

УДК 577.152.193:616.379-008.64:616.1

©Коллектив авторов

ПОВЫШЕННАЯ АКТИВНОСТЬ МИЕЛОПЕРОКСИДАЗЫ – ФАКТОР РИСКА ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ СЕРДЦА У БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ

И.В. Горудко^{1}, В.А. Костевич^{2,3}, А.В. Соколов^{2,3}, И.В. Буко⁴,
Е.Э. Константинова⁴, Н.Л. Цапаева⁴, Е.В. Миронова⁴, Е.Т. Захарова²,
В.Б. Васильев², С.Н. Черенкевич¹, О.М. Панасенко³*

¹Белорусский государственный университет, физический факультет,
кафедра биофизики, Минск, пр. Независимости, 2, 220030 Беларусь;
тел.: (375-17)209-54-37; факс: (375-17)209-54-45; эл. почта: irinagorudko@rambler.ru

²НИИ экспериментальной медицины СЗО РАМН, Санкт-Петербург, Россия

³ФГУ НИИ физико-химической медицины ФМБА России, Москва, Россия

⁴Республиканский научно-практический центр “Кардиология”, Минск, Беларусь

Разработанным ранее (Биорг. химия. 2009, т. 35. с. 629-639) спектрофотометрическим методом в плазме крови больных сахарным диабетом 2 типа (СД 2 типа) без сердечно-сосудистых осложнений, а также с ишемической болезнью сердца (ИБС) выявлено достоверное увеличение активности миелопероксидазы (МПО) по сравнению с группой здоровых доноров. Достоверное увеличение концентрации МПО в плазме, измеренное с помощью иммуноферментного анализа, было обнаружено только у больных СД 2 типа с ИБС. Достоверная положительная корреляционная зависимость между активностью и количеством МПО в плазме крови была отмечена только в группе здоровых людей. Повышенная активность МПО не коррелировала с концентрацией МПО в плазме крови больных СД 2 типа и СД 2 типа в сочетании с ИБС. Совокупность полученных результатов свидетельствует, что при изучении роли МПО в развитии патологических процессов необходимо одновременно определять в крови больных количество фермента и его пероксидазную активность. Предложенный нами подход дает исчерпывающую информацию о соотношении активность/количество МПО в крови пациента. Поскольку высокая концентрация МПО является диагностически значимым параметром в прогнозировании развития дисфункции эндотелия и сердечно-сосудистых заболеваний, полученные результаты свидетельствуют о вкладе МПО-зависимых реакций в увеличение развития сердечно-сосудистых осложнений у больных СД. Активность МПО может служить дополнительным диагностическим критерием в определении риска развития ИБС при СД.

Ключевые слова: миелопероксидаза, сахарный диабет, нейтрофилы, пероксидазная активность, плазма крови, иммуноферментный анализ.

ВВЕДЕНИЕ. В последнее время отмечается рост числа эндокринных заболеваний, особенно сахарного диабета (СД), который называют болезнью XXI века. СД как 1, так и 2 типа является независимым фактором риска развития заболеваний сердечно-сосудистой системы, в частности, ишемической болезни сердца (ИБС), инфаркта миокарда, инсульта, патологии периферических артерий. Считается, что распространённость СД обуславливает рост числа кардиологических заболеваний в целом. Дисфункция эндотелия рассматривается как одна из основных причин диабетических сосудистых осложнений. Появляется

Принятые сокращения: ИФА – иммуноферментный анализ; МПО – миелопероксидаза; СД – сахарный диабет; ИБС – ишемическая болезнь сердца; fMLP – N-формил-Met-Leu-Phe; ЛНП – липопротеины низкой плотности.

* - адресат для переписки

всё больше доказательств того, что важную роль в процессе поражения сосудов играют лейкоциты [1]. В частности, предполагают, что прайминг лейкоцитов может служить альтернативным фактором риска развития атеросклероза [2]. Изменение функциональных свойств лейкоцитов отмечено не только при СД [3], но и при острой гипергликемии [4]. Несмотря на то, что существует связь между функциональной активностью лейкоцитов, развитием диабетической эндотелиальной дисфункции и атеросклерозом, молекулярные механизмы, вовлеченные в эти процессы, остаются до конца не выясненными.

МПО – гем-содержащий фермент – в больших количествах (до 5% общего клеточного белка) содержится, главным образом, в азурофильных гранулах нейтрофилов и высвобождается во внеклеточное пространство при активации клеток. За последние годы накоплено большое количество данных о том, что МПО играет важную роль в опосредованном лейкоцитами повреждении сосудов при воспалительных сосудистых заболеваниях, таких как атеросклероз [5]. Исследования *in vitro* и *in vivo* показали, что МПО взаимодействует с сосудистой стенкой посредством различных механизмов, включая связывание и трансцитоз через эндотелиальные клетки, продукцию сильных окислителей – гипогалоидных кислот (НОСІ и НОВr), окисление оксида азота и нитрование тирозина [6]. МПО способствует модификации липопротеинов низкой плотности (ЛНП), что может служить одним из основных механизмов вовлечения фермента в развитие заболеваний сердечно-сосудистой системы [7]. Высокие концентрации МПО, её биомаркера – 3-хлоротирозина и ЛНП, модифицированных под действием НОСІ, обнаружены в атеросклеротических бляшках [7, 8].

