

В. А. Яворская, В. А. Малахов, А. М. Белоус

ИНТЕНСИВНОСТЬ ПРОЦЕССОВ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ И АКТИВНОСТЬ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ В ЭРИТРОЦИТАХ ПРИ НАЧАЛЬНЫХ ФОРМАХ СОСУДИСТЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Кафедра неврологии (лек. проф. П. В. ВОЛОШИН)
Харьковского института усовершенствования врачей

Р е з ю м е. Исследование уровня спонтанного перекисного окисления липидов (ПОА) (по фракциям малонового диальдегида и диеновых конъюгатов) и активности антиоксидантных ферментов (глутатионредуктазы и глутатионпероксидазы, а также пассивного транспорта Ca^{2+} в эритроцитах) позволило обнаружить, что у больных с начальными формами сосудистых заболеваний головного мозга уровень спонтанного ПОА повышен наряду со снижением активности глутатионсодержащих ферментов и накоплением Ca^{2+} в эритроцитах. Повышенную активность ПОА, снижение активности физиологической антиоксидантной системы, накопление Ca^{2+} в эритроцитах авторы рассматривают как нарушающие клеточно-мембранного гомеостаза у данного контингента больных.

В. А. Яворская, В. А. Малахов, А. М. Белоус

БАШ ЧИТЕ КАН ТАМЫРААРЫНЫҢ
БАШААНГЫЧ ФОРМАДАГЫ АВЫРУЛАРЫ
ВАКЫТЛИЦА КЫЗГА КАҢ ТӨНЧЕКӨРӨҢДӨ
ОКСИДАНТААРГА КАРШЫ ФЕРМЕНТААРЫНЫҢ
АКТИВЛЫК ҮӨМ ЛИПИДААРЫНЫҢ ПЕРЕКИСЛЫК
ОКИСЬАШУ ПРОЦЕССААРЫНЫҢ КӨЧӨ

Авторлар үзкорелген тикшеренүүлөр нәтижесинде мицелларның перекислери окисләнү активлыгынын артуын, оксидантларга каршы физиология система активлыгынын түбәнсәсет кыялда кан төнчекләрендә Ca^{2+} протонларның жылулы, шуны авыруларның кузәнеткыш (мембрана) гомеостазы бозылуы дил карыйлар.

V. A. Javorskaya, V. A. Malakhov, A. M. Belousov

INTENSITY OF LIPID PEROXYDATION PROCESSES
AND ACTIVITY OF ANTI-OXIDANTIAL FERMENTS
IN ERYTHROCYTES AT INITIAL FORMS
OF VASCULAR BRAIN DISEASES

Level of spontaneous POL (over the accumulation of malonic diallehid and dienic conjugates) and activity of antioxidant ferments of glutathionreductase and glutathionperoxidase, and also passive transport of Ca^{2+} in erythrocytes allowed to discover that the level of spontaneous POL was high along with lowering of activity of glutathion-containing ferments and Ca^{2+} accumulation in erythrocytes. High activity of POL, lowering of activity of physiological antioxidant system, accumulation of Ca^{2+} in erythrocytes are considered by the authors as violation of cytomembranous homeostasis in the present group of patients.

У больных с начальными формами сосудистых заболеваний головного мозга (НФСЗГМ), к которым относятся начальные проявления недостаточности кровообращения мозга (НПНКМ) и дисциркуляторная энцефалопатия I стадии [1], неврологическая симптоматика немногочисленна, в силу чего своевременная диагностика затруднена.

Современным направлением научных исследований, призванных улучшить диагностику и лечение НФСЗГМ, является изучение клеточно-мембранного гомеостаза [8]. Удачной моделью клеток являются эритроциты, которым приугици общие принципы построения мембраны клеток [2]. В то же время общепризнано, что в патогенезе большинства заболеваний важное место занимают ценные процессы свободнорадикального окисления (СРО) компонентов клетки с участием радикала кислорода [7]. Как правило, эти процессы реализуются по механизму перекисного окисления липидов (ПОА) [6,12] и традиционно оцениваются по скорости и количеству образования одного из конечных продуктов окисления малонового диальдегида (МДА). Динамика образования продуктов ПОА контролируется мембранно-связанной системой биоантиоксидантов, которая, как известно, представлена в основном глутатионсодержащими ферментами [9].

