

Окисляемость липопротеинов крови у пациентов с нарушениями мозгового кровообращения

Т.Н. Федорова, М.Ю. Максимова, Ю.Я. Варакин, Г.В. Горностаева, А.А. Логвиненко, Е.В. Пнедовская, З.А. Суслина

ФГБУ «Научный центр неврологии» РАМН (Москва)

Проведен сопоставительный анализ степени выраженности окислительной модификации суммарной фракции липопротеинов низкой и очень низкой плотности крови (ЛП), которую оценивали по ряду кинетических параметров железо-индуцированной хемилюминесценции с тяжестью острых и хронических форм нарушений мозгового кровообращения. Представлены результаты клинико-биохимического обследования 412 пациентов (артериальная гипертония – АГ, гипертонические церебральные кризы – ГК, начальные проявления недостаточности кровоснабжения головного мозга – НПНКМ, дисциркуляторная энцефалопатия – ДЭ, ишемический инсульт – ИИ). Показано, что окислительная модификация ЛП начинается уже на ранних этапах сосудистого процесса и постепенно прогрессирует по мере развития его тяжести, достигая значительной выраженности при хронических и острых формах нарушений мозгового кровообращения.

Ключевые слова: перекисное окисление липидов, хемилюминесценция, цереброваскулярная патология.

Актуальность исследования

Нарушение кровоснабжения головного мозга инициирует каскад биохимических реакций, лежащих в основе гибели нейронов и митохондриальной дисфункции [7, 9]. Основными патогенетическими факторами этого процесса являются глутамат-кальциевая эксайтотоксичность и избыточная продукция активных форм кислорода (АФК) [6, 12]. Нарушение баланса между продукцией АФК и регуляторными механизмами антиоксидантного контроля за их образованием, представленными ферментами антирадикальной защиты и низкомолекулярными антиоксидантами, приводит к развитию окислительного стресса (ОС), который рассматривается как один из основных механизмов деструкции нейронов [15]. Избыточная генерация АФК и истощение эндогенного антиоксидантного потенциала в условиях ОС вызывает резкую интенсификацию процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) с образованием токсичных продуктов ПОЛ (малоновый диальдегид – МДА или продукты, реагирующие с тиобарбитуровой кислотой; акролеин; 4-гидрокси-2-ноненали), способных оказывать системное повреждающее воздействие не только на мембраны нейронов, но на клетки в целом [1, 10].

Прямое измерение АФК затруднено, что обусловлено их низкими концентрациями, коротким временем полужизни и высокой реакционной способностью. Общим подходом к количественной оценке ОС является измерение стабильных метаболитов: продуктов реакции с липидами, белками и ДНК с оценкой отдельных компонентов системы антиоксидантной защиты. Непосредственно свободные радикалы могут быть измерены такими методами, как электронный парамагнитный резонанс или хемилюминесценция (ХЛ). Преимуществом хемилюминесцентных реакций является их высокая чувствительность и специфичность по отношению к процессам перекисного окисления липидов по сравнению с традиционными биохимическими методами [14]. ХЛ является одним из наиболее перспективных методов исследования антиоксидантной активнос-

сти различных биологических компонентов. Для усиления сигнала используются различные активаторы ХЛ, однако наиболее чувствительным является метод регистрации ХЛ, инициированной ионами двухвалентного железа. Этот метод, впервые предложенный Ю.А. Владимировым, был адаптирован нами применительно к экспериментальным и клиническим условиям [5].

Окислительный стресс играет важную роль в патогенезе сосудистых заболеваний головного мозга, включая артериальную гипертонию и атеросклероз [4, 10, 13]. Окисленные липопротеины низкой плотности являются важным звеном патогенеза атеросклероза, их транспорт в эндотелий приводит к его дисфункции [3, 11]. Однако важной проблемой остается количественная оценка ОС, включающая как измерение активности процессов ПОЛ, так и определение адекватных критериев оценки собственных эндогенных резервов антиоксидантной защиты организма человека. С этой точки зрения, представлялось важным оценить чувствительность ЛП крови пациентов с цереброваскулярной патологией (ЦВП) к окислительной модификации методом Fe^{2+} -индуцированной хемилюминесценции.

Цель работы – проведение сопоставительного анализа степени окислительной модификации липопротеинов крови на модели железо-индуцированной хемилюминесценции в зависимости от тяжести цереброваскулярной патологии.

