

Окислительная модификация липидов и протеинов при остром инфаркте миокарда

Рагино Ю.И., Садовский Е.В., Кривчун А.С., Баум В.А., Полонская Я.В.

НИИ терапии Сибирского Отделения РАМН, г. Новосибирск

Абстракт

Изучены взаимосвязи окисленно модифицированных липидов и протеинов с нарушениями гемостаза и функции эндотелия при осложнении коронарного атеросклероза - остром инфаркте миокарда (ИМ). Показано, что у мужчин с ИМ окислительная модификация фибриногена выше в 1,7 раза, чем у мужчин без ИБС. Повышенный уровень окисленного фибриногена коррелирует с повышением в плазме крови и в липопротеинах низкой плотности уровня продуктов перекисного окисления липидов, фактора Виллебранда, продуктов деградации фибрина. Это сопровождается ускоренной лейкоцитарно-тромбоцитарной агрегацией, снижением уровня метаболитов NO и замедлением активности Хагеман-зависимого фибринолиза. Выявлены зависимые ассоциации уровня окисленного фибриногена с ИМ и с характерными для него показателями тромбогенных и гиперкоагуляционных нарушений гемостаза и функции эндотелия.

Выявлена взаимосвязь уровня окисленного фибриногена с ИМ и с характерными для него показателями тромбогенных и гиперкоагуляционных нарушений гемостаза и функции эндотелия.

Ключевые слова: инфаркт миокарда, окисленный фибриноген, окислительная модификация липопротеинов низкой плотности, нарушения гемостаза, эндотелиальная дисфункция.

Oxidative modification of lipids and proteins in men with coronary atherosclerosis complication

Ragino Yu.I., Sadovskiy E.V., Krivchun A.S., Baum V.A., Polonskaya Ya.V.

Abstract

Relationships of lipids and proteins oxidative modifications with disturbances of hemostasis and of endothelial function in coronary atherosclerosis complication – acute myocardial infarction (MI) were studied. The oxidative modification of fibrinogen is 1,7 times higher in acute MI men in comparison with men without coronary heart disease. Increased oxidized fibrinogen level is correlated with increased levels of lipid peroxidation products in plasma and in low density lipoproteins, Willebrand factor, fibrin degradation products, with accelerated leukocyte-platelet aggregation, decreased of plasma NO metabolites level and delayed activity of Hageman-dependent fibrinolysis. Dependent associations of oxidized fibrinogen level with MI and parameters of typical thrombosis and hypercoagulatory hemostasis disturbances and endothelial function were revealed.

Keywords: myocardial infarction, oxidized fibrinogen, oxidized low density lipoproteins, hemostasis disturbances, endothelial dysfunction.

Окислительный стресс является одним из ведущих патогенетических компонентов сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) атеросклеротического генеза [1, 2]. При развитии окислительного стресса липиды и протеины становятся критическими элементами повреждающего действия активных кислородных метаболитов (АКМ), что приводит к их патологической окислительной модификации [3, 4]. Окисление липидов и протеинов способствует изменению их физико-химических свойств, нарушению конформационной структуры, фрагментации, агрегации, изменению физиологических функций [2, 5]. Окислительная модификация липидных и аполипипропротеиновых компонентов липопротеинов низкой плотности (ЛНП) является наиболее атерогенной. Повышенный уровень про-

дуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в ЛНП и их сниженная устойчивость к окислению часто выявляются у лиц с ИБС и коронарным атеросклерозом [2, 6, 7].

Повышенный уровень фибриногена является диагностически и прогностически значимым маркером атеросклероза, ассоциируется с его осложнениями и смертностью [8, 9]. Нарушения гемостаза в атерогенезе приводят к снижению тромборезистентности эндотелия, повышению агрегационной функции тромбоцитов и активности факторов свертывания, к угнетению фибринолитических функций эндотелия, что способствует развитию атеротромбоза [8, 10]. Показано, что окисленный фибриноген потенцирует активацию факторов свертывания крови, агрегацию тромбоцитов

и эритроцитов, повышенную секрецию цитокинов макрофагами, что приводит к тромбогенным нарушениям гемостаза [11, 12].

