

Факторы оксидативного повреждения крови больных эссенциальной гипертонией

Т.Г.Узунян¹, Р.Г.Бороян¹, М.А.Симонян²

¹ Кафедра клинической фармакологии и фармации ЕрГМУ им. М.Гераци

² Институт биохимии им. Г.Х. Буятыана НАН РА

375025, Ереван, ул. Корюна, 2

Ключевые слова: эссенциальная гипертония, кровь, оксидативное повреждение

Допускается, что в молекулярно-биохимические механизмы патогенеза эссенциальной гипертонии (ЭГ) вовлечены процессы, сопровождаемые развитием оксидативного стресса. Однако при ЭГ систематические исследования, изучающие роль и механизмы оксидативного повреждения экстрацеллюлярных и внутрицеллюлярных анти- и прооксидантных систем, изучены недостаточно. Установлено, что у больных ЭГ первой степени (артериальное давление в диапазоне от 140/90 до 160/100 мм рт.ст.) наблюдается снижение уровня тиоловых групп в плазме и нет корреляции с показателями уровня артериального давления (АД), а активность супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы не изменяется. Однако у больных ЭГ второй и третьей степени (уровни АД от 160/100 до 180/110 и >180/>110 мм рт.ст. соответственно) наблюдается снижение активности этих ключевых ферментов антиоксидантной активности, на фоне повышения активности глутатионпероксидазы (ГПО). Изменения активности СОД, каталазы и ГПО в плазме больных ЭГ всех степеней связываются с различием интенсивности оксидативного повреждения активными формами кислорода (АФК) [21]. При этом в результате реагирования АФК с липидными компонентами биомембран (включая и эритроцитарные мембраны) образуются гидроперекиси. Этот деструктивный процесс известен как перекисное окисление липидов (ПОЛ). Далее эти гидроперекиси превращаются в малоновый диальдегид (МДА), который является одним из продуктов ПОЛ и индикатором оксидативного повреждения клеток и тканей, причем эндогенные антиоксидантные системы противо-

действуют этому процессу и снижают уровень оксидативного повреждения. АФК вовлечены и в процесс нарушения функции эндотелиальных клеток сосудов.

Различные антигипертензивные лекарства помимо гипотензивного действия обладают также антиоксидантными свойствами. До прохождения лечения ЭГ антигипертензивными лекарствами уровень МДА в сыворотке крови повышается, а активность СОД снижается. Так, до прохождения курса лечения ЭГ антигипертензивными лекарствами уровень МДА в сыворотке крови бывает высоким, а активность СОД низкая, однако после трехмесячного курса лечения наблюдается существенное регулирование уровня этих биохимических показателей, на основании чего сделано заключение о том, что ЭГ ассоциируется повышением оксидативного стресса и снижением антиоксидантного статуса [22]. В этих условиях положительный антистрессорный эффект оказывает препарат ацебулол (селективный бета₁-адреноблокатор) путем регулирования антиоксидантного статуса в эритроцитах [18]. После шестимесячной терапии больных ЭГ антагонистом кальция — бинидипином наблюдается снижение повышенного уровня АФК продуцируемыми НАДРН-зависимыми оксидазами, локализованными в лейкоцитах. Выявлена корреляция между уровнями АФК систолическим артериальным давлением (САД) и диастолическим артериальным давлением (ДАД) при лечении этим лекарством [23]. Антигипертензивная терапия антагонистом ангиотензина АП кандесартоном и антагонистом кальция амлодипином также снижает уровень клеточного

оксидативного повреждения [20]. При атеросклерозе и ЭГ наблюдается стимулирование процесса оксидативного повреждения эритроцитарных мембран (ЭМ), что вызывает повышение уровня холестерина в сыворотке крови, степени гемолиза, снижение уровня глутатиона и текучесть ЭМ, особенно при ожирении. В результате этого снижается тканевая оксигенация [11]. При ЭГ наблюдается также окисление и инактивирование нитроксильного радикала, что вызывает нарушение функции сосудов и изменение АД. При этом терапия ингибитором ангиотензин-превращающего фермента эналаприлом и ингибитором ангиотензина АП лозартаном помимо снижения САД и ДАД существенно снижает уровень МДА в плазме, глутатиона и нитроксила. Этим обусловлен антиоксидантный эффект этих лекарств [13]. Уровень перекиси водорода в плазме крови больных ЭГ также резко повышается. В результате увеличивается и стационарная концентрация высокоактивных гидроксильных радикалов ($\text{HO}^\bullet$), которые оказывают деструктивное действие почти на все биосистемы, включая регуляторные системы функционирующего эндотелия сосудов [19]. При этом наблюдается протективный эффект при лечении антагонистами кальция дигидропиридинового ряда [12].

