

УДК 612.123;535.37
©Коллектив авторов

ИССЛЕДОВАНИЕ ПЕРЕКИСНОЙ МОДИФИКАЦИИ ЛИПОПРОТЕИНОВ НИЗКОЙ И ОЧЕНЬ НИЗКОЙ ПЛОТНОСТИ У БОЛЬНЫХ С КОРОНАРНОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА МЕТОДОМ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ

Р.К. Айдыралиев, О.А. Игембердиева, М.Х. Дадабаев, Т.М. Мураталиев,
К.А. Айтбаев, А.А. Алдашев*

Национальный центр кардиологии и терапии МЗ Кыргызской Республики
им. акад. М. Миррахимова; тел: +(996 312)-66-38-56;
эл. почта: rashidaidyaliev@mail.ru

В суммарной фракции липопротеинов низкой (ЛПНП) и очень низкой (ЛПОНП) плотности, выделенных из сыворотки крови осаждением в присутствии гепарина-Mn по методу Бурштейна и далее подвергнутых перекисному окислению путем инкубации при 37°C в присутствии 50 мкМ CuSO_4 , наблюдается снижение интенсивности собственной флуоресценции в ультрафиолетовой ($F_{\text{уф}}$) и увеличение - в видимой ($F_{\text{вид}}$) области спектра, а также снижение интенсивности флуоресценции зонда-аниона АНС ($F_{\text{АНС}}$) и увеличение интенсивности флуоресценции зонда-катиона ДСП-6 ($F_{\text{ДСП-6}}$). Для оценки степени перекисной модификации ЛПНП+ЛПОНП предлагается использовать относительные показатели: $F_{\text{вид}} / F_{\text{уф}}$ и $F_{\text{ДСП-6}} / F_{\text{АНС}}$. На 147 образцах ЛПНП+ЛПОНП, выделенных из сыворотки крови 49 здоровых доноров и подвергнутых дальнейшему окислению в течение 0, 3 и 24 ч, между флуоресцентными показателями и концентрацией ТБК-реактивных продуктов (ТБКРП) выявлена сильная положительная корреляция: для $F_{\text{вид}} / F_{\text{уф}}$ ($r=0,75$; $p<0,001$), для $F_{\text{ДСП-6}} / F_{\text{АНС}}$ ($r=0,73$; $p<0,001$). Очень высокой оказалась корреляция обоих флуоресцентных показателей $F_{\text{вид}} / F_{\text{уф}}$ и $F_{\text{ДСП-6}} / F_{\text{АНС}}$ между собой ($r=0,95$, $p<0,001$). Были исследованы изменения значений $F_{\text{вид}} / F_{\text{уф}}$, $F_{\text{ДСП-6}} / F_{\text{АНС}}$ и концентрации ТБКРП у 75 больных с ангиографически документированной коронарной болезнью сердца и 49 здоровых доноров. Достоверных различий по этим параметрам в ЛПНП+ЛПОНП больных КБС и доноров выявлено не было.

Ключевые слова: липопротеины низкой плотности, липопротеины очень низкой плотности, перекисное окисление липидов, собственная флуоресценция, флуоресцентные зонды, коронарная болезнь сердца.

ВВЕДЕНИЕ. Высокий уровень атерогенных липопротеинов низкой и очень низкой плотности (ЛПНП и ЛПОНП) является фактором риска развития атеросклероза и связанной с ним коронарной болезни сердца (КБС) [1-4]. Перекисное окисление липидов (ПОЛ) вызывает модификацию ЛПНП, в результате чего они становятся высокоатерогенными [5, 6].

С помощью моноклональных антител было показано, что более 90% лиц с высокими значениями циркулирующих окисленных ЛПНП (ок-ЛПНП) страдали коронарной болезнью сердца [7]. Данные, полученные двумя другими группами исследователей, также указывают на активную роль ок-ЛПНП в развитии атеросклероза [8, 9]: уровень плазменных ок-ЛПНП у пациентов с КБС был почти

* - адресат для переписки

в два раза выше, чем у лиц контрольной группы. Вместе с тем результаты исследования окислительного статуса атерогенных липопротеинов у больных атеросклерозом являются противоречивыми. По одним данным, степень ПОЛ и окисляемость в ЛПНП (или во фракции ЛПНП+ЛПОНП) у больных атеросклерозом повышается [10-14], по другим – не изменяется [15]. При обследовании более 600 больных с ангиографически подтвержденным диагнозом КБС выявлено повышение в сыворотке крови содержания ТБК-реактивных продуктов [16].