Увеличение активности МПО выявлено в сосудах крыс с диабетом [1]. Предполагается, что активация лейкоцитов с последующей секрецией МПО может вносить вклад в развитие атеросклероза и заболеваний сердечно-сосудистой системы, особенно у больных СД, для которых характерны глубокие нарушения обменных процессов. Однако роль МПО в развитии атеросклероза у больных СД изучена недостаточно. В последнее время были проведены исследования, свидетельствующие об изменении как содержания, так и активности МПО у больных СД, однако их результаты противоречивы. Так, при СД выявлено увеличение активности МПО в нейтрофилах [9] и стекловидном теле глаза [10], а по результатам других исследований [11], показано ее снижение в лейкоцитах больных СД по сравнению с практически здоровыми лицами. Что касается измерений концентрации МПО, установлено увеличение содержания фермента в плазме крови детей с СД 1 типа [12], а по данным работы [13], не было выявлено достоверных изменений концентрации МПО в плазме у женщин в постменопаузе ни с нормальным метаболизмом глюкозы, ни у больных СД 2 типа.

В клинических исследованиях определение уровня МПО в крови осуществляется с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) с применением моноклональных антител к МПО [14]. Метод обладает высокой чувствительностью и специфичностью, но он не позволяет оценивать функциональную активность фермента, которая в крови может регулироваться посредством различных механизмов [15]. Однако именно активность МПО в конечном итоге определяет степень участия фермента в развитии патологических процессов.

Учитывая сказанное выше, в настоящей работе мы сфокусировали внимание на определении концентрации и активности МПО в плазме крови больных СД 2 типа без сердечно-сосудистых осложнений, а также с ИБС. Впервые с использованием ранее разработанных методических подходов [14] нами проведен сравнительный анализ количества МПО и её ферментативной активности в крови указанных больных.

МЕТОДИКА. Всего в исследование включено 137 пациентов. Перед проведением всех процедур бралось письменное информированное согласие пациентов. Протокол исследования был рецензирован и одобрен Комитетом по этике Республиканского научно-практического центра “Кардиология”

(г. Минск). Все лица, включенные в исследование, прошли тщательное клинико-инструментальное и лабораторное обследование, включающее эхокардиографию, ультразвуковое исследование брахиоцефальных, почечных артерий, а также артерий нижних конечностей, суточное мониторирование ЭКГ и артериального давления, нагрузочную велоэргометрическую пробу, при наличии показаний - коронароангиографию. Был проведен также биохимический анализ крови с определением уровней глюкозы, гликированного гемоглобина, показателей липидного состава плазмы крови, общий анализ крови с определением уровня глюкозы натощак. После обследования пациенты направлялись на консультации к эндокринологу и кардиологу. Таким образом, для проведения данного исследования были сформированы 3 группы: группа I – 47 практически здоровых лиц (средний возраст 47 ± 4 лет; женщин 28, мужчин 19); группа II – 52 больных СД 2 типа без клинически значимых признаков сердечно-сосудистых осложнений (средний возраст 48 ± 4 ; женщин 30, мужчин 22); группа III – 38 пациентов с СД 2 типа в сочетании с ИБС – стабильная стенокардия напряжения 2-3 функционального класса (средний возраст 55 ± 5 ; 8 женщин, 30 мужчин). В группе I средние значения показателей глюкозы натощак составили $4,94 \pm 0,27$ мМ, гликированного гемоглобина $5,41 \pm 0,43\%$, триглицеридов $1,60 \pm 0,08$ мМ. Средние значения указанных показателей в группах II и III составили $6,19 \pm 0,31$ мМ, $6,05 \pm 0,51\%$ и $1,99 \pm 0,11$ мМ; $7,34 \pm 0,43$ мМ, $6,14 \pm 0,58\%$ и $2,24 \pm 0,13$ мМ соответственно.

