

Тихазе А. К.¹, Косач В. Я.², Ланкин В. З.¹, Панферова А. А.¹, Смирнова М. Д.¹

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Минздрава России, Москва, Россия

² ГБУЗ «ГКБ им. В. В. Вересаева» Департамента здравоохранения г. Москвы, Москва, Россия

ПОКАЗАТЕЛЬ, ХАРАКТЕРИЗУЮЩИЙ КАРБОНИЛЗАВИСИМУЮ МОДИФИКАЦИЮ ЭРИТРОЦИТАРНОЙ СУПЕРОКСИДИСМУТАЗЫ КАК БИОХИМИЧЕСКИЙ МАРКЕР ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА ПРИ ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ СЕРДЦА

Цель	Изучить окислительную модификацию эритроцитарной Cu,Zn-супероксиддисмутазы (СОД) у больных ишемической болезнью сердца (ИБС) <i>in vivo</i> и <i>in vitro</i> для обоснования использования нового маркера окислительного стресса.
Материал и методы	Активность эритроцитарной Cu,Zn-СОД определяли по подавлению восстановления синего нитротетразолия супероксидным анион-радикалом, генерируемым при окислении ксантина ксантиноксидазой. Содержание эритроцитарной Cu,Zn-СОД определяли с помощью иммунохимического метода. Биохимические исследования осуществляли в контрольной группе (больные с переломами нижних конечностей без известного анамнеза сердечно-сосудистых заболеваний и гиперлипидемии); в группах больных острым инфарктом миокарда, больных со стабильной стенокардией и больных с декомпенсацией сердечной недостаточности. Для оценки выраженности окислительного стресса у больных ИБС предложено использовать эмпирический коэффициент окислительной модификации СОД (КФМ _{СОД}), представляющий собой отношение: активность Cu,Zn-СОД/содержание Cu,Zn-СОД.
Результаты	Установлено, что активность эритроцитарной Cu,Zn-СОД во всех группах больных ИБС была достоверно снижена по сравнению с таковой в контрольной группе, причем коэффициент КФМ _{СОД} также значительно снижен у больных ИБС, что может служить основанием для использования этого биохимического показателя в качестве маркера окислительного стресса.
Заключение	Показано, что модификация Cu,Zn-СОД вызвана взаимодействием молекул фермента с природным дикарбонилом – малоновым диальдегидом, причем КФМ _{СОД} может быть использован для оценки выраженности окислительного стресса у больных ИБС.
Ключевые слова	Эритроцитарная супероксиддисмутаза; природные дикарбонилы; окислительный стресс; коэффициент модификации; ишемическая болезнь сердца
Для цитирования	Tikhaze A. K., Kosach V. Ya., Lankin V. Z., Panferova A. A., Smirnova M. D. Indicator Characterizing Carbonyl-Dependent Modification of Erythrocytic Superoxidismutase as a Biochemical Marker of Oxidative Stress in Coronary Heart Disease. <i>Kardiologiia</i> . 2020;60(5):57–61. [Russian: Тихазе А. К., Косач В. Я., Ланкин В. З., Панферова А. А., Смирнова М. Д. Показатель, характеризующий карбонилзависимую модификацию эритроцитарной супероксиддисмутазы как биохимический маркер окислительного стресса при ишемической болезни сердца. <i>Кардиология</i> . 2020;60(5):57–61.]
Автор для переписки	Панферова Анна Александровна. E-mail: panfyorowa.aniuta@yandex.ru

Большое количество наблюдений свидетельствует, что окислительный стресс играет важную роль в этиологии и патогенезе атеросклероза, сахарного диабета и нейродегенеративных заболеваний [1–6]. При окислительном стрессе в процессе атеросклероза и ишемической болезни сердца (ИБС) происходит свободно-радикальное окисление полиеновых ацилов фосфолипидов наружного слоя частиц липопротеинов низкой плотности (ЛНП) – основного компонента липидтранспортной системы плазмы крови [1]. Ацилгидроперокси-производные фосфолипидов частиц ЛНП претерпевают дальнейшую окислительную деструкцию, приводящую к накоплению различных альфа-оксоальдегидов, таких как 4-гидроксиноненаль и другие ноненали, а так-

