

Особенности формирования прооксидантного потенциала крови при остром ишемическом инсульте

С.М.Апресян*, Р.М.Симонян**, Г.М.Симонян**,
М.А.Симонян**, Э.С.Секоян*

Кафедра спортивной медицины и реабилитации Ереванского государственного медицинского университета им. М.Гераци*
Институт биохимии им. Г.Х. Бунятыана НАН РА**

375025, Ереван, ул.Корюна, 2
375014, Ереван, ул.П.Севака, 5/1

Ключевые слова: ишемический инсульт, прооксиданты, мембраны эритроцитов, цитохром b-588 III, супрол

При ишемии мозга интенсификация свободнорадикального окисления (СРО) сопровождается повышенной генерацией активных форм кислорода (АФК) – супероксид анион (O_2^-), нитроксильного и гидроксильного радикалов, а также перекиси водорода и аниона гипохлорида [2], приводя к активации процессов ПОЛ [4], запуску Са-глутаматного каскада [3], избыточному образованию NO , формированию пероксинитрит-аниона, ингибирующего Cu, Zn -СОД, с развитием метаболических нарушений, характеризующихся как состояние оксидативного стресса [18,24]. При острой церебральной ишемии и инсульте в церебрально-мозговой жидкости и крови больных отмечается повышение уровня АФК [17,20], возрастает O_2^- -продуцирующая активность полиморфноядерных лейкоцитов и тромбоцитов с повреждением сосудистого эндотелия [16]. В указанных условиях введение препаратов с супероксиддисмутазной (СОД) и каталазной активностью оказывает протекторное действие, подчеркивая ключевую повреждающую роль, в первую очередь, O_2^- и H_2O_2 в формировании оксидативного стресса [19,25]. Ингибирование СРО и липидной пероксидации рассматривается в качестве одного из приоритетных путей нейропротекции при оксидативном стрессе мозга различного генеза [21–23].

Известно, что в мембранах клеток крови, включая эритроцитарные, локализованы $NADPH$ -зависимые оксидоредуктазы, для которых различные типы цитохрома b являются субстратами для продуцирования O_2^- . К числу последних относятся сравнительно недавно открытые металлопротеины крови, обладающие прооксидантной активностью. Это выделенный из мембран эритроцитов человека очищенный цитохром b -558 III [5,6] с молекулярной массой (125 кДа), близкой к молекулярной массе цитохрома b -558 (127 кДа), выделенного из мембран полиморфноядерных лейко-

цитов крови человека, и супероксидпродуцирующий $NADPH$ -содержащий липопротеин сыворотки крови – супрол [7], содержание и прооксидантная активность которых при сосудистых заболеваниях головного мозга в настоящее время не изучены.

Цель настоящего исследования состоит в изучении в остром периоде ишемического инсульта (ИИ) количественных и качественных изменений металлопротеинов крови прооксидантной активности (ключевая изоформа цитохрома b -558 мембран эритроцитов (МЭ) цит. b -558 III и супероксид-продуцирующий липопротеин сыворотки крови – супрол).

Материал и методы

Изучение металлопротеинов крови прооксидантного действия проведено у больных с верифицированным диагнозом ИИ, госпитализированных в ангионеврологическом центре II медобъединения г.Еревана. Неврологический статус пациентов оценивался по «Канадской неврологической шкале». В исследование были включены 10 больных (6 женщин, 4 мужчины в возрасте 50–65 лет) с негрубыми нарушениями сознания и речи, двигательными расстройствами в виде легкого или умеренного пареза. ИИ развивался у больных на фоне атеросклероза, артериальной гипертензии и их сочетания. У обследованных больных согласно разработанному протоколу проведены общепринятые лабораторно-биохимические и клинико-инструментальные исследования. Комплекс проведенных у пациентов лечебных мероприятий находился в соответствии с Хельсингборгской декларацией «Основные принципы ведения больного инсультом. Цели к 2005г» [14]. Кровь для определения уровня и активности прооксидантных металлопротеинов забиралась

у пациентов в остром периоде заболевания (на 1–4-й дни развития ИИ). В качестве контроля служила свежая донорская кровь.