Пероксидазную активность МПО в плазме оценивали по окислению хромогенного субстрата *o*-дианизидина (3,8 мМ) после его разбавления буферным раствором (0,2 М Na_2HPO_4 / 0,1 М лимонной кислоты, pH 4,5) в 13,3 раза (60 мкл плазмы до объёма образца 800 мкл), как описано в работе [14]. Для исключения возможного влияния на результат других пероксидаз в плазму добавляли ингибитор МПО – гидразид 4-аминобензойной кислоты (50 мкМ). Реакцию запускали добавлением H_2O_2 в концентрации 100 мкМ и в кинетическом режиме в течение 68 мин регистрировали скорость снижения оптической плотности при 460 нм ($\Delta A_{460}/\text{мин}$) на спектрофотометре PV 1251с (“СОЛАР”, Минск, Беларусь) при 23°C.

Активность МПО в плазме вычисляли согласно соотношению:

$$A_{\text{МПО}} = (\Delta A/\text{мин} - \Delta A_{\text{инг}}/\text{мин}) \times (V/v),$$

где $\Delta A/\text{мин}$ и $\Delta A_{\text{инг}}/\text{мин}$ – скорость окисления *o*-дианизидина в отсутствие и в присутствии ингибитора соответственно; V – общий объём реакционной смеси; v – объём образца плазмы. В нашем случае $V/v=13,3$. Скорость окисления *o*-дианизидина определяли по тангенсу угла наклона начального линейного участка кинетической кривой, содержащей минимум 6 экспериментальных точек, по линейной экстраполяции с использованием статистической программы графического редактора Origin 7.0.

Измерение количества МПО в плазме осуществляли с помощью разработанной ранее оригинальной методики ИФА с использованием антител против МПО, полученных иммунизацией крыс и кроликов. Методика характеризуется высокой чувствительностью и позволяет выявлять в плазме МПО в диапазоне 0,2250 нг/мл [14].

Активность лизоцима в плазме определяли по скорости лизиса бактериальных клеток *Micrococcus lysodeikticus*, как описано ранее [16]. Анализируемую пробу (25 мкл плазмы) добавляли к 0,5 мл суспензии лиофилизированных клеток *Micrococcus lysodeikticus* (0,2 мг/мл) в 0,1 М $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ буфере, pH 6,2 и измеряли кинетику снижения оптической плотности при 450 нм в течение 4 мин с помощью спектрофотометра PV 1251с (“СОЛАР”) при 23°C.

Выделение нейтрофилов осуществляли из донорской крови, стабилизированной 3,8% раствором цитрата натрия в соотношении 9:1 (по объёму), путём центрифугирования в градиенте плотности лимфопрэпа, как описано ранее [17]. Клетки суспендировали в фосфатно-солевом буфере (10 мМ $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$,

137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 0,9 mM CaCl₂, 0,5 mM MgCl₂, 5 mM D-глюкозы, pH 7,3) и хранили при 4°C. Содержание нейтрофилов в клеточной суспензии составляло 97-98%, число жизнеспособных клеток по тесту с трипановым синим было не менее 96%.

Продукцию H₂O₂ нейтрофилами оценивали флуоресцентным методом на компьютеризированном спектрофлуориметре LSF1211A ("СОЛАР") с использованием скополетина в качестве субстрата пероксидазной реакции, как описано ранее [17]. fMLP в концентрации 100 нМ добавляли к 1,5 мл суспензии нейтрофилов (10⁶ клеток/мл в фосфатно-солевом буфере, 37°C), содержащей 1 мкМ скополетина, 20 мкг/мл пероксидазы хрена и 1 mM NaN₃. Кинетику окисления скополетина регистрировали по уменьшению интенсивности флуоресценции при 460 нм (возбуждение при 350 нм). Скорость продукции H₂O₂ клетками определяли по тангенсу угла наклона линейного участка кинетической кривой убыли интенсивности флуоресценции скополетина в результате его окисления H₂O₂ в присутствии пероксидазы хрена.

Соли, использованные для приготовления буферных растворов, а также цитрат натрия, метанол, *o*-дианизидин, гидразид 4-аминобензойной кислоты, H₂O₂, N-формил-Met-Leu-Phe (fMLP) были получены от фирмы "Sigma-Aldrich" (США). Использованы также декстран Т 70 от фирмы "Roth" (Германия); скополетин, пероксидаза хрена, азид натрия, лимфопреп фирмы "Nycomed" (Норвегия), хроматографические сорбенты "Pharmacia" (Швеция), 3% раствор H₂O₂ "Sagmel" (США), антитела коз против IgG кролика, меченые пероксидазой хрена, обезжиренное сухое молоко от фирмы "BioRad" (США).

Статистическую обработку данных проводили с использованием критериев Стьюдента и Пирсона.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. У больных группы II (СД 2 типа) и группы III (СД 2 типа в сочетании с ИБС) было выявлено увеличение количества лейкоцитов по сравнению с контрольной группой I, при этом достоверные отличия ($p < 0,01$) наблюдались только в случае больных группы III (рис. 1). Как показано на рисунке 2, увеличение fMLP-индуцированной продукции H₂O₂ нейтрофилами было отмечено как в группе II, так и в группе III по сравнению с группой I, при этом достоверное увеличение ($p < 0,05$) респираторного взрыва нейтрофилов было зарегистрировано только в группе II. Последний результат свидетельствует в пользу того, что нейтрофилы больных СД 2 типа находятся в праймированном состоянии.