В специальной литературе имеются сведения о характере ПОА при цереброваскулярной патологии (ЦВП) [6,8].

Однако вопросы развития и динамики этих процессов у больных с НФСЗГМ в зависимости от основного этиологического фактора и неврологической симптоматики мало изучены [6], что не позволяет сделать однозначных выводов о механизме развития этой патологии.

В связи с этим нами были проведены исследования уровня МДА, диеновых конъюгатов (ДК), глутатионзависимых ферментов и пассивного входа $^{45}Ca^{2+}$ в эритроциты у 132 больных с НФСЗГМ.

В качестве контроля использовали свежую венозную кровь на гепарине, взятую натощак из локтевой вены у 20 практически здоровых молодых людей в возрасте 19—25 лет.

Больных с атеросклеротической дисциркуляторной энцефалопатией (АДЭ) I стадии было 42 человека, с гипертонической дисциркуляторной энцефалопатией (ГДЭ) I стадии — 34, с НПНКМ атеросклеротического генеза — 26 человек и с НПНКМ, обусловленной гипертонической болезнью, — 30. Возраст больных колебался от 35 до 59 лет, мужчин было 77, женщин — 55.

Эритроциты получали из цельной крови больных, взятой утром натощак, центрифугированием при 1500 г холодным физиоло-

Показатели перекисного окисления липидов, активности глутатионсодержащих ферментов и пассивного входа $^{45}\text{Ca}^{2+}$ в эритроцитах у больных с НФСЗГМ

Распределение групп больных	Двухполая колюбага $\times 10^{-4}\text{M}$	МДА, ммоль/(г НВ)	ГР, ммоль НАДФ Н ₂ / (г НВ мин)	ГП, ммоль G = SH/ (г НВ мин)	Пассивный вход $^{45}\text{Ca}^{2+}$, 10^6 моль/(мл·мин)
Контроль	1.41±0.10	220±11	13.9±0.6	157±21	0.91±0.06
НПНКМ (атеросклероз)	1.60±0.16	291±22*	11.0±0.7*	66±15*	1.27±0.07*
НПНКМ (ГБ)	1.68±0.09*	276±14*	9.7±0.8*	87±12*	1.64±0.09*
АДЭ I ст.	1.71±0.09*	260±17*	10.4±0.4*	74±10*	1.04±0.06
ГДЭ I ст.	1.65±0.17	251±12*	11.7±0.9*	75±13*	1.95±0.1*

* — статистически достоверно по сравнению с контролем ($p < 0.05$)

гическим раствором (консервант "Глюципир" 1:4). Определение уровня МДА и ДК велось методом, описанным Я.Н.Коробейниковой [13].

Измерение экстинкции проб выполняли на спектрофотометре "СФ 16" при 532 нм в кювете с толщиной слоя 1 см. Определение активности глутатионпероксидазы (ГП) (КФ 1.11.1.9) в эритроцитах проводили по методу, описанному В.М.Моишиным [14], активность глутатионпродуктазы (ГР) (КФ 1.6.4.2) определяли методом А.Ф.Пащенко и соавт. [15]. Регистрацию проводили на 2 лучевом регистрирующем спектрофотометре "SPECORD VV VIS" в кювете с перемешиванием и толщиной слоя 1 см при 340 нм. Пассивный вход $^{45}\text{Ca}^{2+}$ в эритроциты определяли по методу Ю.В.Постнова и соавт. [16].

Как видно из таблицы, у больных с НФСЗГМ наблюдается усиление спонтанного уровня ПОА в эритроцитах, при этом обращает на себя внимание то обстоятельство, что у больных с НПНКМ активность процессов ПОА превышает активность ПОА у больных ДЭ.