же образующийся в наибольшем количестве малоновый диальдегид (МДА) [1]. Альдегидные группы МДА способны быстро реагировать со свободными аминокислотными группами белков, что вызывает их структурно-функциональную модификацию [1]. В частности, подобной модификации может подвергаться апопротеин В-100 частицы ЛНП, причем такие карбонил-модифицированные ЛНП опознаются и эффективно захватываются при помощи скэвенджер-рецепторов клетками стенки сосудов, что приводит к накоплению в них этих атерогенных ЛНП и образованию предатерогенного (липоидозного) повреждения стенки сосуда [1]. Очевидно, что карбонильной модификации могут подвергаться и другие белки плазмы крови, а также белки клеточных элемен-

тов крови. Это тем более вероятно, что трехуглеродная молекула МДА вследствие малого размера и высокой гидрофильности, по-видимому, может легко проникать через поры и каналы различных клеточных мембран. Ранее нами было показано, что у больных сахарным диабетом (СД) 2-го типа с выраженными нарушениями углеводного обмена (высокий уровень гликированного гемоглобина) наблюдается не только повышенный уровень карбонил-модифицированных ЛНП в плазме крови, но и весьма значительное снижение активности эритроцитарной супероксиддисмутазы (Cu,Zn-SOD) [7]. Это, вероятно, может быть вызвано накоплением в плазме крови больных СД дикарбониллов, отличных от МДА, – его гомолога глиоксаля и изомера метилглиоксаля, которые образуются при гипергликемии вследствие автоокисления глюкозы и ферментативного окисления триозофосфатов, накапливающихся в процессе гликолиза. Исходя из этого, целью настоящей работы было исследование возможности карбонильной модификации эритроцитарной Cu,Zn-SOD, что может сопровождаться ингибированием активности фермента и нарушением его функционирования. Следует отметить, что проведение подобной работы является весьма актуальным вследствие отсутствия научно обоснованных маркеров окислительного стресса, использование которых представляется необходимым для коррекции окислительного стресса у больных ИБС и оценки эффективности проводимой терапии.

Материал и методы

В исследование были включены 72 пациента, мужчины в возрасте 50–70 лет (средний возраст $61,3 \pm 0,78$ года), госпитализированные в ГКБ им. В. В. Вересаева по экстренным показаниям. В основную группу были включены 56 пациентов с верифицированной ИБС (диагноз ИБС был установлен на основании результатов коронарографии), причем у всех больных были диагностированы гипертоническая болезнь III стадии и дислипидемия. Чрескожное коронарное вмешательство перенесли 40 больных ИБС. Все больные были распределены на 3 группы: 1-ю ($n=32$; средний возраст $60,1 \pm 1,0$ года) составили больные с острым инфарктом миокарда; 2-ю ($n=8$; средний возраст $62,1 \pm 1,3$ года) – больные со стабильной стенокардией II–III функционального класса, госпитализированные для плановой реваскуляризации; 3-ю ($n=16$; средний возраст $63,3 \pm 1,0$ года) – больные с декомпенсированной хронической сердечной недостаточностью (ХСН). В контрольную группу вошли 16 мужчин (средний возраст $56,8 \pm 1,9$ года) из отделения травматологии с переломами нижних конечностей без известного анамнеза сердечно-сосудистых заболеваний и гиперлипидемии с умеренным риском развития сердечно-сосудистых осложнений по шкале SCORE (3–4%). Все группы паци-

ентов были сопоставимы по возрасту (см. табл. 1). У пациентов основной группы образцы крови для биохимических анализов брали при поступлении в клинику непосредственно после осмотра кардиолога и подписания информированного согласия. Пациенты контрольной группы также подписали информированное согласие на проведение биохимического исследования, которое осуществляли через 1–2 нед после травмы на стадии образования костной мозоли.