Роль и состояние супероксид-продуцирующих оксидаз при атеросклерозе и ЭГ, их регуляция на клеточном уровне при оксидативном повреждении этих клеток еще полностью не установлены, однако было показано, что экспрессия и регуляция этих оксидаз осуществляется соответствующими цитокинами [17]. При этом НАДРН-зависимые оксидазы участвуют в процессе продуцирования супероксидов и в нефагоцитирующих клетках [16], а человеческие эндотелиальные клетки в культуре клеток экспрессируют мРНК и белок для цитозольного компонента фагоцитирующих супероксид-продуцирующих оксидаз [14].

С разработкой комплексного способа одновременного количественного и качественного определения как известных металлопротеинов антиоксидантной активности (МАО), так и новых типов металлопротеинов прооксидантной активности (МПА) крови и с выявлением их биологической роли [8,9], становится актуальным определение уровня и активности этих металлопротеинов (МП) в крови больных ЭГ для оценки молекулярно-

биохимических механизмов патогенеза ЭГ как результата нарушения анти- и прооксидантного статуса крови.

Целью настоящей работы явилось определение характерных изменений уровня и активности МАО и МПА в крови больных ЭГ с неконтролируемым АД (уровень АД > 140/90 мм рт. ст.)

Материал и методы

Была обследована кровь больных ЭГ с неконтролируемым АД (14 мужчин и женщин в возрасте 38–69 лет с давностью заболевания 2–4 года). В качестве контроля была использована донорская кровь лиц с нормальным АД.

МАО (Cu^- , Zn^- -СОД, каталаза, полученные из растворимой фракции эритроцитов, церулоплазмин (ЦП) и трансферрин (ТФ) – из сыворотки крови) и МПА (нейтральные изоформы цитохрома b558: цит b558III, b'558III, b558IV, b558'IV и цит b558 – из эритроцитарных мембран, супероксид-продуцирующий липопротеин сыворотки – супрол и цитохром b5 – из растворимой фракции эритроцитов) получали из крови больных ЭГ и донорской крови биотехнологическим способом, избегая использования детергента для солиubilизации белков из ЭМ [5,6].

При этом пробы очищенных ЭМ (по 5 мл, смешанные с 0,04 М калий фосфатным буфером, pH 7,4) отделяли для определения O_2^- - продуцирующей и метгемоглобин (метHb)-восстанавливающей активности цит b558III [9] в гетерогенной фазе. Количество полученных МП определяли измерением плотности максимального оптического поглощения, характерного для цит b5 при 525 нм, для изоформ цит b 558 сыворотки и ЭМ – 530, супрола – 430, ЦП – 610 и ТФ – 470 нм (гомоформа).

Супероксиддисмутазную активность фермента и O_2^- - продуцирующую активность супрола и цит b558III [8] определяли нитротетразолиевым синим (НТС), путем вычисления процента подавления (в случае СОД) или стимулирования (в случае супрола и цит b558III) образования формазана (при 560 нм). За единицу активности СОД принимали то количество фермента, которое вызывает 50% ингибирование образования формазана при восстановлении НТС супероксидными радикалами. За единицу O_2^- - продуцирующей активности