Из полученных данных также следует, что достоверность повышения содержания МДА в эритроцитах существенно зависит от степени тяжести НФСЗГМ. Так, при НПНКМ, обусловленной атеросклерозом, рост МДА составил 32 % по отношению к контролю, а при НПНКМ, обусловленной гипертонической болезнью (ГБ), — 25% при АДЭ I стадии — 18 %, при ГДЭ I стадии — 14% ($p < 0.05$), что в целом свидетельствует об активации цепных процессов в липидных компонентах клеток. Аналогично наблюдалось повышение ДК.

Согласно существующим сегодня представлениям [7], в механизме ПОА радикал кислорода атакует двойные связи ненасыщенных жирных кислот мембранных липидов, что способствует формированию гидроперекисей жирных кислот, которые оказывают токсическое воздействие на структурные и каталитические белки, нарушая ионтранспортные процессы и рецепторы клетки. Результаты этих исследо-

ваний свидетельствуют о том, что при развитии НФСЗГМ возникает цепь патологических процессов ПОА и выявляющиеся биологически активные липидные метаболиты нарушают транспорт ионов особенно Ca^{2+} [4].

Как следует из результатов исследований, у больных с НФСЗГМ наблюдается усиление пассивного входа $^{45}\text{Ca}^{2+}$ в эритроциты, особенно оно значимо у больных гипертонической болезнью.

Согласно литературным данным [17], увеличение концентрации Ca^{2+} в клетке может стимулировать фосфоорилазу А и липоксигеназу (их активность зависит от Ca^{2+}). Это способствует продукции арахидоновой кислоты и ее метаболитов, которые активируют вход Ca^{2+} путем открытия ионных Ca^{2+} каналов [18].

Как известно [19], функции глутатиона и антиоксидантных глутатионзависимых ферментов заключаются в разрушении и инактивации H_2O_2 и гидроперекисей мембранных липидов. Одним из ключевых ферментов антиоксидантной системы является глутатионпероксидаза (ГП), которая в качестве субстрата (донора H^+) использует восстановленный глутатион.

Согласно полученным нами данным (см. таблицу), активность ГП уже на ранних стадиях заболевания уменьшена почти вдвое по сравнению с контролем и имеет тенденцию к дальнейшему уменьшению по мере прогрессирования заболевания. Эти результаты свидетельствуют о том, что пул восстановленного глутатиона в процессе развития ишемии — гипоксии головного мозга — уменьшается. При прогрессировании заболевания глутатион истощается, либо может нарушаться его синтез. Поддержание пула восстановленного глутатиона в значительной степени облегчается ферментом глутатионпродуктазой (ГР), которая катализирует реакцию превращения глутатиона окисленного в восстановленный; коферментом реакции выступают восстановительные формы адениннуклеотидов (НАДФ H_2 и НАДН). Показано, что существует нечеткая

зависимость возрастания активности ГР в процессе заболевания. Поскольку в этой реакции расходуется восстанавливаемые формы коферментов, можно предположить, что ферментные цепочки пентозофосфатного цикла и гликолиза не способны компенсировать повышенное потребление НАДФН₂ и НАДН₂, т.е. в пределах исследуемой ишемии — гипоксии восстановительный потенциал клетки истощен.

Как видим, уже на ранних стадиях церебральных ишемических нарушений происходит активация процессов перекисного окисления липидов в эритроцитах, которая сопровождается истощением активности ферментов глутатионзависимой антиоксидантной системы.

В настоящее время повышенную активность физиологической антиоксидантной системы и интенсификацию процессов ПОД рассматривают как естественный адаптационно-компенсаторный процесс, поскольку гидроперекиси являются активаторами синтеза простагландинов, в частности простагландин тромбосиновой системы, столь важной в поддержании тромбоцитарно-сосудистого гемостаза.

Считают, что усиление процессов ПОД происходит в основном за счет перекисидации липидов мембран и липопротеидов плазмы [9]. При этом защита эндотелия и нейроглии от повреждающего действия свободных радикалов, в том числе и гидроперекисей липидов, во многом обеспечивается активностью глутатионсодержащих ферментов, которые снижают количество промежуточных и конечных продуктов ПОД до оптимального уровня. Однако у больных с НФСЗГМ наблюдается истощение активности глутатионсодержащих ферментов, что может указывать на достаточно грубые нарушения клеточно-мембранного гомеостаза с истощением адаптационно-приспособительных механизмов.