В атерогенезе процессы нарушения гемостаза ассоциированы с эндотелиальной дисфункцией. Хронический дефицит оксида азота (NO) потенцирует активацию окислительного стресса, повышение адгезии моноцитов к эндотелию, хемотаксис и пролиферацию гладкомышечных клеток. При повреждении эндотелиоцитов в крови повышается уровень эндотелиального вазоконстриктора эндотелина-1, стимулирующего экспрессию адгезивных молекул, в том числе молекул межклеточной (sICAM-1) и эндотелиоцитарной адгезии (sVCAM-1), повышается уровень фактора Виллебранда [13-15].

Тесная патогенетическая взаимосвязь окислительных, коагуляционных и эндотелиоцитарных нарушений явилась теоретической основой настоящей работы, посвященной изучению взаимосвязи окисленно модифицированных липидов и протеинов с нарушениями гемостаза и функции эндотелия при остром инфаркте миокарда (ИМ).

Материалы и методы

Материалом исследования была стабилизированная 3,8% раствором цитрата натрия кровь 17 здоровых доноров, а также 110 мужчин 35-65 лет, в среднем $52,5 \pm 2,5$ лет. В основную группу были включены 52 мужчины с ИБС и острым (1-я неделя) ИМ, находившиеся на стационарном лечении. Диагноз ИМ устанавливался на основании следующих критериев: типичный болевой приступ, изменения ЭКГ в 2-х и более последовательных отведениях с характерной для острого ИМ эволюцией (высокоамплитудный Т, отрицательный Т, подъем сегмента ST, патологический зубец Q, депрессия сегмента ST), динамические изменения в уровне маркеров ИМ (КФК, КК-MB, ТнТ, ТнI, миоглобин). В контрольную группу были включены 58 мужчин без ИБС. В исследование не включались лица с сахарным диабетом. Между группами мужчин не было значимых различий по основным факторам риска ИБС.

В эксперименте *in vitro* использовали человеческий плазменный фибриноген (Sigma). Раствор фибриногена (3 мг/мл 0,1 М фосфатно-солевого буфера, pH 7,4) подвергали окислительной модификации в присутствии 1 мМ растворов ионов Cu^{2+} , ЭДТА и 0,3-3 мМ раствора H_2O_2 в течение 60 минут в параллельных пробах, одна из которых была в качестве контроля за степенью окисления фибриногена. В пробирки с 10 мл цитратной крови вносили по 0,5 мл раствора окисленного фибриногена из 2-й параллели, перемешивали и исследовали с помощью стандартных методов гемостаза. Контролем служила кровь здоровых доноров.

Биохимические исследования плазмы крови 2-х групп мужчин включали оценку параметров системы гемостаза, процессов ПОЛ в крови

и в ЛНП, окислительной модификации протеинов крови, аполипопротеинов ЛНП (ок-апоЛНП) и фибриногена, параметров эндотелиальной функции. Из показателей гемостаза в плазме крови оценивались лейкоцитарно-тромбоцитарная агрегация (ЛТА) [16], а также гемолизат-агрегационный тест (ГАТ), уровень фибриногена, содержание растворимых фибрин-мономерных комплексов (РФМК), антитромбин III, активность Хагеман-зависимого фибринолиза (ХЗФ), протромбиновый индекс (ПТИ) и расчетное международное нормализованное отношение (МНО) с использованием наборов «Технология Стандарт» по методам Баркагана З.С. [10].

Уровень продуктов ПОЛ в плазме, исходный уровень продуктов ПОЛ в ЛНП (по концентрации конечного продукта окисления липидов – малонового диальдегида, МДА) и резистентность ЛНП к окислению (оцениваемая по уровню продуктов ПОЛ в ЛНП через 30 минут их инкубации *in vitro* с катализаторами окисления) определяли флуориметрическим методом. Определение ок-апоЛНП проводили фотометрическим методом [17, 18]. Определение окислительной модификации белков плазмы проводили фотометрическим методом, окислительную модификацию фибриногена определяли после проведения реакции с 2,4-динитрофенилгидразином [19].