Супрол и цит. *b*-558 III получали из сыворотки и МЭ крови биотехнологическим способом [8] с использованием методов ионообменной хроматографии (на целлюлозах ДЕ-52, КМ-52 и сефадексе ДЕАЕ А-50) и геля фильтрации на сефадексе G-100 без применения детергента для солубилизации цит. *b*-558 III из МЭ [9]. Количество супрола и цит. *b*-558 III определяли измерением плотности максимального оптического поглощения, характерного для супрола при 430 нм и для цит. *b*-558 III – 530 нм, O_2^- -продуцирующую активность супрола и цит. *b*-558 III – нитротетразолиевым синим (НТС) методом путем вычисления процента стимулирования образования формазана (при 560 нм) при восстановлении НТС супероксидными радикалами. За единицу O_2^- -продуцирующей активности супрола и цит. *b*-558 III принимали количество белка, способного стимулировать образование формазана на 50%. Удельная O_2^- -продуцирующая активность супрола и цит. *b*-558 III была определена в расчете на 1 мл сыворотки и 1 мл суспензии эритроцитов соответственно. МетHb-восстанавливающую активность цит. *b*-558 III определяли, используя Hb, выделенный из эритроцитов свежей донорской крови [10], при этом величины оптического поглощения составляли: α -полосы поглощения метHb (при 570 нм) – 0,8, β -полосы используемого цит. *b*-558 III (при 530 нм) – 0,3. Непосредственно в кварцевых кюветах спектрофотометра к 2,5 мл метHb добавляли 0,2 мл цит. *b*-558 III. После быстрого перемешивания раствор инкубировали в аэробных условиях *in vitro* в течение 6–8 ч при 30°. Периодически определяли величину плотности α -компонента метHb (снижение плотности которого прямо пропорционально количеству образовавшегося ферроHb – Fe^{2+} Hb с максимальным поглощением при 555 нм. Была определена кинетика снижения плотности α -поглощения метHb под воздействием цит. *b*-558 III из МЭ донорской и крови больных ИИ в равных количествах ($A_{530}=0,3$). Оптические спектральные измерения осуществляли на спектрофотометре «Specord UV-VIS» с длиной оптического пробега 1 см. Ионообменную хроматографию белковых фракций сыворотки и МЭ проводили в стеклянных колонках с фильтрами различных размеров. Статистическую обработку полученных результатов осуществляли методом вариационной статистики с оценкой достоверности по *t*-критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Установлено, что O_2^- -продуцирующая система крови больных в остром периоде ИИ претерпевает существенные количественные и качественные изме-

нения. В частности, отмечается заметное повышение уровня цит. *b*-558 III МЭ (таблица), что, по-видимому, обусловлено значительным превалированием процесса накопления цит. *b*-558 III в МЭ над интенсивностью «облегченного» отщепления цит. *b*-558 III из МЭ при гидролизе последних [11]. Об этом свидетельствует и увеличение степени высвобождения (рилизинг) цит. *b*-558 III из МЭ при их инкубировании в аэробных условиях (рН 7,4 при 4° в течение 5 дней). Необходимо отметить, что очищенные от следов Hb (путем отмывания) МЭ крови больных ИИ продолжают сохранять красноватый оттенок, между тем как МЭ донорской крови после полного удаления следов Hb приобретают слабозеленую окраску, что свидетельствует о том, что в остром периоде ИИ происходит проникновение Hb в мембрану эритроцита, его взаимодействие непосредственно в мембране с цит. *b*-558 III с образованием нестабильного комплексного соединения за счет NO^- в лигандном окружении железа гемовой группы данного гемопroteина [24]. Оптический спектр поглощения образующегося комплекса имеет «смешанную» форму между метHb и цит. *b*-558 III. Указанный комплекс разлагается после его ионообменной хроматографии на колонке с целлюлозой КМ-52, в результате чего Hb задерживается на колонке, а цит. *b*-558 III освобождается от Hb (рис.1).