супрола или цит b558III принимали количество белка, способного стимулировать образование формазана на 50%. Каталазную активность фермента определяли перманганатометрическим методом, рассчитав количество белка, расщепляющего 0,1М перекиси водорода за 1 мин при 20° С. МетНб-восстанавливающую активность цит b558III определяли *in vitro*, используя свежеполученный метНб (ферриНб) крови человека. При этом величина оптического поглощения альфа-полосы (при 565 нм) метНб составляла 0,9, а величина поглощения бета-полосы используемого цит b558III (при 530 нм) в реакционной смеси составляла 0,04. Непосредственно в кварцевых кюветах спектрофотометра к 2,5 мл раствора метНб добавляли 0,2 мл цит b558III или 0,2 мл ЭМ, смешанных с 0,04 М калий-фосфатным буфером (КФБ), pH 7,4. После быстрого перемешивания реакционной смеси ее инкубировали в покое в аэробных условиях *in vitro* в течение 10–15 ч при 30°С. Затем после быстрого смешивания реакционной смеси была определена кинетика восстановления метНб до ферроНб путем измерения снижения интенсивности плотности альфа-поглощения метНб уже в течение 1,5–2 ч при 30°С. Это снижение прямо пропорционально образовавшемуся ферроНб, который имеет максимальное оптическое поглощение при 555 нм. Для определения степени рилизинга (самоотщепления) из ЭМ последние были инкубированы с 0,04 М КФБ в течение 5 дней при 4°С и уровень отщепленной суммарной фракции изоформ цит b558 ЭМ определяли в супернатанте после соответствующей ионообменной хроматографии [10].

Оптические спектральные измерения осуществляли на спектрофотометре «Specord UV-VIS» (Германия) с длиной оптического пути 1 см. Статистическую обработку полученных результатов осуществляли методом вариационной статистики Стьюдента-Фишера с определением критерия достоверности (Р).

Результаты и обсуждение

Сразу же после поступления в клинику больных ЭГ в крови их наблюдалось значительное повышение уровня цит b5 – переносчика электрона для НАДРН-зависимой метНб-редуктазы в цитозоле эритроцитов (табл.1). Это свидетельствует о

Таблица 1

Относительное изменение (%) уровня и активности МПА и МАА крови больных ЭГ с неконтролируемым АД по сравнению с 100% контрольными показателями донорской крови, $P < 0,05$, $n = 8$

МП и их активность	Изменение
Цит b5	+84,2±5,4
Цит b558III	+59,2±4,8
Цит b'558III	+21,3±3,1
Цит b558 нейтрального характера	+41,7±3,3
Цит b558IV	+219,7±25,3
Цит b'558IV	+19,1±3,9
Степень рилизинга изоформ цит b558 из ЭМ	+40,0±3,4
Степень комплексообразования цит b558 с Нб	+91,5±8,2
Супероксид-продуцирующая активность цит b558III в гомогенной фазе	+41,7±4,2
Супероксид-продуцирующая активность цит b558III в гетерогенной фазе в ЭМ	+33,8±2,7
МетНб-восстанавливающая активность цит b558III в гомогенной фазе	+22,0±1,8
Мет Нб-восстанавливающая активность цит b558III в гетерогенной фазе в ЭМ	+49,7±5,5
Супрол	+22,6±3,3
Супероксид-продуцирующая активность супрола	+93,2±6,1
Церулоплазмин	-52,7±4,9
Трансферрин	-11,2±1,6
Сu,Zn-СОД	-56,8±7,1
Каталаза	-43,2±4,1

наличии сердечно-сосудистого фактора риска – гиподинамии у больных ЭГ [2]. При этом увеличивались уровни МПА в ЭМ, и в частности ключевой изоформы цит b558 ЭМ – цит b558III, с увеличением его НАДРН-зависимой супероксид-продуцирующей и метНб-восстанавливающей активности в гомогенной и особенно в гетерогенной фазе (в ЭМ). Увеличивались и уровни других изоформ цит b558 ЭМ. Это свидетельствует о существенном изменении гемопротеинового состава ЭМ [4], как результат оксидативного повреждения этих мембран АФК. При этом стабильность ЭМ существенно снижалась в результате повышения степени рилизинга цит b558 из ЭМ [10], проникновения Нб в ЭМ и вхождения в нестабильное комплексное соединение с цит b558. Из-за повышения супероксид-продуцирующей активности цит b558III увеличивалась стационарная концентрация