Для исследования степени перекисной модификации можно использовать метод флуоресцентной спектроскопии. Ранее было показано, что снижение интенсивности собственной флуоресценции ЛПНП в ультрафиолетовой области спектра и увеличение – в видимой области спектра при автоокислении [17] и при окислении ЛПНП гипохлоритом Na [18, 19], а также снижение интенсивности флуоресценции зонда-аниона АНС и увеличение интенсивности флуоресценции зондов-катионов ДСП-6 и ДСП-12 [20] при автоокислении ЛПНП зависели от степени ПОЛ в липопротеинах. Для практического применения, однако, метод ультрацентрифугирования, используемый при выделении ЛПНП, является слишком сложным и дорогостоящим. Известен более простой способ выделения из крови суммарной фракции атерогенных липопротеинов (ЛПНП+ЛПОНП) в присутствии гепарина-Mn [21].

В настоящей работе были поставлены следующие задачи: 1) исследовать зависимость изменений собственной флуоресценции в ультрафиолетовой и видимой областях спектра, а также интенсивности флуоресценции зонда-аниона АНС и зонда-катиона ДСП-6 в ЛПНП+ЛПОНП, выделенных из сыворотки крови осаждением в присутствии гепарина-Mn и подвергнутых в дальнейшем медь-индуцируемому перекисному окислению, в зависимости от степени ПОЛ. 2) Провести сравнительное исследование изменений флуоресцентных показателей и уровня ТБК-реактивных продуктов, а также резистентности к окислению у больных с ангиографически документированной КБС и у практически здоровых доноров.

МЕТОДИКА. В работе были обследованы 75 пациентов с ангиографически подтвержденным диагнозом КБС и 49 практически здоровых доноров. Коронарографическое обследование больных проводили на ангиографической установке "Angioscop D-33" фирмы "Siemens" (Германия) в отделении ангиографии НЦКТ.

Суммарную фракцию ЛПНП+ЛПОНП выделяли из сыворотки крови по методу Бурштейна [21]. С этой целью к 1 мл сыворотки добавляли 0,1 мл смеси 1 М $MnCl_2$ + гепарин + дист. вода (5:4:1), перемешивали и инкубировали на ледяной бане (при 0°C) в течение 30 мин. После этого образцы центрифугировали 30 мин при 1500 g и 4°C. Надосадочную жидкость сливали. Осадок осторожно промывали трижды 50 мМ раствором фосфатного буфера (pH 7,4), содержащего 140 мМ NaCl. Тщательно отмытый таким образом от белков сыворотки осадок ЛПНП+ЛПОНП растворяли в 1 мл 50 мМ раствора фосфатного буфера (pH 7,4), содержащего 1 М NaCl. Перекисную модификацию вызывали с помощью медь-индуцируемого окисления путём инкубации полученного раствора ЛПНП+ЛПОНП при 37°C в присутствии 50 мкМ $CuSO_4$ [22]. В инкубационную среду добавляли смесь антибиотиков пенициллин + стрептомицин фирмы "Sigma" (США) до конечной концентрации 100 ед. пенициллина/мл и 0,1 мг стрептомицина/мл. Степень перекисного окисления оценивали по концентрации ТБК-реактивных продуктов (ТБКРП) [23]. Для этого к 0,25 мл р-ра ЛПНП+ЛПОНП добавляли 3 мл 1% р-ра фосфорной кислоты и 1 мл 0,5% р-ра тиобарбитуровой кислоты (ТБК). Полученную смесь ставили на кипящую водяную баню на 45 мин, охлаждали и добавляли 4 мл бутанола. После этого смесь центрифугировали, отбирали бутанольную фазу (супернатант), в которой измеряли оптическую плотность при длинах волн 515, 532 и 550 нм.