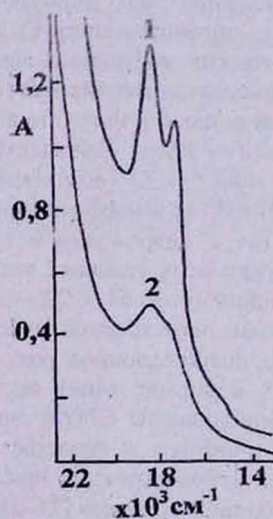


Рис.1. Оптические спектры поглощения комплекса метHb с цит. *b*-558 III (1) и цит. *b*-558 III после удаления Hb на колонке с КМ-52 (2)

Повышение степени рилизинга цит. *b*-558 III и его комплексообразование с Hb в МЭ свидетельствует об окислительном повреждении мембранных структур при остром ИИ. Следует отметить, что указанный процесс выявлен и при ряде других сердечно-сосудистых заболеваний, и при канцерогенезе [13],

сопровождаясь окислительным повреждением МЭ [1]. В связи с этим, оценка степени его специфичности, в том числе при остром ИИ, должна быть основана на учете количественного уровня образовавшегося комплекса цит. b-558 III с Hb в МЭ. В указанном плане определение количественного содержания комплекса цит. b-558–Hb в эритроцитарной мембране крови больных ИИ при проведении дальнейших исследований в этом направлении может приобрести характер диагностического или прогностического показателя. В условиях дестабилизации ЭМ, индуцированной окислительным стрессом, в качестве одного из проявлений адаптационных механизмов (системного или гемического уровня) следует рассматривать выявленное возрастание NADPH-зависимой O_2^- -продуцирующей и метHb-восстанавливающей активности цит. b-558 III, более выраженно проявляющейся в гетерогенной (мембранной), чем в гомогенной фазе (рис.2). Допускается, что цит. b-558 III, повышая уровень ферроHb (Fe^{+2} -Hb), способствует улучшению кислородного гомеостаза, что требует дальнейшего подтверждения в исследованиях, выполненных в условиях *in vivo*. В этой связи следует отметить, что в динамике развития ИИ в эритроцитах крови больных отмечается трансформация форм гемоглобина: первоначальное преобладание оксиHb (первые несколько часов), формирование деоксиHb (2–3 суток), доминирование метHb (3–7 суток), лизис эритроцитов и высвобождение метHb (7–21 сутки) [15].

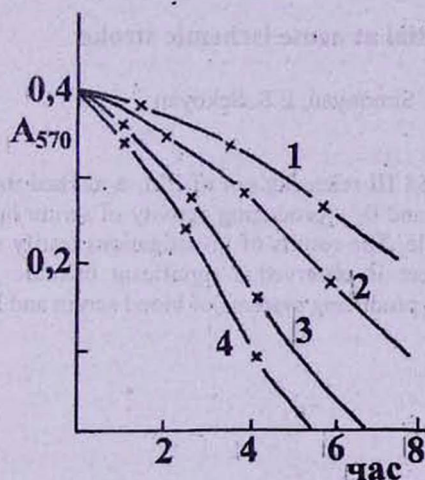


Рис.2. Кинетические кривые снижения плотности поглощения (при 570 нм) мет Hb под воздействием цит. b-558 III из МЭ донорской крови (1) и МЭ больных ОИИ (2) в гомогенной и гетерогенной фазах (3 и 4) соответственно.

Анализ полученных результатов свидетельствует, что оптические спектральные показатели цит. b-558 III, полученного из ЭМ крови больных острым ИИ и

доноров, существенно не различаются, хотя величина отношения A_{412}/A_{530} (оптический спектральный индекс) несколько различна. Учитывая указанное обстоятельство, а также данные о более высоких показателях уровня O_2^- -продуцирующей и метHb-восстанавливающей активности цит. b-558 III из ЭМ больных ИИ, можно констатировать, что данный гемопротеин подвергается не только количественным, но и качественным изменениям. Аналогичные по направленности изменения выявлены и со стороны другого металлопротеина – супрола, обладающего проокислительной активностью. Установлено, что содержание супрола в сыворотке крови больных острым ИИ и особенно его O_2^- -продуцирующая активность значительно повышены (таблица).