Активность Cu,Zn-SOD определяли в эритроцитах, выделенных из венозной крови пациентов, взятой натощак в присутствии 1 мг/мл ЭДТА в качестве антикоагулянта и антиоксиданта. Эритроциты лизировали в 5 mM K,Na-фосфатном буфере pH 7,4 в течение 15 мин в ледяной бане. Лизат эритроцитов центрифугировали в течение 10 мин при 20 тыс. об/мин в рефрижераторной лабораторной центрифуге Sigma 3-16KL (Япония), после чего к 5 объемам супернатанта добавляли 2 объема смеси хлороформ/этанол (3:5) и встряхивали на Vortex Elmi SkyLine. Выпавший осадок гемоглобина удаляли центрифугированием. Активность Cu,Zn-SOD в супернатанте определяли по подавлению скорости восстановления нитротетразолия синего супероксидным анион-радикалом, генерируемым в процессе окисления ксантина ксантиноксидазой [8]. Кинетику восстановления нитротетразолия синего регистрировали при 560 нм на спектрофотометре Shimadzu UV-2600. За единицу активности Cu,Zn-SOD принимали количество фермента, необходимое для 50% подавления восстановления нитротетразолия синего в условиях реакции. Активность SOD выражали в единицах активности/г гемоглобина. Содержание Cu,Zn-SOD определяли в крови, используя тест-набор Human Cu/Zn-SOD Elisa kit. На основании данных об активности и содержании SOD рассчитывали эмпирический коэффициент окислительной модификации эритроцитарной Cu,Zn-SOD (KFM_{SOD}), который представляет собой отношение активности Cu,Zn-SOD (ед/г гемоглобина)/содержание Cu,Zn-SOD (нг/г гемоглобина). В модельных экспериментах исследовали влияние модификации внутриэритроцитарной Cu,Zn-SOD природным дикарбониллом МДА на активность фермента, для чего эритроциты, изолированные из крови доноров (практически здоровые мужчины 30–40 лет), инкубировали в течение 3 ч в изотоническом фосфатном буфере pH 7,4 в присутствии 10 mM МДА, полученного кислотным гидролизом его полуацетала – 1,1,4,4-тетраэтоксипропана в соответствии с описанным ранее методом [9].

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием пакета программ SPSS 14 for Windows version 7. Данные в таблице и на рисунках представлены в виде среднего и стандартного отклонения, при этом для межгруппового сравнения использовали

Таблица 1. Активность Cu,Zn-супероксиддисмутазы и содержание фермента в эритроцитах больных ИБС

Группа	Возраст, годы	Активность Cu,Zn-СОД, ед/г Нб	Содержание Cu,Zn-СОД, нг/г Нб	КФМ _{СОД}
Контроль (травма); n=16	56,8±1,9	880,0±58,0	390,0±20,0	2,30±0,17
1-я (острый инфаркт миокарда; n=32)	60,1±1,0	543,2±27,4*	349,2±13,4	1,63±0,09*
2-я (стабильная стенокардия; n=8)	62,4±1,3	536,1±40,6*	411,6±45,2	1,38±0,14*
3-я (декомпенсированная ХСН; n=16)	63,3±1,5	533,7±12,1*	377,3±6,4	1,50±0,03*

* – $p < 0,001$ при сравнении с контрольной группой. ИБС – ишемическая болезнь сердца; Нб – гемоглобин; ХСН – хроническая сердечная недостаточность; СОД – супероксиддисмутаза; КФМ_{СОД} – коэффициент окислительной модификации супероксиддисмутазы.

непараметрический критерий Манна–Уитни. В целях выявления и оценки связи между двумя рядами сопоставимых количественных показателей применяли коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

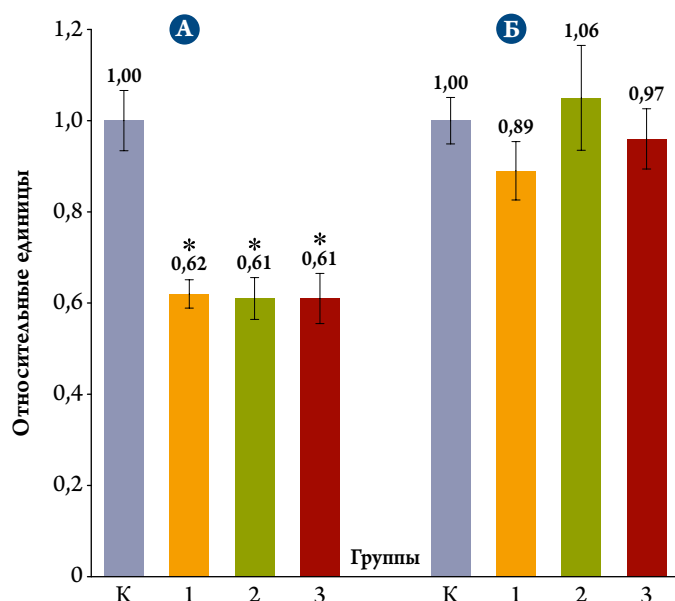
Результаты и обсуждение

Основные результаты работы представлены в таблице 1, из которой видно, что активность эритроцитарной Cu,Zn-СОД во всех группах больных ИБС была снижена по сравнению с контрольной группой (рис. 1) практически в равной степени.

