Биомедицинская химия, 2011 том 57, вып. 3, с. 335-342.

КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 577.121.9; 615.03
©Коллектив авторов

АНТИОКИСЛИТЕЛЬНЫЕ ФЕРМЕНТЫ В ЭРИТРОЦИТАХ ПАЦИЕНТОВ С ГИПЕРТОНИЕЙ, ПОЛУЧАЮЩИХ МОНОТЕРАПИЮ ЛИЗИНОПРИЛОМ ИЛИ КОМБИНИРОВАННУЮ ТЕРАПИЮ ЛИЗИНОПРИЛОМ И СИМВАСТАТИНОМ

Е.А. Косенко[1], А.В. Сусликов[2], Н.И. Венедиктова[1], Ю.Г. Каминский[1]*

[1]Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
ул. Институтская, 3142290 Пущино; тел.: +8 (496) 773-52-46;
факс: +8 (496) 733-05-53; эл. почта: kaminsky@iteb.ru
[2]Больница Пущинского научного центра РАН, 142290, Пущино

Статины и ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента (АПФ) благоприятно воздействуют на сывороточный холестерин и кровяное давление. Предполагается, что это действие статинов и ингибиторов АПФ может быть связано с изменением состояния антиокислительной защиты в эритроцитах. Целью данной работы было выяснить влияние терапии лизиноприлом и комбинацией лизиноприла с симвастатином у пациентов с гипертонией на активность антиокислительных ферментов в эритроцитах. Исследование включало 32 пациента с артериальной гипертонией при начальной общей концентрации холестерина, холестерина липопротеинов низкой плотности (ЛНП) и триглицеридов в плазме крови меньше верхнего предела нормы. Одна группа пациентов получала монотерапию лизиноприлом в дозе 10 мг/день, другая группа – комбинированную терапию лизиноприлом (10 мг/день) и симвастатином в дозе 20 мг/день. Перед и после 3- и 6-месячного курсов терапии в амбулаторных условиях в очищенных эритроцитах тех же пациентов определяли активность супероксиддисмутазы (СОД), каталазы, глутатионпероксидазы (ГЛП) и глутатионредуктазы (ГЛР). После терапии в эритроцитах всех пациентов наблюдали значительное повышение, при сравнении с самоконтролем, активности каталазы (на 79,3–106,5%, $p<0,0001$) и значительное снижение активности ГЛП (на 20,7–30,6%, $p<0,001$). Те же результаты были получены в обеих группах пациентов (с монотерапией и комбинированной терапией) и в оба срока терапии (3 и 6 месяцев). Активность СОД в эритроцитах повышалась только через 6 месяцев ($p=0,0345$) и только в группе лиц, принимавших лизиноприл. Активность ГЛР не изменялась во всех указанных условиях. Таким образом, монотерапия лизиноприлом и комбинированная терапия лизиноприлом и симвастатином оказывают специфическое, явно выраженное и одинаковое влияние на антиокислительные ферменты в эритроцитах человека. Пероральный прием лизиноприла и комбинации лизиноприла с симвастатином могут защищать эритроциты и другие ткани от окислительного повреждения.

Ключевые слова: лизиноприл, симвастатин, эритроциты, ферменты-антиоксиданты, каталаза, глутатионпероксидаза.

ВВЕДЕНИЕ. При многих видах патологии, в том числе при гипертонии и атеросклерозе, одним из механизмов повреждения клеток является окислительный стресс [1–3]. Он наступает вследствие нарушения баланса между образованием и удалением активированных кислородных интермедиатов – таких, как пероксид

* - адресат для переписки

водорода (H_2O_2), супероксидный анион (O_2^-) и другие радикалы. Результатом окислительного повреждения мембранных белков и липидов является снижение текучести клеточной мембраны эритроцита [4]. Выявлено антиокислительное действие ингибиторов 3-гидрокси-3-метилглутарил-CoA-редуктазы (КФ 1.1.1.88) (статинов), не зависящее от их гипохолестеринемического влияния [5]. У пациентов с гипертонией, принимающих ингибитор ангиотензин-превращающего фермента (АПФ, КФ 3.4.15.1), кровяное давление понижается, а их комбинации со статинами понижают давление в ещё большей степени [6], что свидетельствует о синергичном действии двух типов лекарственных препаратов. Предполагается, что статины и ингибиторы АПФ могут оказывать благоприятное влияние на сывороточные липиды и кровяное давление путём изменения антиокислительного состояния эритроцитов [7].