Измерение содержания МПО в плазме крови методом ИФА выявило увеличение количества фермента по сравнению с контролем как в группе больных II, так и в группе III. Однако достоверные от контрольной группы отличия ($p < 0,05$) были обнаружены лишь в группе больных III (рис. 3а). При исследовании пероксидазной активности МПО в плазме достоверное увеличение по сравнению с контролем наблюдалось как в случае больных группы II, так и больных группы III (рис. 3б). Отметим, что в плазме этих же больных активность лизоцима, который также, как МПО, содержится в азурофильных гранулах нейтрофилов, не отличалась от контроля (данные не представлены).

При изучении взаимосвязи между активностью и содержанием МПО в плазме обследованных групп установлено, что достоверная положительная корреляционная зависимость между этими двумя показателями существует только в случае контрольной группы I (рис. 4), для которой уровень МПО в плазме не превышает 170 нг/мл, а активность – 0,18 ΔA₄₆₀/мин. Как следует из рисунка 4, аналогичная зависимость для больных СД 2 типа без признаков ИБС (группа II) хотя и не была достоверной, но сохраняла такую же тенденцию. В случае группы III (больные СД 2 типа с наличием ИБС) также не было найдено достоверной корреляции повышенной активности МПО с концентрацией фермента, более того, увеличение содержания фермента в плазме сопровождалось тенденцией к снижению его активности.

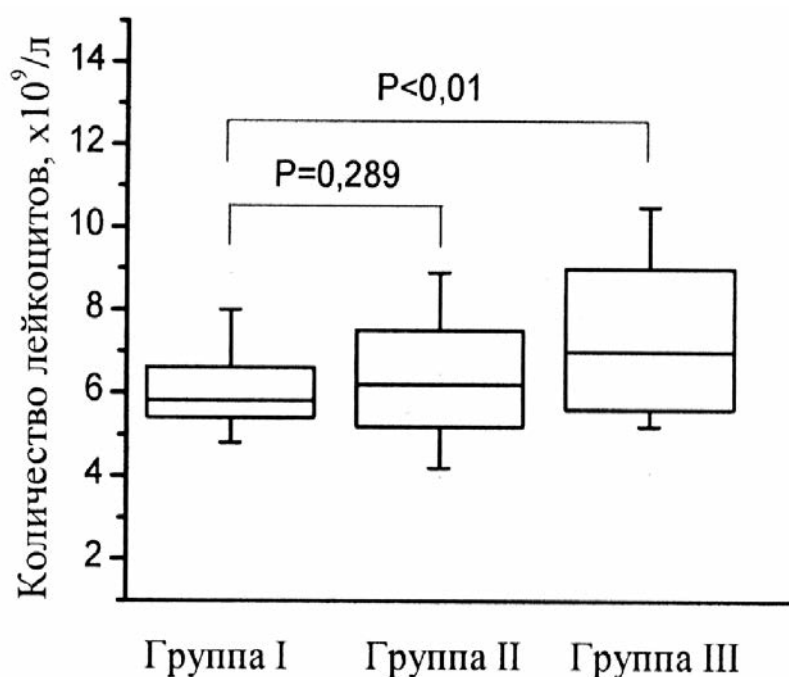


Рисунок 1.

Количество лейкоцитов в крови здоровых людей (группа I), больных СД 2 типа (группа II) и СД 2 типа с признаками ИБС (группа III). На рисунке отображена медиана с 25/75 перцентилями и доверительный уровень 95%.