Из параметров эндотелиальной функции оценивали уровень метаболитов NO в плазме спектрофотометрическим методом после депротеинизации плазмы и восстановления NO_3^- до NO_2^- с помощью гранулированного кадмия [20], уровни фактора Виллебранда, эндотелина-1 и sVCAM в плазме методами иммуноферментного анализа с использованием тест-систем Axis, Biomedica и Bender Medsystems, соответственно.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы SPSS for Windows с применением корреляционного, линейного регрессионного и One-Way ANOVA анализов с использованием критерия Даннета для множественного сравнения. Критерием достоверности считалось $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В результате 1 ч окисления фибриногена *in vitro* в металл-катализируемой системе Cu^{2+} - H_2O_2 была получена его окислительная модификация $83,2 \pm 2,2$ ЕД/мг фибриногена. Добавление в кровь 0,5 мл раствора окисленного фибриногена не изменяло его концентрацию в плазме и pH плазмы.

При исследовании влияния окисленного фибриногена на параметры гемостаза *in vitro* у здоровых доноров было выявлено ускорение лейкоцитарно-тромбоцитарной агрегации на 15% ($7,2 \pm 0,1$ и $8,5 \pm 0,2$ сек., $p < 0,05$, соответственно) и укорочение времени ГАТ на 26% ($15,9 \pm 1,1$ и $21,4 \pm 1,4$ сек., $p < 0,05$, соответственно) в срав-

нении с контролем, что свидетельствует о повышении активности сосудисто-тромбоцитарного звена системы гемостаза под влиянием окисленного фибриногена.

При исследовании окислительных изменений липидов и протеинов в плазме при ИМ были определены различия между группами мужчин (Таблица 1).

Таблица 1. Параметры окислительных изменений липидов и протеинов, гемостаза и функции эндотелия в плазме обследованных лиц.

Показатели	Инфаркт миокарда, n=52	Контроль, n=58
Продукты ПОЛ в плазме, нМ МДА/мг белка плазмы	3,5±0,2*	2,1±0,1
Исходный уровень продуктов ПОЛ в ЛНП, нМ МДА/мг ЛНП	3,6±0,3*	2,1±0,1
Резистентность ЛНП к окислению, нМ МДА/мг ЛНП	24,9±2,3*	20,1±2,0
Окисленные белки, ЕД/мл плазмы	4,8±0,3*	3,4±0,1
Ок-апоЛНП, ЕД/мг белка ЛНП	31,7±2,6*	24,1±2,0
Окисленный фибриноген, ЕД/мг фибриногена/мл плазмы	19,4±1,1*	11,6±0,7
Фибриноген, г/л	3,7±0,1*	3,1±0,1
ЛТА, сек.	7,4±0,2*	8,8±0,2
ГАТ x 102, сек	16,1±0,5	16,5±0,5
РФМК, мг/л	97,8±8,7*	68,1±4,8
ХЗФ, мин.	32,9±3,2*	22,4±1,9
Эндотелин-1, пмоль/л	484,5±46,0*	306,7±37,2
Фактор Виллебранда, МЕ/мл	2,5±0,1*	1,3±0,1
Метаболиты NO, мкМ/л	4,0±0,3*	7,5±0,3
sVCAM, нг/мл	798,8±50,2	741,6±49,8

Примечания: *- $p<0,05$ в сравнении с контролем.

Так, у мужчин с острым ИМ уровни продуктов ПОЛ в плазме, исходный уровень продуктов ПОЛ в ЛНП были выше в 1,7 раза, а резистентность ЛНП к окислению *in vitro* – ниже в 1,2 раза в сравнении с контрольной группой.

При остром ИМ окислительные изменения всех протеинов в плазме были выше в 1,4 раза, а окислительная модификация апоЛНП – в 1,3 раза, чем в контроле.

Поскольку известно, что наиболее подверженными воздействию факторов окислительного стресса являются фибриноген и другие гликопротеины [4, 5], была исследована окислительная модификация фибриногена плазмы.

Были выявлены существенные различия между группами мужчин: при остром ИМ окислительная модификация фибриногена была выше в 1,7 раз в сравнении с контрольной группой.

Определены значимые корреляционные связи уровня окисленного фибриногена с активностью процесса ПОЛ в плазме ($r=0,182$, $p<0,01$), исходным уровнем продуктов ПОЛ в ЛНП ($r=0,191$,

$p<0,01$) и наличием ИМ ($r=0,389$, $p<0,01$), но не с окисленными белками плазмы.

Линейный регрессионный анализ не показал зависимости уровня окисленного фибриногена от других параметров окисления: при включении окисленного фибриногена в модель в качестве зависимой переменной – степень влияния других параметров окисления не была статистически значимой.