супероксидных радикалов, что, с одной стороны, является положительным явлением для стимулирования метаболических процессов с их участием в ЭМ, с другой – продуцированные супероксиды могут пагубно влиять на состояние окружающих биосистем и в первую очередь на фосфолипидные остатки ЭМ. Повышение метНб-восстанавливающей активности цит b 558III особенно в гетерогенной фазе (в ЭМ) есть ответ адаптационных механизмов организма для сохранения кислородного гомеостаза и полноценной оксигенации клеток, причем усиление метНб-восстанавливающей активности цит b558III – характерное явление для ряда сердечно-сосудистых заболеваний [1]. При ЭГ несколько повышается уровень и активность супероксид-продуцирующего липопротеина сыворотки – супрола со снижением его стабильности (увеличивается степень агрегации и потери растворимости этого липопротеина). Это связано с увеличением уровня супероксидов, соответственно и перекиси водорода (как продукта ферментативного дисмутирования супероксидов [15]), и $\text{HO}^\bullet$ -радикалов, которые стимулируют ПОЛ фосфолипидных остатков самого супрола, вызывая его агрегацию. Приведенные изменения супрола могут вызывать увеличение вязкости сыворотки, образование атеросклеротических бляшек внутри сосудов и нарушать гемодинамику при ЭГ.

У больных ЭГ с неконтролируемым АД активность антирадикальной защитной системы сыворотки крови и эритроцитов существенно снижена (характерный синдром ЭГ) [18, 21–23] (табл. 1), это закономерно, если учесть то обстоятельство, что заметно увеличены уровень и активность МПА сыворотки и эритроцитов. При этом продуцированные супероксиды могут превращаться в $\text{HO}^\bullet$ -радикалы, которые способны необратимо инактивировать $\text{Cu}, \text{Zn-SOD}$, каталазу и ЦП. При повышенных концентрациях гидроксильные радикалы также необратимо деградируют и МПА-изоформы цит b558 ЭМ *in vitro* [7]. С другой стороны, в ЭМ уровень СОД и каталазы невысокий, по сравнению с цитозолем эритроцитов, соответственно невысока и стационарная концентрация перекиси водорода [15] и гидроксильных радикалов. Однако это не означает, что в ЭМ невозможен процесс деструктирования изоформ цит b558 гидроксильными радикалами или другими активными интермедиатами аэробного метаболизма.

Это зависит и от других факторов, сопутствующих дестабилизации ЭМ при различных заболеваниях [3].

Снижение уровня МАА и повышение уровня МПА создает определенный дисбаланс между ними с характерным изменением антиоксидантного статуса (АС) (расчетный суммарный уровень МАА) и прооксидантного статуса (ПС) (расчетный суммарный уровень МПА) сыворотки крови и эритроцитов (табл. 2). Полученные результаты служат основанием для применения комбинированной терапии с экзогенными препаратами антиоксидантной активности, в первую очередь хелаторами $\text{HO}^\bullet$ -радикалов и препаратами с СОД-миметической активностью.

Таблица 2

Изменение АС и ПС (%) в сыворотке крови и эритроцитах у больных ЭГ с неконтролируемым АД по сравнению с 100% контрольными показателями донорской крови, $P < 0,03$, $n = 8$

Компоненты крови	АС	ПС
Сыворотка	-61,2 ± 3,4	+32,6 ± 3,4
Эритроциты	-105,4 ± 8,2	+278,7 ± 41,3

Таким образом, при неконтролируемой ЭГ молекулярно-биохимические механизмы оксидативного повреждения компонентов крови связываются:

- с резким снижением стабильности ЭМ, как результат увеличения степени рилинга изоформ цит b558 из ЭМ и комплексообразования Нб с этими изоформами,
- с соответственным увеличением уровня МПА,
- увеличением НАДРН-зависимой супероксид-продуцирующей и метНб-восстанавливающей активности цит b558III,
- со снижением стабильности супрола на фоне снижения уровня МАА, вызывая нарушение физиологического равновесия между МАА и МПА и изменение АС и ПС сыворотки крови и эритроцитов.