Материалы и методы

Характеристика групп пациентов

В работе представлены результаты клинико-биохимического обследования пациентов с ЦВП, находившихся на амбулаторном или стационарном обследовании и лечении в НЦН РАМН. Всего обследовано 412 чел., из них 47 – с АГ без клинических проявлений ЦВП, 21 – с начальными проявлениями недостаточности кровоснабжения мозга при АГ (НПНКМ), 60 – с гипертоническими кризами, 105 больных – с дисциркуляторной энцефалопатией и 179 – боль-

таблица 1: Характеристика обследованных групп пациентов с сосудистыми заболеваниями головного мозга.

Заболевание	Число обследованных пациентов
Неосложненная артериальная гипертензия (АГ)	47
Начальные проявления недостаточности кровоснабжения мозга при АГ	21
Гипертонические кризы	60
Дисциркуляторная энцефалопатия	105
Ишемический инсульт	179

ных с ИИ в острейшем периоде заболевания (1–3 сутки) до начала проведения лекарственной терапии (табл. 1).

На основании классических работ Н.В. Верещагина [2], раскрывших морфологическую основу ДЭ, выделены ее основные формы, такие как мультиинфарктная и прогрессирующая сосудистая лейкоэнцефалопатия.

Все пациенты находились на амбулаторном или стационарном обследовании в НЦН РАМН; их возраст составил от 50 до 63 лет. В качестве контрольной группы было обследовано 30 неврологически здоровых лиц того же возраста.

Для верификации характера и тяжести ЦВП проводили Эхо-КГ, дуплексное сканирование сонных и позвоночных артерий, КТ/МРТ головы.

Биохимические методы исследования

Флуориметрическое определение продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-РП) в крови проводили по методу Y. Kunio (1976). Хемилюминесценция липопротеинов сыворотки крови, индуцированная ионами двухвалентного железа [5].

В данном клинико-биохимическом исследовании в качестве основного метода оценки активности процессов ПОЛ и антиоксидантного статуса пациентов с ЦВП использовалось измерение кинетических параметров Fe^{2+} -индуцированной хемилюминесценции липопротеинов сыворотки крови. Этот метод, предложенный Ю.А. Владимировым, был частично модифицирован в лаборатории клинической и экспериментальной нейробиологии НЦН РАМН применительно к прибору «Люминометр-1251, ЛКВ, Швеция». В целом, обладая высокой специфичностью и информативностью, этот метод позволяет проводить масштабные исследования, поскольку является экономичным и не требует использования дорогостоящих реактивов и расходных материалов.

Подготовка образцов к анализу: кровь у пациентов и здоровых доноров брали из локтевой вены утром натощак. После отстаивания крови и отделения сыворотки из нее выделяли суммарную фракцию ЛП по общепринятому методу: к 0,2 мл сыворотки крови добавляли 2 мл 0,28% раствора хлористого кальция ($CaCl_2$) и 0,04 мл 1% раствора гепарина, затем пробирку осторожно встряхивали и оставляли на 5 мин при комнатной температуре. Далее пробирку центрифугировали в течение 15 мин при 3000 об/мин при комнатной температуре, после чего надосадочную жидкость слива-

ли, а к осадку прибавляли 0,9 мл К-фосфатного буфера (60 мМ KH_2PO_4 и 105 мМ KCl , $pH=7,45$).

Кювету с полученной суспензией помещали в измерительную камеру люминометра и регистрировали фоновую ХЛ. Для инициирования ХЛ в пробу вводили 0,1 мл раствора двухвалентного железа ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) в конечной концентрации 2,5 мМ. В ответ на добавление железа происходит быстрая вспышка хемилюминесценции (h, mB), ее интенсивность характеризует уровень преобразованных продуктов ПОЛ (преимущественно гидроперекисей липидов). Далее наступает латентный период (τ , c), свидетельствующий о резистентности ЛП к дальнейшему окислению. По длительности латентного периода судят об антиоксидантном эндогенном потенциале: чем больше в исследуемой пробе различных антиоксидантов, тем более длительное время он продолжается. По окончании латентного периода начинается фаза медленного нарастания ХЛ (H, mB), связанная с дальнейшим окислением ионов двухвалентного железа и накоплением продуктов ПОЛ. Интенсивность ХЛ нарастает постепенно, достигает своего максимума и затем начинает снижаться до величины стационарного свечения. Величина этого параметра ХЛ отражает способность субстрата к окислению, максимально возможную интенсивность ХЛ.