Таблица

Относительные изменения (%) содержания и активности проокислительных металлопротеинов крови больных острым ишемическим инсультом по сравнению с контролем (свежая донорская кровь) (n=10, p<0,05)

Металлопротеины крови	Увеличение, %
Содержание цитохрома b-558 III в мембранах эритроцитов	39,2 ± 4,1
Рилизинг цитохрома b-558 III из мембран эритроцитов	21,1 ± 3,0
O_2^- - продуцирующая активность цитохрома b-558 III в гомогенной фазе (в растворе)	23,4 ± 2,7
O_2^- - продуцирующая активность цитохрома b-558 III в гетерогенной фазе (в мембранах эритроцитов)	32,3 ± 3,1
МетHb-восстанавливающая активность цитохрома b-558 III в гомогенной фазе (в растворе)	21,4 ± 1,1
МетHb-восстанавливающая активность цитохрома b-558 III в гетерогенной фазе (в мембранах эритроцитов)	48,1 ± 3,5
Содержание супрола в сыворотке крови	53,1 ± 3,6
O_2^- - продуцирующая активность супрола	166,7 ± 21,3

В то же время следует учесть, что при ИИ генерируемые супролом избыточные количества O_2^- могут инициировать липидную перекисидацию (аутоокисление) фосфолипидных остатков самого супрола, стимулируя тем самым процесс его самоагрегации, сопровождающийся снижением стабильности супрола. Не исключается, что указанный фактор (формирование агрегатов супрола), в свою очередь, может усугубить один из существенных патогенетических механизмов ишемических поражений мозга – микрогемо-

реологические и микроциркуляторные расстройства.

Таким образом, результаты проведенных исследований позволили сформулировать положение о том, что повышенное содержание и высокая O_2^- - продуцирующая активность металлопротеинов крови – супрола и цит. b-558 III являются существенным фактором повышения прооксидантной активности крови при остром ИИ, требующей соответствующей коррекции.

Поступила 12.11.05

Արյան պրոքսիդատիվ պոտենցիալի ձևավորման առանձնահատկությունները սուր իշեմիկ կաթվածի դեպքում

Ս.Ս.Ապրեսյան, Ռ.Մ.Սիմոնյան, Գ.Մ.Սիմոնյան,
Մ.Ա.Սիմոնյան, Է.Ս.Սեկոյան

Իշեմիկ կաթվածի (ԻԿ) զարգացման սուր շրջանում հիվանդների մոտ դիտվում է էրիթրոցիտների քաղաճի (ԷԹ) b-558 ցիտոքրոմի հիմնական իզոմերի հոմոգեն և հետերոգեն ֆազաների b-558 III ցիտոքրոմի NADPH-կախվածության սուպերօքսիդ (O_2^-) արտադրող և մետհեմոգլոբին վերականգնող ակտիվության աճ:

Միաժամանակ էապես աճում է ԷԹ-ում b-558 III

ցիտոքրոմի պարունակությունն ու անջատման աստիճանը, նկատելիորեն աճում է շիճուկի լիպոպրոտեինի՝ սուպրոլի մակարդակն ու O_2^- - արտադրող ակտիվությունը: Անցկացրած հետազոտությունների արդյունքները վկայում են այն մասին, որ սուր ԻԿ-ի դեպքում էապես բարձրանում է արյան շիճուկի համակարգերի և ԷԹ-ի O_2^- - արտադրող մակարդակը:

Peculiarities of formation of prooxidant blood potential at acute ischemic stroke

S.M. Apresyan, R.M. Simonyan, G.M. Simonyan, M.A. Simonyan, E.S. Sekoyan

At acute period of ischemic stroke (IS) development there is observed an increase in NADPH-dependent superoxide (O_2^-) - producing and methemoglobin-restoring activity of key isoform of cytochrome b-558 of erythrocyte membranes (EM) – b-558 III cytochrome in homogeneous and heterogeneous phases. Simultaneously, there take place an essential increase in the level and degree of cyto-

chrome b-558 III releasing out of EM, a marked increase in the level and O_2^- - producing activity of serum lipoprotein – suprole. The results of investigations testify that in acute IS there is observed a significant increase in the level of O_2^- - producing systems of blood serum and EM.