Так, активность Cu,Zn-СОД в эритроцитах больных 1-й группы была снижена на 38%, активность Cu,Zn-СОД в эритроцитах больных 2-й группы – на 39%, активность

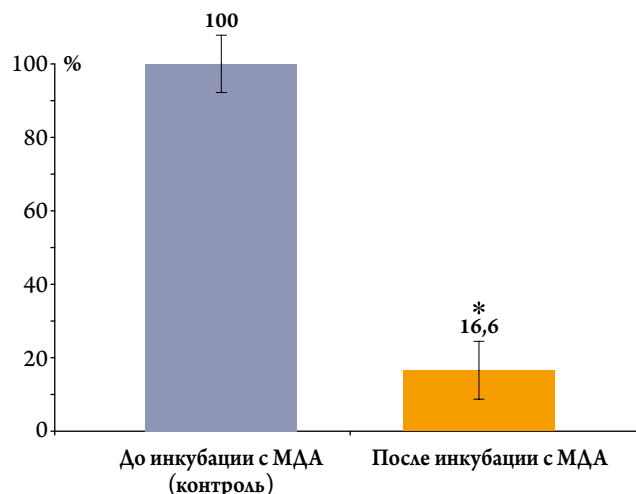
Cu,Zn-СОД в эритроцитах больных 3-й группы – на 39% (см. табл. 1). В то же время содержание этого фермента в эритроцитах во всех группах больных ИБС достоверно не отличалось от такового в контрольной группе (см. табл. 1). Исходя из этих данных, можно предположить, что молекулы Cu,Zn-СОД в эритроцитах больных ИБС всех групп подверглись окислительной модификации, приведшей к ингибированию активности фермента. Возможный механизм модификации активности Cu,Zn-СОД состоит в том, что вторичные продукты свободнорадикального окисления полиеновых липидов, такие как 4-гидроксиноненаль и МДА, накапливаются при окислительном стрессе и, обладая высокой реакционной способностью, могут вызывать изменения конформации молекул белков за счет реакции альдегидной группы дикарбониллов со свободными аминогруппами протеинов [1]. Для проверки этого предположения нами были проведены модельные эксперименты, в которых внутриэритроцитарную Cu,Zn-СОД модифицировали в присутствии МДА.

Рисунок 1. Активность Cu, Zn-супероксиддисмутазы (А) и содержание фермента (Б) в эритроцитах больных ИБС в относительных единицах (значения показателей в контрольной группе приняты за 1)



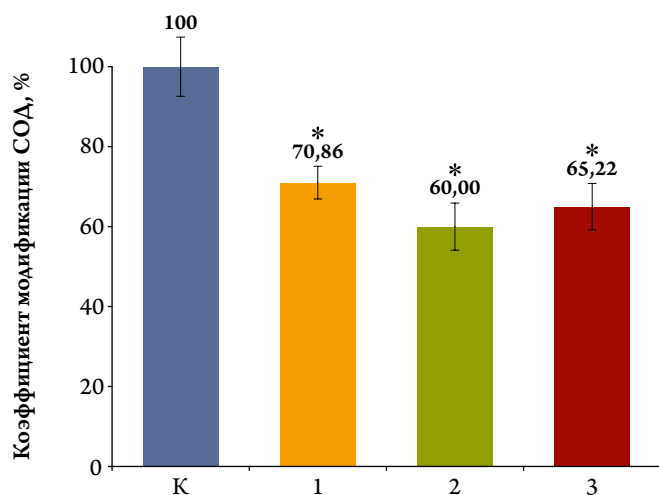
Обозначения столбиков: К – контроль; 1, 2, 3 – больные ИБС: 1 – больные с острым инфарктом миокарда; 2 – больные со стабильной стенокардией; 3 – больные с декомпенсированной ХСН. ИБС – ишемическая болезнь сердца; ХСН – хроническая сердечная недостаточность. * – достоверность по отношению к контролю, $p < 0,05$.