Поступила 06.02.07

Էսենցիալ հիպերտոնիայով հիվանդների արյան օքսիդատիվ վնասման գործոնները

Տ.Հ. Ուզունյան, Ռ.Գ. Բորոյան, Մ.Ա. Սիմոնյան

Գնահատվել է արյան հակաօքսիդանտային ակտիվությամբ օժտված մետաղապրոտեինների (ՀՕՍ) և պրոօքսիդանտային ակտիվությամբ օժտված մետաղապրոտեինների (ՊՕՍ) քանակության փոփոխությունը չկարգավորված զարկերակային ճնշմամբ (ՁՃ) ($\text{ՁՃ} > 140/90$ մմ սս) էսենցիալ հիպերտոնիայով (ԷՀ) հիվանդների մոտ:

Հետազոտվել է ԷՀ-ով 14 հիվանդի (38-69 տարեկան և 2-4 տարի հիվանդության տևողությամբ) արյուն: Որպես ստուգիչ ծառայել է ԷՀ-ով չտառապող անձանց ղոնորակալ արյունը: ՀՕՍ-երը (երիթրոցիտների լուծելի ֆրակցիայից ստացված Cu-, Zn- սուպերօքսիդիսմուտազ (ՍՕԴ) և կատալազ, այլան շիճուկից ստացված ցեռուլոպլազմինը և տրանսֆերինը) և ՊՕՍ (ցիտոքրոմ (ցիտ) b558 չեզոքային իզոմերը՝ ցիտոքրոմ b558III, b'558III, b558IV, b'558IV, երիթրոցիտար թաղանթների ցիտոքրոմ b558, սուպրոլը և երիթրոցիտների լուծելի ֆրակցիայի ցիտոքրոմ b5) անջատվել են ԷՀ-ով հիվանդների և ղոնորակալ արյունից կենսատեխնոլոգիական եղանակով՝ առանց երիթրոցիտար թաղանթների սպիտակուցները լուծող դետերգենտի օգտագործման: Ստացված մետաղապրոտեինների քանակությունը գնահատվել է

մաքսիմալ օպտիկական կլանման խտության չափումով:

Պարզվել է, որ ՀՕՍ և ՊՕՍ-երի քանակությունն ու ակտիվությանը բարձր էին՝ համեմատած ղոնորակալ արյան 100% ցուցանիշների հետ ($P < 0.05$):

Այսպիսով եզրակացվում է, որ չկարգավորվող ՁՃ-ով ԷՀ-ով հիվանդների արյան բաղադրամասերի օքսիդատիվ վնասման մեխանիզմները առնչվում են:

- ԷԹ կայունության կտրուկ նվազման հետ՝ ցիտb558-ի իզոմերների՝ ԷԹ-ից արտազատման աստիճանից բարձրացման, հեմոգլոբինի ԷԹ մերթափանցման ու ցիտ b558 III-ի հետ անկայուն կոմպլեքսագոյացման հետևանքով;

- ՊՕՍ-երի մակարդակի բնութագրական աճման հետ;

- ցիտ b558III-ի ՆԱԴ-PH-կախյալ սուպերօքսիդ գոյացնող և մետHb վերականգնող ակտիվությունների աճման հետ;

- սուպրոլի անկայունացման հետ;

- շիճուկի և երիթրոցիտների ՀՕՍ և ՊՕՍ միջև առկա ֆիզիոլոգիական հավասարակշռության խախտման, համապատասխանաբար դրանցում հակա- և պրոօքսիդանտային կարգավիճակների փոփոխման հետ:

The factors of blood oxidative damage in patients with essential hypertension

T.H. Uzunyan, R.G. Boroyan, M.A. Simonyan

Quantitative changes of metalloproteins with anti- and prooxidative activity (MAA and MPA) were evaluated in patients with essential hypertension (EH) with uncontrolled blood pressure (BP) ($\text{BP} > 140/90$ mm Hg).

We studied blood samples of 14 patients with EH (within 38-69 years of age and 2-4 years of disease duration). As a control we used blood samples from donors without EH. MAAs (Cu-, Zn-SOD soluble fraction of erythrocytes and catalase, ceruloplasmin and transferrin obtained from blood serum) and MPAs (neutral isoforms of cyt b558: cyt b558III, b'558III,

b558IV, b' 558IV, cyt b558 of erythrocyte membranes (EM) and cyt b5 from soluble fraction of erythrocytes) were obtained from blood samples of patients and donors by biotechnological method without use of detergent solubilizing EM proteins. The amount of obtained metalloproteins was determined by measuring the density of maximal optical absorption.