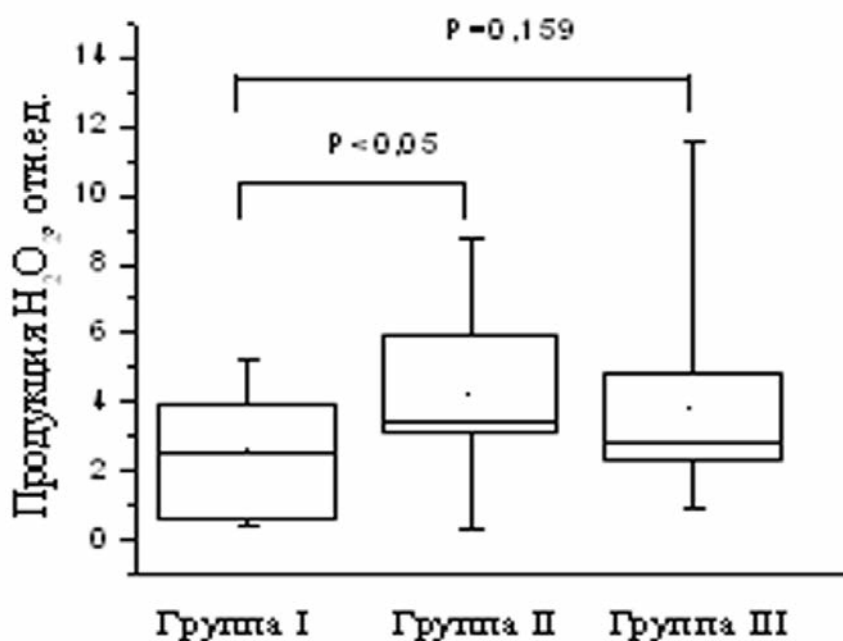
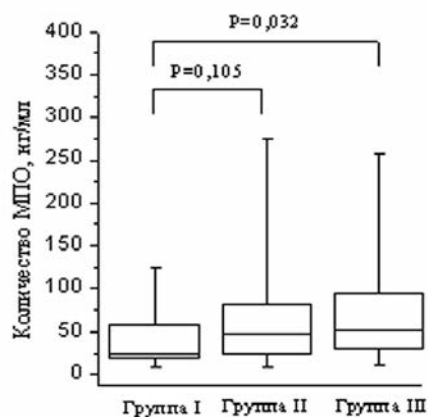


Рисунок 2.

Скорость fMLF-индуцированной продукции H₂O₂ нейтрофилами здоровых людей (группа I), больных СД 2 типа (группа II) и СД 2 типа с признаками ИБС (группа III). На рисунке отображена медиана с 25/75 перцентилями и доверительный уровень 95%. Измерения проводили при 37°C в фосфатно-солевом буфере, содержащем 10 mM Na₂HPO₄/KH₂PO₄, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 0,9 mM CaCl₂, 0,5 mM MgCl₂, 5 mM D-глюкозы, pH 7,3. Суспензия нейтрофилов содержала 1 мкМ скополетина, пероксидазу хрена (20 мкг/мл) и 1 mM NaN₃. Интенсивность флуоресценции скополетина измеряли при 460 нм, длина волны возбуждения - 350 нм.

а



б

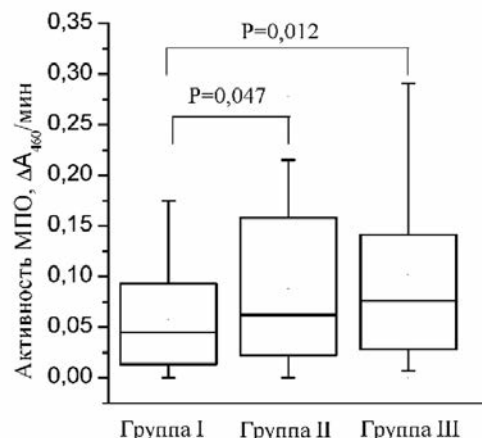


Рисунок 3.

Количество (а) и активность МПО (б) в плазме крови здоровых людей (группа I), больных СД 2 типа (группа II) и СД 2 типа с признаками ИБС (группа III). На рисунке отображена медиана с 25/75 перцентилями и доверительный уровень 95%.