Поскольку фибриноген является одним из ключевых факторов процесса свертывания крови, нарушения которого со склонностью к тромбоцистическим изменениям являются одним из центральных звеньев патогенеза ИМ, были изучены связи окисленного фибриногена с параметрами системы гемостаза. При исследовании сосудисто-тромбоцитарного звена гемостаза были выявлены различия между группами мужчин в скорости лейкоцитарно-тромбоцитарной агрегации (Таблица 1). Так, ЛТА при остром ИМ была ускорена в 1,2 раза в сравнении с контролем. В коагуляционном звене гемостаза также были обнаружены

различия между группами мужчин. При остром ИМ уровень фибриногена был выше в 1,2 раза в сравнении с контролем, хотя, в целом, уровни фибриногена во всех группах мужчин были в пределах нормальных значений. Уровни РФМК (продуктов деградации фибрина) были выше при остром ИМ в 1,4 раза, чем в контрольной группе, что свидетельствует об активности процесса образования тромбина, характерной для тромботических состояний и гиперкоагуляции. Выявленное удлинение времени ХЗФ при остром ИМ в сравнении с контролем в 1,5 раза свидетельствует о сниженной активности фибринолиза при ИМ.

Показаны прямая корреляционная связь окислительной модификации фибриногена с содержанием РФМК ($r=0,279$, $p<0,01$) и обратная – с временем ЛТА ($r=-0,257$, $p<0,01$) и ХЗФ ($r=-0,219$, $p<0,01$). Линейный регрессионный анализ подтвердил выявленные корреляционные связи. Были получены зависимости показателей уровня РФМК и времени ЛТА и ХЗФ (зависимые переменные, стандартизованные коэффициенты Beta 0,359, -0,297 и -0,362, $p<0,05$, соответственно) от выраженности окислительной модификации фибриногена (независимая переменная), что согласуется с результатами межгруппового сравнения.

Нарушения сосудисто-тромбоцитарного и коагуляционного звеньев гемостаза и процессы окисления тесно связаны с сосудистым эндотелием и его функциями [13, 14], что имеет значение в развитии атеротромботических осложнений.

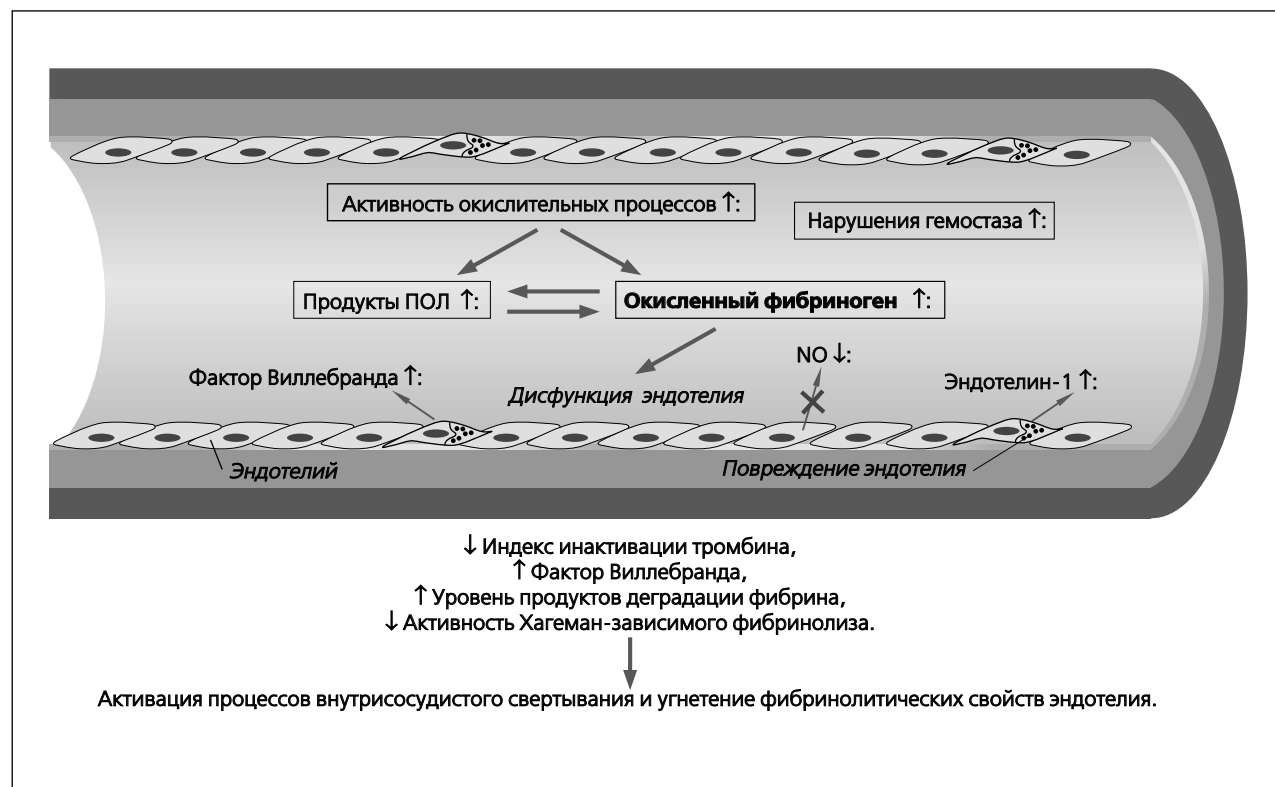
Выявление связи окисленного фибриногена с процессами окисления и нарушениями гемостаза определило необходимость изучения возможного влияния окисленного фибриногена и на эндотелиальную функцию.