Рассчитывали ΔD_{532} , пропорциональную концентрации ТБКРП, по формуле: $\Delta D_{532} = D_{532} - (D_{515} + D_{550})/2$. Рассчитывали уровень ТБКРП в единицах концентрации малонового диальдегида (МДА) на единицу веса белка (мкмоль МДА/г белка), используя молярный коэффициент экстинкции комплекса МДА-ТБК $1,56 \times 10^5 \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ [19]. Концентрацию белка в растворе ЛПНП+ЛПОНП определяли по методу Лоури [24]. Измерения оптической плотности проводили на спектрофотометре "DU-530" фирмы "Beckman" (США).

Для измерения интенсивности флуоресценции (F) отбирали 0,1 мл полученного р-ра ЛПНП+ЛПОНП и растворяли в 5 мл буферного раствора следующего состава: 0,28 М сахарозы, 10 мМ трис, 2 мМ ЭДТА, pH 7,4. В работе использовали флуоресцентные зонды 1-анилинафталин-8-сульфонат (АНС) фирмы "Serva" и 4-(*n*-диметиламиностирил)-1-гексилпиридиний *n*-толуолсульфонат (ДСП-6), синтезированный в Институте оргсинтеза АН Латвии (г. Рига). Флуориметрические измерения проводили на спектрофлуориметре "F-3000" фирмы "Hitachi" (Япония) в стандартной 1 см прямоугольной кварцевой кювете при щелях возбуждения и флуоресценции 5 нм. Интенсивность флуоресценции АНС ($F_{\text{АНС}}$) измеряли при длине волны 470 нм (возбуждение 370 нм). Интенсивность флуоресценции ДСП-6 ($F_{\text{ДСП-6}}$) - при длине волны 550 нм (возбуждение 480 нм). Интенсивность собственной флуоресценции в ультрафиолетовой области спектра ($F_{\text{уф}}$) - при длине волны 340 нм (возбуждение 286 нм), в видимой области спектра ($F_{\text{вид}}$) - при длине волны 430 нм (возбуждение 360 нм). Концентрация АНС в растворе составляла 20 мкМ, ДСП-6 - 5 мкМ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. При медь-индуцируемом перекисном окислении липидов в суммарной фракции ЛПНП+ЛПОНП, выделенной осаждением в присутствии гепарина-Mn, наблюдается довольно характерная динамика изменения интенсивности собственной и зондовой флуоресценции в зависимости от длительности инкубации при 37°C в присутствии 50 мкМ CuSO_4 . Типичные результаты исследования представлены в таблице 1. Увеличение длительности инкубации, приводящее к увеличению степени перекисного окисления липидов (росту содержания ТБКРП), сопровождается ростом $F_{\text{вид}}$, $F_{\text{ДСП-6}}$ и снижением $F_{\text{уф}}$ и $F_{\text{АНС}}$, что соответствует данным, полученным ранее на изолированных ЛПНП [17-20].

Таблица 1. Изменения собственной и зондовой флуоресценции и степени перекисного окисления в ЛПНП+ЛПОНП) в зависимости от длительности инкубации при 37°C в присутствии 50 мкМ CuSO_4 .

t, ч	$F_{\text{уф}}$	$F_{\text{АНС}}$	$F_{\text{ДСП-6}}$	ТБКРП, мкмоль МДА/ г белка
0	100	100	100	0,7
1	80	104	117	3,2
2	78	104	118	4,9
3	75	110	115	7,1
4	75	107	127	7,6
20	45	273	304	35,3
24	42	297	320	37,8

Для оценки степени модификации липопротеинов мы предлагаем относительные флуоресцентные показатели $F_{\text{вид}} / F_{\text{уф}}$ и $F_{\text{ДСП-6}} / F_{\text{АНС}}$. Они не требуют стандартизации измерений флуоресценции. Определяя связь показателей $F_{\text{вид}} / F_{\text{уф}}$ и $F_{\text{ДСП-6}} / F_{\text{АНС}}$ со степенью ПОЛ, мы использовали ЛПНП+ЛПОНП, выделенные из крови здоровых доноров (n=49) и далее инкубируемые при 37°C