Очевидно, что полученные данные следует учитывать при разработке программ комплексного лечения больных с НФСЗГМ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Акимов Г.А. Начальные проявления сосудистых заболеваний головного мозга. — М., 1983. — 234 с.
2. Белоус А.М., Лемешко В.В., Бондиренко В.А., Луговой В.И. Основные направления биохимических исследований в криобиологии //Современные проблемы криобиологии и медицины — М., 1975. — С. 15—23.
3. Биленько М.В. Роль перекисного окисления липидов клеточных мембран в патогенезе ишемических и постишемических расстройств в органах и перспективы применения антиоксидантной терапии //Острая

ишемия органов: Тез. докл. 2-го Всесоюз. симп., 20—21 нояб. 1987 г. — М., 1987. — С. 51—52.

4. Биленько М.В. Ишемические и реперфузионные повреждения органов. — М., 1989. — 367 с.
5. Бурдакова Е.Б. Роль антиоксидантной активности липидов в клеточном метаболизме //Витамины биохимия, витамин Е и селена — Киев, 1975. — С. 37—42.
6. Висковский И.Ш., Саник А.В. Микроциркуляция, реологические свойства крови, их коррекция при ишемических нарушениях мозговой кровообращения //Журн. невропатол. и психиатр. — 1991. — № 11 — С. 67—70.
7. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов — М., 1972. — С. 252.
8. Волышев П.В., Яковская В.А., Малюков В.А. Структурно-функциональные свойства эритроцитов у больных атеросклеротической дисциркуляторной энцефалопатией //Журн. невропатол. и психиатр. — 1991 — № 1. — С. 62—65.
9. Журавлев А.И., Филиппов Ю.И., Симонов В.В. Хемилуминосценция и антиоксидантные свойства липидов человека //Биофизика — 1984. — № 6 — С. 671—677.
10. Каган В.Е., Ритов В.В., Колыаев С.В. и др. Перекисное окисление липидов как фактор модификации мембранных структур клетки //Физико-химические основы функционирования мембранных структур клетки — М., 1974. — С. 89—93.
11. Коженяков Ю.Н. О перекисном окислении липидов в норме и патологии //Вопр. мед. химии 1965 — № 5 — С. 2—6.
12. Козлов Ю.И. Свободнорадикальное окисление липидов в биомембранах в норме и патологии //Биоантиоксиданты — М., 1975. — С. 5—15.
13. Коробейникова О.Н. Модификация окислительных продуктов перекисного окисления липидов в реакции с тиобарбитуровой кислотой //Лаб. дело — 1969 — № 7. — С. 3—9.
14. Мина В.М. Простой и специфический метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах //Лаб. дело — 1986. — № 12 — С. 725—728.
15. Панченко А.Ф., Герасимов А.М. и др. Повышение активности глутатионпероксидазы и глутатионсукцинатазы печени крыс при введении фенобарбитала //Фармакология и токсикология. — 1975. — Т. 38, № 3. — С. 331—337.
16. Постнов Ю.В., Орлов С.Н. Первичная гипертензия как патология клеточных мембран. — М., 1987. — С. 192.
17. Chang J.J., Misset H., McGregor H. Phospholipase A function and pharmacological regulation //Biochem. Pharmacol. — 1987 — Vol. 36. — P. 2429—2436.
18. Irvine R.F., Moor R.M., Pollock W.L. et al. Inositol phosphates: proliferation, metabolism and function //Phil Trans Roy. Soc. — London, 1988. — Vol. 320. — P. 281—298.
19. Milani D., Malgaroli A., Guidolin D et al. Ca²⁺-channels and intracellular Ca²⁺-stores in neuronal and neuroendocrine cells //Cell Calcium. — 1990. — Vol. 11 — P. 191—199.