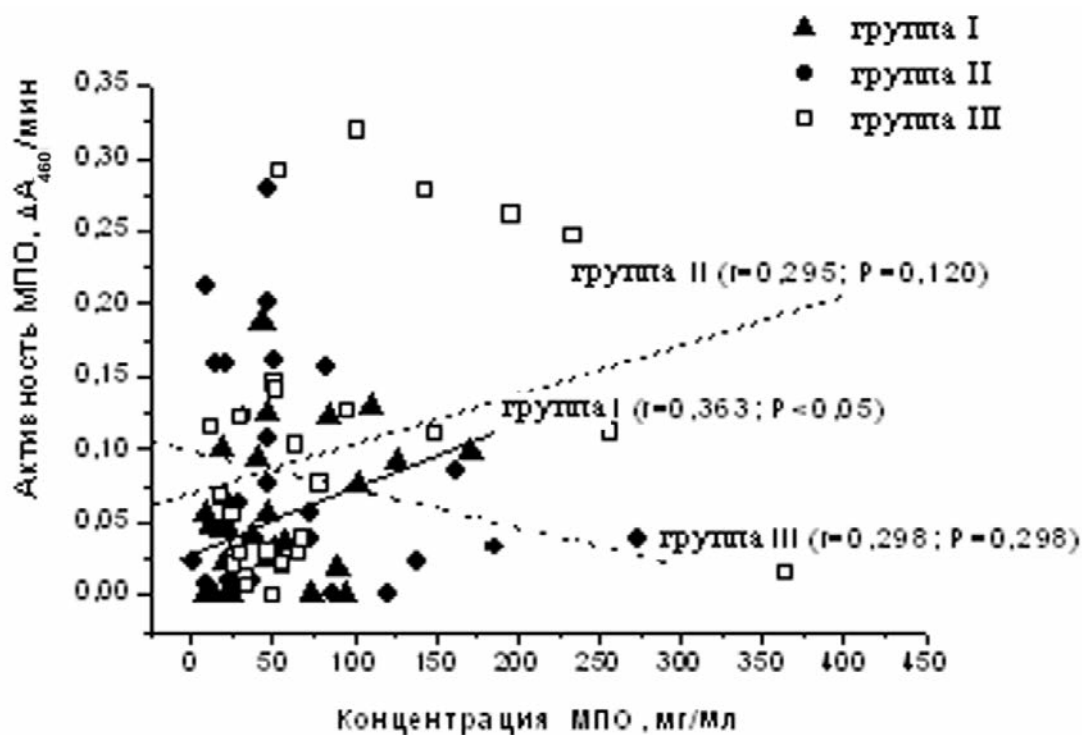


Рисунок 4.

Взаимосвязь между концентрацией МПО в плазме, измеренной с помощью ИФА, и пероксидазной активностью МПО, определённой спектрофотометрическим методом, в группе здоровых людей (группа I), больных СД 2 типа (группа II) и СД 2 типа с признаками ИБС (группа III).

Таким образом, результаты, полученные в работе, свидетельствуют о том, что у больных СД 2 типа наблюдаются изменения функциональной активности нейтрофилов. Так, в группе больных СД 2 типа выявлена тенденция к повышению количества лейкоцитов и увеличению респираторного взрыва

нейтрофилов (продукция H_2O_2) по сравнению с контролем, что свидетельствует о праймировании нейтрофилов при СД 2 типа и согласуется с данными других авторов [3]. Похожие результаты были получены и в случае больных СД 2 типа в сочетании с ИБС.

В плазме крови больных СД 2 типа мы наблюдали тенденцию к увеличению количества МПО ($p=0,105$). При этом у больных СД 2 типа в сочетании с ИБС наблюдалось достоверное увеличение концентрации МПО в плазме крови ($p<0,05$). Полученные результаты согласуются с данными работы [12], авторы которой отмечали увеличение количества МПО в крови больных СД.

Важный и основной результат работы состоит в том, что нами впервые с использованием разработанного ранее метода [14] была исследована пероксидазная активность МПО в плазме крови больных СД 2 типа и СД 2 типа с наличием ИБС, а также проведён сравнительный анализ изменения концентрации МПО и её функциональной активности в плазме крови при указанных патологиях. Мы установили достоверное увеличение пероксидазной активности МПО как в плазме крови больных СД 2 типа, так и в плазме крови больных СД 2 типа с признаками ИБС, в то время как достоверное увеличение количества МПО наблюдалось только в плазме крови больных СД 2 типа с признаками ИБС. Повышенная активность и концентрация МПО в плазме не коррелировали с уровнем глюкозы (данные не приведены), что согласуется с ранее опубликованными результатами [12]. Положительная достоверная зависимость между активностью и концентрацией МПО в плазме крови была отмечена только в группе здоровых людей (рис. 4), что полностью подтверждает результаты, опубликованные нами ранее [14]. Однако, несмотря на то, что в плазме крови больных СД 2 типа без сердечно-сосудистых осложнений (группа II), а также у пациентов с СД 2 типа и ИБС (группа III) по сравнению с контролем было выявлено одновременно увеличение и активности, и концентрации МПО, достоверной корреляционной зависимости между этими двумя параметрами не было установлено. Вероятно, это связано со значительной вариацией активности МПО в плазме крови больных СД 2 типа. Такое непредсказуемое изменение активности МПО может быть обусловлено тем обстоятельством, что механизм функционирования фермента при СД 2 типа опосредован использованием в качестве субстрата не только H_2O_2 , продуцируемого активированными лейкоцитами, но и образующегося при окислении глюкозы [18]. В пользу данного предположения свидетельствуют результаты работы [1], в которой было показано, что МПО, связываясь с эндотелием, может задерживаться в сосудистой стенке и использовать в качестве субстрата H_2O_2 , образующийся при окислении глюкозы по независимому от лейкоцитов пути, и, таким образом, обострять воспаление сосудов при СД.