Литература

1. Алексанян С.С., Симонян Г.М., Алексанян А.С. и др. Медицинская наука Армении, 2004, т.XLIV, 3, с.47.
2. Болдырев А.А. Биохимия, 1995, т.60, вып. 9, с.1536.
3. Гусев Е.И., Скворцова В.И., Коваленко А.В., Соколов М.А. Журн. неврол. и психиатрии им.С.С.Корсакова, 1999, т.99, 2, с.65.
4. Ерин А.Н., Гуляева В.Н., Никушкин Е.В. Бюлл. эксп. биол. и мед., 1994, 10, с.343.
5. Симонян Р.М. Новые факторы оксидативного повреждения компонентов крови. Автореф. дисс. канд. Ереван, 2004.
6. Симонян М.А., Бабаян М.А., Симонян Г.М. Биохимия, 1995, т.60, 12, с.77.

7. Симосян М.А., Карапетян А.В., Бабян М.А., Симосян М.А. Биохимия, 1996, т.61, 5, с.932.
8. Симосян М.А., Симосян Г.М. Способ получения металлопротеинов. Лицензия №341 Армпатента. Ереван, 1997.
9. Симосян М.А., Симосян Г.М., Симосян Р.М. Способ получения цитохромов из эритроцитарных мембран. Лицензия изобрет. N908 Армпатента, Ереван, 2001.
10. Симосян Р.М., Симосян Г.М., Бабян М.А., Симосян М.А. Медицинская наука Армении, 2004, 1, с.43.
11. Симосян Р.М., Симосян Г.М., Бабян М.А., Симосян М.А., Галоян А.А. Медицинская наука Армении, 2003, 3, с.13.
12. Симосян Г.М., Симосян Р.М., Бабян М.А., Карапетян А.В., Симосян М.А. Медицинская наука Армении, 2003, 1, с.30.
13. Симосян Г.М. Оксидативный стресс при злокачественных новообразованиях. Автореф. дисс. канд. Ереван, 2003.
14. Сообщение об общеевропейском согласительном совещании по ведению больных с инсультом. 8-10 ноября 1995. Хельсинборг. Неврол. журн., 1997, 1, с. 49.
15. Торосян В.Э. Нейровизуализация структурно-функциональных изменений в динамике развития ишемического инсульта. Автореф. дисс. канд. Ереван, 2002.
16. Aiboshi J., Moore E.E., Ciesla D.J., Silliman C.C. Shock, 2001, 15(4), p.302.
17. Darii V.I. Lik. Sprava, 2001, 1, p.46.
18. Elliott R.M., Southon S., Archer D.B. Free Radic. Biol. Med., 1999, 26(5-6), p. 646.
19. Eum W.S., Kim D.W., Hwang I.K. et al. Free Radic. Biol. Med., 2005, 38(3), p.4065.
20. Gulcan H., Ozturk I.C., Arslan S. Biol. Neonat., 2005, 88 (2), p.87.
21. Hakobyan V.P., Melkonyan K.V., Manukyan A.H. 60th Intern. Congress of FIP, Vienna, Austria, 2000, CBS.228.
22. Hakobyan V.P., Manukyan A.H., Simonyan M.A. 11th Panhellenic Pharmaceutical Congress. Athens, 2003. p.58.
23. Karageuzyan K.G., Sekoyan E.S., Karagyan A.T. et al. Biochemistry (Moscow), 1998, 63, 10. p.1439.
24. Liu J., Mori A. Neurochem. Res., 1999, 24. 11. p.1479.
25. Sheng H., Bating-Haberle I., Warner D.S. Drug News Perspect., 2002, 15(10), p.654.