При исследовании уровня метаболитов NO в плазме отмечено, что этот показатель был ниже в 1,9 раза при остром ИМ в сравнении с контрольной группой (Таблица 1).

Фактор Виллебранда является фактором гемостаза, стабилизирующим прокоагулянтный протеин фактор VIII:C и потенцирующим адгезию тромбоцитов к субэндотелию посредством гликопротеиновых рецепторов Ib, а также тромбоцитарное взаимодействие через гликопротеиновые рецепторы IIb/IIIa. Последние являются точкой взаимодействия фактора Виллебранда и фибриногена. Показано значительное потенцирование адгезии и агрегации тромбоцитов посредством активации рецепторов IIb/IIIa при повышенном уровне фактора Виллебранда в присутствии фибриногена, что позволяет некоторым авторам рассматривать сочетанное увеличение в крови концентраций этих факторов как один из ключевых предикторов гиперкоагуляции [14]. Нами при исследовании фактора Виллебранда в плазме отмечено повышение этого показателя при остром ИМ в 1,9 раз в сравнении с контролем.

При исследовании уровня эндотелина-1 в плазме определено повышение этого показателя у мужчин с острым ИМ в 1,6 раз в сравнении с кон-

Рисунок 1. Параметры окислительных изменений липидов и протеинов, гемостаза и функции эндотелия в плазме обследованных лиц.



трольной группой. Значимых различий в содержании молекул эндотелиоцитарной адгезии sVCAM между группами мужчин не было.

Поскольку одна из ключевых ролей в развитии дисфункции и деструкции эндотелия отводится факторам окислительного стресса [2, 13, 15], был проведен корреляционный анализ связи окислительной модификации фибриногена с параметрами функции эндотелия. Показаны прямая корреляционная связь уровня окисленного фибриногена с уровнем фактора Виллебранда ($r=0,365$, $p<0,01$) и обратная – с уровнем метаболитов NO ($r=-0,272$, $p<0,01$). Линейный регрессионный анализ подтвердил ассоциации окисленного фибриногена с указанными параметрами эндотелиальной дисфункции. Получены зависимости уровней фактора Виллебранда и метаболитов NO (зависимые переменные, стандартизованные коэффициенты Beta 0,277 и 0,341, $p<0,05$, соответственно) от выраженности окислительной модификации фибриногена (независимая переменная).

На основании полученных результатов можно подчеркнуть, что при ИМ, наряду с повышенными окислительными изменениями липидов, ЛНП и протеинов плазмы, наблюдается значительная окислительная модификация фибриногена, не зависящая от концентрации фибриногена. Окисленный фибриноген потенцирует потенциально протромбогенные изменения сосудисто-тромбоцитарного звена гемостаза, в частности, ускорение лейкоцитарно-тромбоцитарной агрегации. Выявленные при остром ИМ, признаки нарушения системы гемостаза тромботического и гиперкоагуляционного характера, такие как ускоренная лейкоцитарно-тромбоцитарная агрегация, повышенный уровень продуктов деградации фибрина и сниженная активность Хагеман-зависимого фибринолиза, а также признаки эндотелиальной дисфункции, такие как сниженный уровень NO и повышенный уровень фактора Виллебранда, ассоциированы с окислительными изменениями фибриногена плазмы (Рисунок 1).