ПЕРЕКИСНАЯ МОДИФИКАЦИЯ ЛПНП И ЛПОНП ПРИ КБС

в присутствии 50 мкМ CuSO_4 в течение 0, 3 и 24 ч. Всего таким образом было исследовано 147 образцов ЛПНП+ЛПОНП с разной степенью окисления (табл. 2). Между относительными флуоресцентными показателями и концентрацией ТБК-реактивных продуктов получена сильная положительная корреляция: для $F_{\text{вид}} / F_{\text{уф}}$ ($r=0,75$, $p<0,001$), для $F_{\text{дсп-6}} / F_{\text{анс}}$ ($r=0,73$, $p<0,001$). Очень высокой оказалась корреляция между обоими флуоресцентными показателями $F_{\text{вид}} / F_{\text{уф}}$ и $F_{\text{дсп-6}} / F_{\text{анс}}$ ($r=0,95$, $p<0,001$). Статистический анализ показал, что в этих же образцах ЛПНП+ЛПОНП от 49 здоровых доноров средние значения как концентрации ТБКРП, так и показателей $F_{\text{вид}} / F_{\text{уф}}$ и $F_{\text{дсп-6}} / F_{\text{анс}}$, измеренные до, через 3 ч и 24 ч после начала окисления достоверно (по Т-критерию) различались между собой (табл. 3). Для всех трёх показателей во всех парах сравнения $p<0,001$.

Таблица 2. Коэффициенты корреляции показателей $F_{\text{вид}} / F_{\text{уф}}$, $F_{\text{дсп-6}} / F_{\text{анс}}$, уровня ТБКРП во фракциях ЛПНП+ЛПОНП, полученных от здоровых доноров ($n=49$) и подвергнутых различной степени окисления путем инкубации в течение 0, 3 и 24 ч при 37°C в присутствии 50 мкМ CuSO_4 (всего $n=147$). В скобках - достоверность отличия коэффициента корреляции от 0.

Показатель	ТБКРП	$F_{\text{дсп-6}} / F_{\text{анс}}$
$F_{\text{вид}} / F_{\text{уф}}$	0,75 ($p<0,001$)	0,95 ($p<0,001$)
$F_{\text{дсп-6}} / F_{\text{анс}}$	0,73 ($p<0,001$)	

Таблица 3. Значения $F_{\text{вид}} / F_{\text{уф}}$, $F_{\text{дсп-6}} / F_{\text{анс}}$ и уровень ТБКРП в ЛПНП+ЛПОНП у здоровых доноров ($n=49$; числитель) и больных коронарной болезнью сердца ($n=75$; знаменатель, курсив) до, через 3 ч и 24 ч после инкубации при 37°C в присутствии 50 мкМ CuSO_4 . р - курсив - по сравнению показателей у доноров и больных КБС

t, ч	$F_{\text{вид}} / F_{\text{уф}}$	$F_{\text{дсп-6}} / F_{\text{анс}}$	ТБКРП, мкмоль МДА/г белка
0	0,0454 ± 0,00274 0,0412 ± 0,00313 ($p=0,31$)	0,458±0,02 0,508±0,034 ($p=0,21$)	0,71 ± 0,04 0,78 ± 0,04 ($p=0,24$)
3	0,061 ± 0,0034 0,055 ± 0,0037 ($p=0,23$)	0,616±0,030 0,616±0,046	6,89 ± 0,09 6,73 ± 0,10 ($p=0,24$)
24	0,2194 ± 0,016 0,1988 ± 0,014 ($p=0,34$)	4,41±0,435 4,22±0,41 ($p=0,76$)	38,22 ± 1,11 36,55 ± 1,13 ($p=0,29$)

Примечание. $p<0,001$ для всех показателей при сравнении ЛПНП+ЛПОНП доноров до и через 3 ч инкубации, до и через 24 ч инкубации, через 3ч и 24 ч инкубации.

Параллельно с измерениями у здоровых доноров мы проводили те же самые измерения и у больных с ангиографически подтвержденным диагнозом КБС ($n=75$). Различий по флуоресцентным показателям и концентрации ТБКРП в исходных образцах ЛПНП+ЛПОНП больных КБС и доноров выявлено не было.