Измерение ХЛ каждого исследуемого образца проводили в двух параллельных пробах, используя в анализе среднюю величину на Люминометре-1251, ЛКВ, Швеция. Необходимым условием является постоянное перемешивание проб смеси и постоянная температура ($37^\circ C$) в измерительной камере.

Статистический анализ данных проводили с использованием пакета прикладных программ «Statgraphics 3.0», оценивая значимость различий между группами по парному критерию Стьюдента.

Результаты исследования

В табл. 2 представлены результаты исследования окисляемости липопротеинов у пациентов с различными сосудистыми заболеваниями головного мозга. Как видно из таблицы, у больных с ишемическим инсультом наблюдались выраженные изменения всех изучаемых параметров ХЛ, которые проявлялись в увеличении уровня липидных гидроперекисей (h), усилении способности ЛП к окислению (H) с одновременным снижением их резистентности к окислению (τ) по сравнению с нормальными значениями. В крови этих пациентов отмечалось увеличение содержания вторичных продуктов ПОЛ (ТБК-РП).

Подобные изменения выявлены и у больных с ДЭ. Они также характеризовались повышением уровня липидных гидроперекисей (h) и способности ЛП к окислению (H), снижением их резистентности к окислению (τ), а также повышением содержания ТБК-РП. Представленные результаты свидетельствуют о значительных окислительных нарушениях в ЛП, активации процессов ПОЛ в крови пациентов с ишемическим инсультом и ДЭ на фоне снижения эндогенной антиоксидантной защиты.

В табл. 3 представлена характеристика окислительной модификации ЛП у больных с различными формами ДЭ. Максимальные нарушения окисляемости ЛП наблюдались у больных с мультиинфарктной ДЭ. В этой группе больных

таблица 2: Параметры железо-индуцированной хемилюминесценции липопротеинов и содержание ТБК-РП в крови пациентов с различными формами нарушения мозгового кровообращения (M±SD).

Параметры ПОЛ	Группа нормы (n=30)	Контроль. Неосложненная АГ (n=47)	НПНКМ при АГ (n=21)	Гипертензивные церебральные кризы (n=60)	ДЭ и болезнь Бинсвангера (n=105)	Ишемический инсульт (n=179)
h, мВ	124,0±25	118,7±33,6	123,3±40,5	114,0±30	148±12,5 p 1<0,01 p2<0,001	144,5±8,8 p 1<0,001 p 2<0,001
τ, с	95±4,2	78,0±3,6 p1<0,05	75,0±4,6 p1=0,02	80,0±3,9 p 1<0,05	56,2±11,5 p 1<0,05 p 2<0,001	52,5±5,9 p 1<0,01 p 2<0,01
H, мВ	983±317	1077±362	1103±195 p1<0,01	1105±306 p1<0,05	1420±88 p 1<0,05 p 2<0,01	1423±63,5 p 1<0,05 p 2<0,01
ТБК-РП нмоль/мл	4,5±1,0	4,8±1,3	7,1±2,1 p1<0,001 p2<0,01	6,9±2,0 p1<0,001 p2=0,03	8,9±1,24 p1<0,001 p2<0,001	9,31±1,32 p1<0,001 p2<0,001

Примечание: p1 – уровень значимости различий по отношению к норме; p2 – уровень значимости различий по отношению к «неосложненной» АГ.

таблица 3: Параметры железо-индуцированной хемилюминесценции липопротеинов у больных с различными формами дисциркуляторной энцефалопатии.

Характеристика групп	Параметры Fe ²⁺ -индуцированной хемилюминесценции			
	h, мВ	τ, с	H, мВ	S, мВ/мм ²
Группа нормы (30 чел.)	124,0±25	95±4,2	983±317	488±47,3
1 группа – лакунарные инфаркты (34 чел.)	136,2±17,2	56,7±10,0 p1<0,05	1264,3±76,2 p1<0,01	796,2±86,9 p1<0,001
2 группа – диффузные изменения белого вещества (60 чел.)	118,9±12,2	56,2±11,5 p1<0,05	1190,7±95,11 p1<0,05	474,0±119,3
3 группа – болезнь Бинсвангера (11 чел.)	148±12,5 p1<0,05 p2<0,01	48,6±8,5 p1<0,01 p2<0,05	1423±63,5 p1<0,001 p2<0,001	646,3±109,9 p1<0,05 p2<0,05

Примечание: p1 – уровень значимости различий по отношению к норме; p2 – уровень значимости различий по отношению к группе 2.