Список литературы.

1. Ланкин В.З., Тихазе А.К., Беленков Ю.Н. Свободнорадикальные процессы при заболеваниях сердечно-сосудистой системы. Кардиология. 2000;7: 48-62.
2. Stocker R, Kearney JF. New insights on oxidative stress in the artery wall. J Thromb Haemost. 2005;3(8):1825-1834.
3. Меньшикова Е.Б., Зенков Н.К., Ланкин В.З. и соавт. Окислительный стресс: Патологические состояния и заболевания. - Новосибирск: АРТА, 2008. 284 с.
4. Рагино Ю.И., Баум В.А., Полонская Я.В. и соавт. Атеросклероз и окислительные процессы. Новые способы оценки окисленных белков. Бюллетень СО РАМН. 2006;4(122): 67-74.
5. Stadtman ER, Levine RL. Protein oxidation. Annals of N.Y. Academy of Sciences. 2000;899: 191-208.
6. Steinberg D. The LDL modification hypothesis of atherogenesis: an update. J Lipid Res. 2009;Suppl:S376-S381.
7. Рагино Ю.И., Полонская Я.В., Семаева Е.В. и соавт. Атерогенные окислительная и структурная модификации липопротеинов низкой плотности у мужчин с коронарным атеросклерозом. Кардиология. 2007;11:14-19.
8. Koukkunen H, Penttilä K, Kempainen A, et al. C-reactive protein, fibrinogen, interleukin-6 and TNF- α in the prognostic classification of unstable angina pectoris. Ann Med. 2001;33(1):37-47.
9. Paramo JA, Belouqui O, Roncal C, et al. Validation of plasma fibrinogen as a marker of carotid atherosclerosis in subjects free of clinical cardiovascular disease. Hematology. 2004;89:1226-1231.
10. Баркаган З.С., Момот А.П. Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза. -М.: "Ньюдиамед-АО", 2001.-296 с.
11. Асейчев А.В., Азизова О.А., Жамбалова Б.А. Изучение влияния УФ-модифицированного фибриногена на агрегацию тромбоцитов в составе обогащенной тромбоцитами плазмы. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2002;133(1):51-54.
12. Ройтман Е.В., Азизова О.А., Морозов Ю.А., Асейчев А.В. Влияние окисленных форм фибриногена на свертывание крови. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2004;138(9):277-279.
13. Bebrendt D, Ganz P. Endothelial function. From vascular biology to clinical applications. Am. J. Cardiology. 2002;90:40L-48L.
14. De Meyer R, Hoylaerts MF, Kockx MM et al. Intimal deposition of functional von Willebrand factor in atherogenesis. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 1999;19:2524-2534.
15. Wang X, Connolly TM. Biomarkers of vulnerable atheromatous plaques: translational medicine perspectives. Adv. Clin. Chem. 2010;50:1-22.
16. Громов А.А., Рабко А.В., Кручинина М.В., Баум В.А. Лейкоцитарно-тромбоцитарная агрегация при инфаркте миокарда и нестабильной стенокардии. Вестник НГУ. 2006;4(2):31-38.
17. Рагино Ю.И., Воевода М.И., Душкин М.И. и соавт. Применение новых биохимических способов для оценки окислительно-антиоксидантного потенциала липопротеинов низкой плотности. Клиническая лабораторная диагностика. 2005;4:11-15.
18. Рагино Ю.И., Полонская Я.В., Садовский Е.В. Способ определения окислительной модификации апопротеинов в липопротеинах низкой плотности. Клиническая лабораторная диагностика. 2007;6:13-17.
19. Рагино Ю.И., Баум В.А., Полонская Я.В., Громов А.А. Способ определения окислительной модификации фибриногена плазмы крови. Клиническая лабораторная диагностика. 2007;1:13-16.
20. Голиков П.П., Николаева Н.Ю. Метод определения нитрита/нитрата (NOx) в сыворотке крови. Биомедицинская химия. 2004;50(1):79-85.