Не было выявлено различий по этим показателям и при сравнении групп после 3 ч и 24 ч окисления (см. табл. 3). Т.е. по нашим данным ЛПНП+ЛПОНП здоровых доноров и больных КБС достоверно не различаются между собой ни по степени ПОЛ, ни по резистентности к окислению.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Таким образом, в суммарной фракции ЛПНП+ЛПОНП, выделенной из сыворотки крови по методу Бурштейна осаждением в присутствии гепарина-Mn и подвергнутой медь-индуцируемому перекисному окислению путём инкубации при 37°C в присутствии 50 мкМ CuSO₄, наблюдается снижение интенсивности собственной флуоресценции в ультрафиолетовой и увеличение – в видимой области спектра, снижение интенсивности флуоресценции добавленного зонда-аниона АНС и увеличение – зонда-катиона ДСП-6. Это соответствует картине изменений этих же флуоресцентных показателей в изолированной фракции ЛПНП [17-20]. Для оценки степени перекисной модификации липопротеинов можно использовать относительные флуоресцентные показатели $F_{\text{вид}} / F_{\text{уф}}$ и $F_{\text{ДСП-6}} / F_{\text{АНС}}$, имеющие в ЛПНП+ЛПОНП (n=147) высокую корреляцию с уровнем ТБК-реактивных продуктов: (r=0,75, p<0,001) и (r=0,73, p<0,001), соответственно. Между ЛПНП+ЛПОНП больных с ангиографически документированной коронарной болезнью сердца (n=75) и здоровых доноров (n=49) не выявлено достоверных различий ни по величинам $F_{\text{вид}} / F_{\text{уф}}$ и $F_{\text{ДСП-6}} / F_{\text{АНС}}$, ни по уровню ТБКРП, ни по резистентности липопротеинов по этим показателям к окислению.

ЛИТЕРАТУРА

1. Чазов Е.И., Климов А.Н. (ред.) (1980) Дислиппротеидемии и ишемическая болезнь сердца, М.
2. Климов А.Н., Никульчева Н.Г. (1984) Липопротеиды, дислиппротеидемии и атеросклероз, Медицина, Л.
3. Лопухин Ю.М., Арчаков А.И., Владимиров Ю.А., Коган Э.М. (1983) Холестериноз (холестерин мембран. Теоретические и клинические аспекты), М.
4. Оганов Р.Г. (1990) Первичная профилактика ишемической болезни сердца, М.
5. Тертов В.В. (1999) Ангиол. и сосуд. хир., **5**(прилож), 218-240.
6. Tribble D.L. (1995) Curr. Opin. Lipidol., **6**, 196-208.
7. Holvoet P., Mertens A., Verhamme P., Bogaerts R., Bevens G., Collen D., Muls E., Van de Werf F. (2001) Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., **21**, 844-848.
8. Kohno H., Sieshigo N., Oguri K., Izumidate H., Masunari T., Kawamura M., Itabe H., Takano T., Hasegawa A., Nagai R. (2000) Clin. Biochem. **33**, 243-253.
9. Toshima S., Hasegawa A., Kurabayashi M., Itabe H., Takano T., Sugano J., Shimamura K., Kimura J., Michishita J., Suzuki T., Nagai R. (2000) Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. **20**, 2243-2247.
10. Рагино Ю.И., Душкин М.И. (1998) Клин. лаб. диагн., №11, 3–5.
11. Chiu H.C., Jeng J.R., Shieh S.M. (1994) Biochim. Biophys. Acta, **1225**, 200–208.
12. Andrews B., Burnand K., Paganga G., Browse N., Rice-Evans C., Sommerville K., Leake D., Taub N. (1995) Atherosclerosis, **112**, 77–84.
13. Bonithon-Kopp C., Coudray C., Berr C., Touboul P.J., Fuve J.M., Favier A., Ducimetière P. (1997) Am. J. Clin. Nutr., **65**, 121–127.
14. Salonen J.T., Nyssönen K., Salonen R., Porkkala-Sarataho E., Tuomainen T.P., Diczfalussy U., Björkhem I. (1997) Circulation, **95**, 840–845.
15. Karmansky I., Shnaider H., Palant A., Gruener N. (1996) Clin. Biochem., **29**, 573–579.
16. Walter M.F., Jacob R.F., Jeffers B., Ghadanfar M.M., Preston G.M., Buch J., Mason R.P. (2004) J. Am. Coll. Cardiol., **44**, 1996–2002.
17. Айдыралиев Р.К., Азизова О.А., Вахрушева Т.В., Лопухин Ю.М., Миррахимов М.М. (2006) Бюлл. эксп. биол. мед., **142**, 414-417.