отмечалось увеличение уровня липидных гидроперекисей (h), способности ЛП к окислению (H) и светосуммы ХЛ (S) с одновременным снижением резистентности ЛП к окислению (τ).

В группе больных с прогрессирующей сосудистой лейкоэнцефалопатией также имели место нарушения окисляемости ЛП. Характерным признаком этих нарушений было повышение способности ЛП к окислению (H) и увеличение светосуммы ХЛ (S) с одновременным снижением их резистентности к окислению (τ). Что касается уровня липидных гидроперекисей, то он не превышал нормальных величин.

Следовательно, анализ степени окисляемости ЛП крови больных ДЭ позволил установить определенную взаимосвязь степени окисляемости ЛП от формы заболевания. У всех обследованных больных отмечалось снижение эндо-

генного антиоксидантного статуса. Наиболее выраженные нарушения в системе окисляемости ЛП наблюдались у больных с мультиинфарктной ДЭ. У больных с прогрессирующей сосудистой лейкоэнцефалопатией степень окислительной модификации ЛП была ниже по сравнению с мультиинфарктной ДЭ.

У больных с НПНКМ на фоне АГ нарушения в системе ПОЛ носили менее выраженный характер. В этих группах больных наблюдалось повышение содержания ТБК-РП в крови, увеличение способности ЛП к окислению (H) и снижение резистентности ЛП к окислению (τ) по сравнению с нормальными величинами. В то же время уровень липидных гидроперекисей (h) не превышал контрольных значений.

В группе с АГ отмечалось снижение резистентности липопротеинов к окислению (τ). Величины других исследуемых параметров ХЛ (гидроперекисей липидов, способности липидов к окислению), а также содержание ТБК-РП в крови не превышали нормальных величин.

Таким образом, результаты проведенного исследования свидетельствуют, что при всех сосудистых заболеваниях головного мозга отмечалось изменение изучаемых параметров ХЛ сопряженное с тяжестью сосудистых изменений. Показано, что окислительная модификация ЛП крови пациентов выявляется уже на ранних этапах сосудистого заболевания. Наибольшая выраженность ПОЛ выявлена при ишемическом инсульте в острой фазе заболевания и мультиинфарктной ДЭ. Следовательно, имеет место прямая взаимосвязь между степенью очаговых изменений ткани мозга и выраженностью окисляемости ЛП.

Заключение

Fe²⁺-индуцированная хемилюминесценция является адекватным методом количественной оценки ОС у пациентов с различными формами нарушения мозгового кровообращения, позволяющий оценить способность ЛП к свободнорадикальному окислению, а также их резистентность к окислительной модификации.

Установлена прямая ассоциация основных параметров окисляемости ЛП крови с выраженностью церебрального сосудистого процесса и тяжестью очагового поражения головного мозга. Наиболее выраженная окислительная модификация ЛП и повышение содержания ТБК-РП отмечено у пациентов с тяжелой формой ДЭ и ОНМК ишемического характера.

Повышение вторичных продуктов ПОЛ и снижение эффективности эндогенной антиоксидантной защиты при различных формах ЦВП указывает на целесообразность включения препаратов антиоксидантного действия на самых ранних стадиях сосудистого процесса.

Проведенное исследование окислительных повреждений липопротеинов крови пациентов с различными сосудистыми заболеваниями головного мозга подтверждает возможность использования ХЛ метода для дифференциальной диагностики, для контроля за динамикой заболевания и эффективностью проводимого лечения.