Следует отметить, что не установлено достоверных различий в активности лизоцима (фермента специфических и азурофильных гранул нейтрофилов) в плазме крови больных СД 2 типа и СД 2 типа в сочетании с ИБС по сравнению с контрольной группой. Недавно в работе [19] было показано уменьшение у больных с нарушением толерантности к глюкозе концентрации лактоферрина, являющегося маркером специфических гранул нейтрофилов. Можно предположить, по крайней мере, два механизма, посредством которых в плазме крови выявляется разная тенденция в проявлении активности ферментов специфических и азурофильных гранул. С одной стороны, праймированные и/или активированные нейтрофилы в зависимости от условий их активации и присутствующих реагентов могут избирательным образом секретировать содержимое разных типов гранул [20]. Например, в качестве факторов, потенцирующих выход МПО из нейтрофилов, могут выступать $TNF-\alpha$ [21], С-реактивный белок [22], галогенированные липиды [23] и др. С другой стороны, изменение активности ферментов может регулироваться различными факторами, присутствующими в плазме крови. Так установлено, что церулоплазмин, связываясь с МПО,

ингибирует её пероксидазную и хлорирующую активности, претендуя на роль эндогенного ингибитора активности фермента [15]. Важным регулятором активности МПО является также pH среды [24]. Что касается лизоцима, то его дезактивация может наблюдаться, например, под действием окислителей (НОСl и НОВr), образующихся в МПО-зависимых реакциях [25].

Поскольку нами не выявлено достоверной корреляции между активностью МПО и её концентрацией в плазме крови больных СД2, представляется перспективным при изучении роли этого фермента в развитии различных воспалительных заболеваний использовать предложенный нами ранее [14] и применённый в этой работе комплексный подход, позволяющий одновременно выявлять в крови больных количество МПО (метод ИФА с применением антител против МПО) и её пероксидазную активность (спектрофотометрический метод с применением ингибитора МПО). Этот подход дает исчерпывающую информацию о соотношении активность/количество МПО в крови больного. Совокупность полученных результатов и тот факт, что высокий уровень МПО предсказывает развитие заболеваний сердечно-сосудистой системы и дисфункцию эндотелия, свидетельствуют о важной роли МПО-зависимых реакций в увеличении риска развития ИБС у больных СД. Другими словами, увеличение концентрации и/или активности МПО может служить дополнительным фактором риска развития ИБС при СД.

В заключение отметим, что МПО может выступать в качестве фактора, определяющего течение воспаления (активированные лейкоциты) и окислительного стресса, а также эндотелиальную дисфункцию при СД. Разработанные нами и применённые в данной работе методы одновременного определения активности МПО и её концентрации в плазме крови могут быть использованы для создания принципиально новых подходов, которые в перспективе могли бы служить основой для разработки комплекса методов, направленных на прогноз, выявление дополнительных факторов риска и эффективности лечения ИБС у больных СД.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты 10-04-90006; 11-04-01262), БРФФИ (Б10Р-008).

ЛИТЕРАТУРА

1. Zhang C., Yang J., Jennings L.K. (2004) *Diabetes*, **53**, 2950–2959.
2. Jacobi J., Sela S., Cohen H.I., Chezar J., Kristal B. (2006) *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **290**, H2051–H2058.
3. Shurtz-Swirski R., Sela S., Herskovits A. T., Shasha S.M., Shapiro G., Nasser L., Kristal B. (2001) *Diabetes Care*, **24**, 104–110.
4. Stegenga M.E., van der Crabben S.N., Blümer R.M.E., Levi M., Meijers J.C.M., Serlie M.J., Tanck M.W.T., Sauerwein H.P., van der Poll T. (2008) *Blood*, **112**, 82–89.
5. Podrez E.A., Abu-Soud H.M., Hazen S.L. (2000) *Free Radic. Biol. Med.*, **28**, 1717–1725.
6. Lau D., Baldus S. (2006) *Pharmacol. Ther.*, **111**, 16–26.
7. Nicholls S.J., Hazen S.L. (2009) *J. Lipid Res.*, **50**, 346–351.
8. Daugherty A., Dunn J.L., Rateri D.L., Heinecke J.W. (1994) *J. Clin. Invest.*, **94**, 437–444.
9. Stenvinkel P., Rodríguez-Ayala E., Massy Z.A., Qureshi A.R., Barany P., Fellström B., Heimbürger O., Lindholm B., Alvestrand A. (2006) *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, **1**, 281–287.
10. Boker T., Augustin A.J., Breipohl W., Spitznas M., Lutz J. (1994) *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, **232**, 652–656.

