber H.U., Pfister H., Marting J. Res.Vet.Sci., 1995, 59, p. 160.
15. Hill M.F., Singal K. Circulation, 1997, 96, p. 2414.
16. Horwich T.B., Hamilton M.R., Maclellam W.R. et al. J.Card.Fail., 2002, 8, p. 16.
17. Klipstein-G.K., Grobbee D.E., Koster J.F. et al. Br.J.Nutr., 1999, 81, p. 139.
18. Khaper N., Singal P.K. J. Am.Col.Cardiol., 2001, 37, p. 1461.
19. Li T., Danelisen I., Bello-K.A., Singal P.K. Cardio-vasc.Res., 2000, 46, 523.
20. McMurray J., Chopra M., Abdullah I. et al. Eur.Heart J., 1993, 14, p.1493.
21. Pandey N.R., Kaur G., Chandra M. et al. Int.Cardiol., 2000, 76, p. 33.
22. Tsutsui H., Ide T., Hayashidani S. et al. Circulation, 2001, 104, p. 134.
23. Tsutsui H., Ide T., Hayashidani S. et al. Cardiovasc.Res., 2001, 49, p. 103.
24. Zazulina E.G. Voen.Med.Zh., 2002, 323, p. 34.