Список литературы

1. *Болдырев А.А.* Окислительный стресс и мозг. Соросовский образовательный журнал 2001; 7, 4: 21–28.
2. *Верещагин Н.В., Моргунов В.А., Гулевская Т.С.* Патология головного мозга при атеросклерозе и артериальной гипертензии. М.: Медицина, 1997: 288.
3. *Ланкин В.З., Вихерт А.М., Тихазе А.К.* Роль перекисного окисления липидов в этиологии и патогенезе атеросклероза. Вопросы медицинской химии 1985; 3: 18–24.
4. *Суслина З.А., Максимова М.Ю., Федорова Т.Н.* Оксидантный стресс и основные направления нейропротекции при нарушениях мозгового кровообращения. Неврол. журн. 2007; 4: 4–8.
5. *Федорова Т.Н.* Окислительный стресс и защита головного мозга от ишемического повреждения. Автореф. дисс. ...докт. б. наук. М., 2004; 40.
6. *Atlante A., Calissano P., Bobba A. et al.* Glutamate neurotoxicity, oxidative stress and mitochondria. FEBS Lett. 2001; 497: 1–5.
7. *Green D.R. and Reed J.C.* Mitochondria and apoptosis. Science 1998; 281: 1309–1312.
8. *Harrison D.G., Gongora M.C., Guzik T.J., Widder J.* Oxidative stress and hypertension. J. Am. Soc. Hypertens. 2003; 1: 30–44.
9. *Madamanchi N.R. and Runge M.S.* Mitochondrial dysfunction in atherosclerosis. Circ. Res. 2007; 100: 460–473.
10. *Ohachi M., Runge M.S., Faraci F.M., Heistad D.D.* MnSOD deficiency increases endothelial dysfunction in ApoE-deficient mice. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2006; 26: 2331–2336.
11. *Ross R.* Atherosclerosis- an inflammatory disease. N. Engl. J. Med. 1999; 340: 115–126.
12. *Siesjo B.K., Zhao Q., Pahlmark K. et al.* Glutamate, calcium and free radicals as mediators of ischemic brain damage. Ann. Thorac. Surg. 1995; 59: 1316–1320.
13. *Victor V.M., Apostolova N., Herance R. et al.* Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in atherosclerosis: mitochondria-targeted antioxidants as potential therapy. Curr. Med. Chem. 2009; 16: 4654–4667.
14. *Vladimirov Y.A.* Studies of antioxidant activity by measuring chemiluminescence kinetics, In Natural Antioxidants: Molecular Mechanisms and Health Effects (L. Packer, M.G. Traber and W. Xin, Eds.), AOCS Press, Champaign, Il., 1996; 125–144.
15. *Warner D.S., Sheng H., Batini-Haberle I.* Oxidants, antioxidants and the ischemic brain. J. of Exp. Biol. 2004; 207: 3221–3231.

Oxidation of blood lipoproteins in patients with cerebrovascular diseases

T.N. Fedorova, M.Y. Maksimova, Y.Ya. Varakin, G.V. Gornostaeva, A.A. Logvinenko, E.V. Gnedovskaya, Z.A. Suslina

Research Center of Neurology, Russian Academy of Medical Sciences (Moscow)

Keywords: lipid peroxidation, chemiluminescence, cerebrovascular diseases.

An comparative analysis of oxidation of low density lipoproteins/very low density lipoproteins, and a clinical severity of acute and chronic cerebrovascular diseases was performed. To assess the intensity of lipid peroxidation we estimated several kinetic parameters of ferrous iron-induced chemiluminescence. In this article we present the results of the clinical and biochemical assessment of 412 patients with wide spectrum of cerebrovascular diseases, such as acute stroke (n=179), chronic cere-

brovascular disease (n=105), hypertensive crisis (n=60), hypertension without cerebral symptoms (n=47), and initial stages of chronic cerebrovascular insufficiency (n=21). We showed that lipid oxidation becomes evident even on the early stages of cerebrovascular diseases, and then progresses gradually following clinical severity of the disease, and the intensity of the peroxidation rises significantly in chronic and acute forms of cerebrovascular diseases.

Контактный адрес: Федорова Татьяна Николаевна – докт. биол. наук, зав. лаб. клинической и экспериментальной нейрхимии ФГБУ «НЦН» РАМН. Тел.: +7 (495) 490-21-06; e-mail: tnf51@bk.ru;

Максимова М.Ю. – гл. науч. сотр. 2-го неврологического отделения (нарушения мозгового кровообращения с палатами интенсивной терапии) с лабораторией кардионеврологии ФГБУ «НЦН» РАМН;

Варакин Ю.Я. – зав. лаб. эпидемиологии и профилактики болезней нервной системы ФГБУ «НЦН» РАМН;

Горностаева Г.В. – вед. науч. сотр. лаб. эпидемиологии и профилактики болезней нервной системы ФГБУ «НЦН» РАМН;

Логвиненко А.А. – мл. науч. сотр. лаб. клинической и экспериментальной нейрхимии ФГБУ «НЦН» РАМН;

Гнедовская Е.В. – ученый секретарь ФГБУ «НЦН» РАМН;

Суслина З.А. – академик РАН, директор ФГБУ «НЦН» РАМН.