ПЕРЕКИСНАЯ МОДИФИКАЦИЯ ЛПНП И ЛПОНП ПРИ КБС

18. Сергиенко В.И., Мурина М.А., Панасенко О.М., Трунилина Н.Н., Евгина С.А., Айдыралиев Р.К., Рошупкин Д.И. (1995) Вестник РАМН, №3, 48-53.
19. Panasenko O.M., Evgina S.A., Aidyraliev R.K., Sergienko V.I., Vladimirov Y.A. (1994) Free Radic. Biol. Med., **16**, 143-148.
20. Айдыралиев Р.К., Азизова О.А., Муррахимов М.М., Лопухин Ю.М. (2001) Бюлл. эксп. биол. мед., **132**(№8), 164-167.
21. Manual of laboratory operations. Lipid research clinics program. Volume 1. Lipid and lipoprotein analysis. DHEW Publication No. NIH 75 628.
22. Рагино Ю.И., Душкин М.И. (1998) Клин. лаб. диагн., №3, 6-8.
23. Uchiyama M., Michara M. (1978) Analyt. Biochem., **86**, 271-278.
24. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. (1951) J. Biol. Chem., **193**, 265-275.

Поступила: 25. 08. 2009.

INVESTIGATION OF PEROXIDE MODIFICATION OF LOW- AND VERY LOW-DENSITY LIPOPROTEINS IN PATIENTS WITH CORONARY HEART DISEASE BY THE METHOD OF FLUORESCENT SPECTROSCOPY

R.K. Aidyraliev, O.A. Igemberdieva, M.Kh. Dadabaev, T.M. Murataliev, K.A. Aitbaev, A.A. Aldashev

National Center of Cardiology and Internal Medicine, Kirghiz Ministry of Health, Bishkek, Kyrgyzstan;
tel.: +(996 312)-66-38-56; e-mail: rashidaidyraliev@mail.ru

In the total fraction of low and very low density lipoproteins (LDL+VLDL) isolated from serum by precipitation in the presence of heparin-Mn the copper-induced lipid peroxidation was accompanied by accumulation of LPO products, a decrease ANS fluorescence intensity (F_{ANS}) and an increase in probe - cation DSP-6, a fluorescence intensity decrease of intrinsic in the ultraviolet area (F_{uv}) and an increase in the visible area (F_{vis}). The degree of lipoprotein modification was estimated by calculating the F_{vis} / F_{uv} and F_{DSP-6} / F_{ANS} ratio. Strong positive correlation was found between these ratios and concentration of thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) of LDL+VLDL samples isolated from sera of 49 donors and incubated at 37°C in the presence of 50 M $CuSO_4$ during 0, 3 and 24 hr (F_{vis} / F_{uv} ($r=0,75$; $p<0,001$) and F_{DSP-6} / F_{ANS} ($r=0,73$; $p<0,001$)). Very strong positive correlation was also found between both fluorescent parameters F_{vis} / F_{uv} and F_{DSP-6} / F_{ANS} ($r=0,95$, $p<0,001$). Changes in the values of F_{vis} / F_{uv} , F_{DSP-6} / F_{ANS} , concentration of TBARS in 75 patients with documented coronary heart disease (CHD) and 49 apparently healthy donors were studied. No significant differences of these parameters in LDL+VLDL of patients with CHD and donors were found.

Key words: low-density lipoproteins, very low-density lipoproteins, lipid peroxidation, intrinsic fluorescence, fluorescent probes, coronary heart disease.