11. Uchimura K., Nagasaka A., Hayashi R., Makino M., Nagata M., Kakizawa H., Kobayashi T., Fujiwara K., Kato T., Iwase K., Shinohara R., Kato K., Itoh M. (1999) *J. Diabetes Complications*, **13**, 264–270.
12. Heilman K., Zilmer M., Zilmer K., Lintrop M., Kampus P., Kals J., Tillmann V. (2009) *Diabetes Res. Clin. Pract.*, **84**, 168–173.
13. Schindhelm R.K., Alsema M., Diamant M., Teerlink T., Dekker J.M., Kok A., Kostense P.J., Nijpels G., Heine R.J., Scheffer P.G. (2008) *Metabolism*, **57**, 262–267.
14. Горудко И.В., Черкалина О.С., Соколов А.В., Пулина М.О., Захарова Е.Т., Васильев В.Б., Черенкевич С.Н., Панасенко О.М. (2009) *Биоорг. химия*, **35**(5), 1–11.
15. Sokolov A.V., Ageeva K.V., Pulina M.O., Cherkalina O.S., Samygina V.R., Vlasova I.I., Panasenko O.M., Zakharova E.T., Vasilyev V.B. (2008) *Free Rad. Res.*, **42**, 989–998.
16. Gorudko I.V., Timoshenko A.V., Timoshenko A.P., Vacker A.V., Timoshenko P.A., Cherenkevich S.N. (1997) *Central East Eur. J. Oto-Rhino-Laryngol. Head Neck Surg.*, **2**, 22–27.
17. Timoshenko A.V., Kayser K., Gabius H.J. (1998) *Meth. Mol. Med.*, **9**, 441–445.
18. Elgawish A., Glomb M., Friedlander M., Monnier V.M. (1996) *J. Biol. Chem.*, **272**, 12964–12971.
19. Moreno-Navarrete J.M., Ortega F.J., Bassols J., Ricart W., Fernández-Real J.M. (2009) *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **94**, 4036–4044.
20. Gewirtz A.T., Fokin V.V., Petasis N.A., Serhan C.N., Madara J.L. (1999) *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **276**, C988–C994.
21. Bajaj M.S., Kew R.R., Webster R.O., Hyers T.M. (1992) *Inflammation*, **16**, 241–250.
22. Singh U., Devaraj S., Jialal I. (2009) *Clin. Chem.*, **55**, 361–364.
23. Горудко И.В., Вахрушева Т.В., Мухортова А.В., Черенкевич С.Н., Тимошенко А.В., Сергиенко В.И., Панасенко О.М. (2010) *Биол. мембраны*, **27**(4), 314–324.
24. Власова И.И., Арнхольд Ю., Осипов А.Н., Панасенко О.М. (2006) *Биохимия*, **71**, 825–837.
25. Hawkins C.L., Davies M.J. (2005) *Chem. Res. Toxicol.*, **18**, 1600–1610.

Поступила: 24. 11. 2010.

INCREASED MYELOPEROXIDASE ACTIVITY IS A RISK FACTOR
FOR ISHEMIC HEART DISEASE IN PATIENTS WITH DIABETES MELLITUS

*I.V. Gorudko¹, V.A. Kostevich^{2,3}, A.V. Sokolov^{2,3}, I.V. Buko⁴, E.E. Konstantinova⁴, N.L. Tsapaeva⁴,
E.V. Mironova⁴, E.T. Zakharova², V.B. Vasilyev², S.N. Cherenkevich¹, O.M. Panasenko³*

¹Department of Biophysics, Belarusian State University, ul. Nezavisimosty, 4, Minsk, 220030 Belarus;
tel.: (375-17)209-5437; fax: (375-17)209-5445; e-mail: irinagorudko@rambler.ru

²Institute for Experimental Medicine of the Russian Academy of Medical Sciences,
Saint-Petersburg, Russia

³Research Institute of Physico-Chemical Medicine, Moscow, Russia

⁴Republican Science-Practical Center of Cardiology, Minsk, Belarus

Using previously developed spectro-photometrical method (Bioorg. Khim. 2009. V. 35. pp. 629-639), a significant increase of myeloperoxidase (MPO) activity was found in blood plasma of patients with type 2 diabetes mellitus (DM2) without of cardiovascular complications, as well as with ischemic heart disease (IHD). Plasma MPO concentration measured by an enzyme-linked immunosorbent assay was significantly higher only in blood plasma of patient with DM2 and IHD. A direct and significant correlation between MPO activity and MPO concentration was observed only in blood plasma samples from healthy donors. Increased MPO activity did not correlate with MPO concentration in blood plasma of patients with DM2 and DM2 with IHD. Taken together, these results highlight the necessity for studying of the MPO role in the development of pathological processes to determine both the amount of enzyme and its peroxidase activity in the blood. The proposed approach gives comprehensive information about the relationship between MPO activity and MPO concentration in patient blood. Since the high concentration of MPO is a diagnostically significant parameter in the prediction of endothelial dysfunction and cardiovascular disease development, the obtained results evidence the contribution of MPO-dependent reactions in cardiovascular complications associated with diabetes. MPO activity may serve as an additional diagnostic criterion for determination of risk of IHD in DM patients.

Key words: myeloperoxidase, diabetes mellitus, neutrophils, peroxidase activity, blood plasma, enzyme-linked immunosorbent assay.