Рисунок 2. Уменьшение активности Cu, Zn-супероксиддисмутазы в эритроцитах (в % от контроля) доноров после инкубации в течение 3 ч эритроцитов в изотоническом фосфатном буфере pH 7,4 в присутствии 10 мМ МДА



Левый столбик – до инкубации с МДА (контроль, 100%), правый столбик (16,6%) – после инкубации с МДА. Доверительный интервал 6,12 в контроле и 7,15 после инкубации. * – $p < 0,05$; достоверность по отношению к контролю МДА – малоновый диальдегид.

Рисунок 3. Значения эмпирического коэффициента окислительной модификации (КФМ) эритроцитарной Cu, Zn-SOD (КФМ_{СОД}) в контрольной группе и группах больных ишемической болезнью сердца



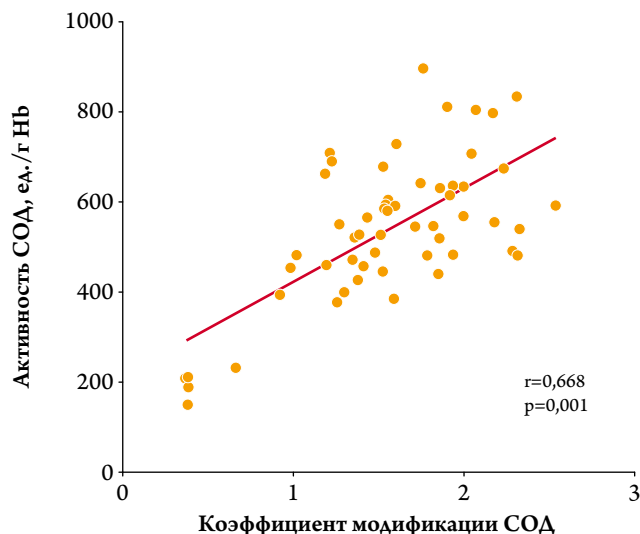
Обозначения столбиков: К – контроль; 1, 2, 3 – больные ИБС: 1 – больные с острым инфарктом миокарда; 2 – больные со стабильной стенокардией; 3 – больные с декомпенсированной ХСН. СОД – супероксиддисмутаза;

* – достоверность по отношению к контролю, $p < 0,05$.

Результаты этого исследования, приведенные на рис. 2, свидетельствуют, что молекулы МДА легко проникают через богатую холестерином липидную мембрану эритроцитов и приводят к весьма значительному ингибированию активности внутриэритроцитарной Cu, Zn-SOD.

Таким образом, увеличение содержания МДА в плазме крови при окислительном стрессе действительно может быть причиной карбонилзависимой модификации молекул эритроцитарной Cu, Zn-SOD и снижения активности этого фермента у больных ИБС *in vivo* (см. табл. 1, см. рис. 1). Следует отметить, что определение содержания МДА при помощи реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой (2-ТБК), которое обычно используется в клинических работах в качестве маркера окислительного стресса, является малопригодным вследствие низкой специфичности, поскольку с 2-ТБК в условиях определения могут реагировать различные вещества плазмы крови, отличные от МДА [1]. В связи с этим в литературе при такого рода анализах предлагается использовать термин «thiobarbituric acid-reactive substances» (TBARS), т. е. вещества, реагирующие с 2-ТБК [10]. В отечественной литературе вследствие неточного перевода вместо термина TBARS употребляется бессмысленный термин «ТБК-активные продукты», хотя ни о какой активности 2-ТБК в данном случае речи идти не может, поскольку имеется в виду способность окисленной субстанции реагировать с 2-ТБК с образованием окрашенного триметинового комплекса. Суммируя изложенное, можно утверждать, что более показательными для оценки степени выраженности окислительного стресса

Рисунок 4. Корреляция между активностью эритроцитарной Cu, Zn-SOD и коэффициентом окислительной модификации эритроцитарной Cu, Zn-SOD (КФМ_{СОД}) в группе больных атеросклерозом и ишемической болезнью сердца



являются данные по расчету эмпирического коэффициента окислительной модификации эритроцитарной Cu, Zn-SOD – КФМ_{СОД}, представляющего собой отношение: активность Cu, Zn-SOD (в ед./г гемоглобина)/содержание Cu, Zn-SOD (в нг/г гемоглобина).

Как видно из табл. 1 и рис. 3, КФМ_{СОД} были статистически незначимы между различными группами больных ИБС и незначительно варьировали в диапазоне 1,38–1,63, но статистически значимо отличались от контрольной группы, в которой КФМ_{СОД} был значительно выше и составил 2,30 (см. табл. 1, см. рис. 3).