It was revealed that the amount and activity of MPAs and MAAs were increased (%) compared to 100% values of donor blood ($P < 0.05$). According to the obtained results it is concluded that the mechanisms of blood oxidative damage can be explained by:

- sharp decreased stability of EM, as a result of the increase of the releasing degree of cyt b558 from EM, penetration of Hb into EM and formation of the unstable complex with cyt b558III in EM,
- characteristic increase in the level of prooxidative activity of metalloproteins,
- increase in NADPH-depending superoxide-pro-

ducing and methemoglobin (metHb)-reducing activity of cyt b558III,

- decrease in the stability of suprol
- change of the physiological balance between metalloproteins of anti- and prooxidative activity and corresponding changes of anti- and prooxidative statuses of the blood serum and erythrocytes.

Литература

1. Алексанян Серг.С., Симонян Г.М., Алексанян А.С., Симонян М.А. Вопросы теорет.клин.мед., 2004, 7 (4), с. 25-28.
2. Аюбян В.П., Симонян М.А., Манукян А.А., Симонян Р.М., Аюбян А.А. Биол.эксп.биол.мед., 2001, 11, с.527-529.
3. Симонян Г.М. Мед.наука Армении НАН РА, 2002, XLII, 2, с. 101-105
4. Симонян М.А., Галоян А.А., Симонян Г.М. ДНАН РА, 1997, 97, с. 62-66.
5. Симонян М.А., Симонян Г.М. Способ получения металлопротеинов крови. Лицензия изобрет. 341 Армпатента. Ереван, 1997.
6. Симонян М.А., Симонян Г.М., Симонян Р.М. Способ получения цитохромов из мембран эритроцитов. Лицензия изобрет. 908 Армпатента. Ереван, 2001.
7. Симонян Г.М., Симонян Р.М., Симонян М.А. В кн.: Актуальные вопросы военной медицины. Гос.Мед. университет им.М.Герацци, Ереван, 1999, с.48-51.
8. Симонян Г.М., Симонян Р.М., Бабалян М.А., Карапетян А.В., Симонян М.А. Мед.наука Армении НАН РА, 2003, XLIII, 1, с.30-34
9. Симонян Р.М., Симонян Г.М., Бабалян М.А., Симонян М.А. Мед.наука Армении НАН РА, 2004, XLIV, 1, с.43-46.
10. Симонян Р.М., Симонян Г.М., Бабалян М.А., Симонян М.А., Галоян А.А. Мед.наука Армении НАН РА, 2003, XLIII, 3, с. 13-18.
11. Cazzola R., Randanelli M., Russo V.S. et al. J.Lipid.Res., 2004, 45(10), p.1846-1851.
12. Digesi V., Fiorillo C., Cosmi L. et al. Clin.Ther., 2000, 151(1), p.15-18.
13. Donmez G., Derici U., Erbar D. et al. Jpn. J.Physiol., 2002, 52(2), p.435-440.
14. Jones S/A., O'Donnel V.B., Wood J.D. et al. Am.J.Physiol., 1996, 271(4P2), H1626-H1634.
15. Fridovich I. Annu.Rev.Biochem., 1995, V.64, p.97-112.
16. Fukui T., Lassegue B., Kai H. et al. Biochim.Biophys.Acta, 1995, 1231(3), p.215-219.
17. Kalinina N., Agrotis A., Tararak E. et al. Atheroscler. Thromb.Vasc.Biol., 2002, 22(12), p.2037-2043.
18. Krouf D., Bouchenak M., Mohammed M. et al. Hypertens. Res., 2005, 28(2), p.107-112.
19. Lacy F., Kailasam M.T., O'Conner D.T. et al. Hypertension, 2000, 36(5), p.878-884.
20. Muda P., Kampus P., Zilmer M. et al. J.Hypertens., 2005, 23(1), p.105-112.
21. Simin D.V., Mimic-Oka J., Pljesa-Ercegovac M. et al. J.Hum.Hypertens., 2006, 20(2), p.149-155.
22. Tandon R., Singh M.K., Garg H. et al. Natl.Med.J.India, 2005, 18(6), p.297-299.
23. Yasumari K., Maeda K., Nakamura M. et al. Hypertens.Res., 2005, 28(2), p.107-112.