Активность Cu, Zn-SOD может быть снижена не только вследствие окислительной модификации молекул фермента, но и при действии других факторов, таких как мутации гена, кодирующего биосинтез Cu, Zn-SOD, и значительно чаще, вследствие алиментарного дефицита меди и/или цинка, входящих в активный центр фермента [1]. Очевидно, что в этих случаях сниженная активность Cu, Zn-SOD в эритроцитах никоим образом не связана с окислительной модификацией молекул фермента. Исходя из этого, для однозначного корректного выявления наличия окислительной модификации эритроцитарной Cu, Zn-SOD мы предлагаем одновременно с исследованием активности фермента определять его содержание в эритроцитах иммунохимическим методом с помощью моноклональных антител и рассчитывать коэффициент окислительной модификации эритроцитарной Cu, Zn-SOD (КФМ_{СОД}). Несмотря на существование сильной положительной корреляции ($r=0,67$; $p=0,001$) между такими показателями, как активность эритроцитарной Cu, Zn-SOD и КФМ_{СОД} (рис. 4), очевидно, что использование эмпирическо-

го показателя KFM_{CO_2} для оценки выраженности окислительного стресса у больных ИБС является более корректным, чем использование в качестве теста только изменений активности $Cu,Zn-SOD$, поскольку использование KFM_{CO_2} позволяет исключить возможное изменение активности фермента под действием факторов, отличных от окислительного стресса.

Учитывая важную роль дикарбонилзависимой модификации белков в патогенезе ИБС и атеросклероза [1],

можно полагать, что определение KFM_{CO_2} у больных ИБС может быть использовано не только для оценки выраженности окислительного стресса, но, вероятно, и в качестве показателя, свидетельствующего об эффективности проводимой терапии.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила 22.01.20

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lankin VZ, Tikhaze AK. Role of Oxidative Stress in the Genesis of Atherosclerosis and Diabetes Mellitus: A Personal Look Back on 50 Years of Research. *Current Aging Science*. 2017;10(1):18–25. DOI: 10.2174/1874609809666160926142640
2. Barnes RP, Fouquerel E, Opresko PL. The impact of oxidative DNA damage and stress on telomere homeostasis. *Mechanisms of Ageing and Development*. 2019;177:37–45. DOI: 10.1016/j.mad.2018.03.013
3. Li H, Horke S, Förstermann U. Vascular oxidative stress, nitric oxide and atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2014;237(1):208–19. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2014.09.001
4. Rubattu S, Forte M, Raffa S. Circulating Leukocytes and Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases: A State of the Art. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2019;2019:2650429. DOI: 10.1155/2019/2650429
5. Hirsch GE, Heck TG. Inflammation, oxidative stress and altered heat shock response in type 2 diabetes: the basis for new pharmacological and non-pharmacological interventions. *Archives of Physiology and Biochemistry*. 2019;1–15. [Epub ahead of print]. DOI: 10.1080/13813455.2019.1687522
6. Markesbery WR. The Role of Oxidative Stress in Alzheimer Disease. *Archives of Neurology*. 1999;56(12):1449–52. DOI: 10.1001/archneur.56.12.1449
7. Lankin VZ, Konovalova GG, Tikhaze AK, Shumaev KB, Belova Kumskova EM, Grechnikova MA et al. Aldehyde inhibition of antioxidant enzymes in the blood of diabetic patients. *Journal of Diabetes*. 2016;8(3):398–404. DOI: 10.1111/1753-0407.12309
8. Beauchamp C, Fridovich I. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*. 1971;44(1):276–87. DOI: 10.1016/0003-2697(71)90370-8
9. Lankin VZ, Tikhaze AK, Kumskova EM. Macrophages actively accumulate malonyldialdehyde-modified but not enzymatically oxidized low density lipoprotein. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2012;365(1–2):93–8. DOI: 10.1007/s11010-012-1247-5
10. Federico A, Dallio M, Masarone M, Gravina AG, Di Sarno R, Tuccillo C et al. Evaluation of the Effect Derived from Silybin with Vitamin D and Vitamin E Administration on Clinical, Metabolic, Endothelial Dysfunction, Oxidative Stress Parameters, and Serological Worsening Markers in Nonalcoholic Fatty Liver Disease Patients. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2019;2019:8742075. DOI: 10.1155/2019/8742075