Биохимические механизмы, лежащие в основе благоприятного действия статинов и ингибиторов АПФ у пациентов с гипертонией и гиперхолестеринемией, не изучены. В частности, неизвестно, изменяется ли антиокислительный статус эритроцитов после хронической терапии лизиноприлом и симвастатином. Эритроциты контактируют со всеми другими клетками организма через плазму крови, их мембраны высокочувствительны к окислительному стрессу *in vivo*, а в клинических условиях эти клетки наиболее доступны. Они легко выделяются, долго сохраняют функциональную активность и представляют собой удобный объект для исследований.

Целью исследования было выяснить влияние ингибитора АПФ лизиноприла и ингибитора 3-гидрокси-3-метилглутарил-CoA-редуктазы симвастатина, длительно принимаемых пациентами с умеренной гипертонией, на активность супероксиддисмутазы (СОД, КФ 1.15.1.1), каталазы (КФ 1.11.1.6), глутатионпероксидазы (ГЛП, КФ 1.11.1.9) и глутатионредуктазы (ГЛР, КФ 1.8.1.7) в эритроцитах.

МЕТОДИКА. Исследование выполнено совместно в больнице Пущинского научного центра РАН и в Лаборатории метаболического моделирования и биоинформатики Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН.

В исследовании принимали участие мужчины и женщины 44–72 лет (средний возраст 58 лет), изъявившие свое согласие в письменной форме. Критериями включения пациентов в исследование служили артериальная гипертония I–II степени тяжести (систолическое давление крови 149–167 мм Hg, диастолическое давление 87–100 мм Hg), диагноз атеросклероза периферических артерий, отсутствие ишемической болезни сердца, переносимость лизиноприла и симвастатина, концентрация общего холестерина в сыворотке крови, холестерина ЛНП, триглицеридов и креатинина не более верхней границы нормы.

В работе использовали лизиноприл и симвастатин производства “Gedeon Richter” (Венгрия); цитрат натрия, NADPH, EDTA, ксантин, глутатион (GSH), окисленный глутатион (GSSG), трет-бутилгидропероксид, *p*-нитротетразолиевый синий, триэтаноламин, сапонин, ксантиноксидазу, глутатионредуктазу “Sigma” (США); Трис и глюкозу “Serva” (Германия).

Пациентам одной группы (16 человек: 10 мужчин, 6 женщин) назначали терапию лизиноприлом в дозе 10–20 мг в сутки (группа “лизиноприл”), пациентам второй группы (16 человек: 9 мужчин, 7 женщин) – те же дозы лизиноприла вместе с фиксированной дозой симвастатина 20 мг в сутки (группа “лизиноприл + симвастатин”).

Лабораторный анализ крови выполняли в клинической лаборатории перед и после 3- и 6-месячного курсов терапии в амбулаторных условиях. У всех пациентов в 8–9 час отбирали кровь натощак в день, предшествующий началу исследования (контроль), затем после 3 месяцев и 6 месяцев ежедневного приема препаратов.

Все процедуры выделения эритроцитов и их биохимический анализ выполняли при температуре +4°C в академическом институте.

Каждый препарат эритроцитов готовили методом, описанным ранее [8]. 0,25 мл крови смешивали с 25 мкл 130 мМ цитрата натрия и центрифугировали 10 мин при 1000 g. Осадок, содержащий клетки, промывали дважды в охлаждённой среде, содержащей 10 мМ KH_2PO_4, pH 7,5, 3,5 мМ KCl, 1,5 мМ $MgCl_2$, 145 мМ NaCl и 6 мМ глюкозу, центрифугировали 10 мин при 1000 g и суспендировали в этой же среде в соотношении 1 : 5. Суспензию эритроцитов хранили при 4°C не более 24 ч.

Для получения лизата к 0,5 мл раствора, содержащего 50 мМ триэтаноламин, pH 7,4, и 0,2% сапонина, добавляли 0,25 мл суспензии эритроцитов и инкубировали 10 мин при 25°C. В лизатах определяли активность СОД, каталазы, ГЛП и ГЛР.

Активность СОД определяли спектрофотометрически [9] при 550 нм в ксантин-ксантиноксидазной системе с нитротетразолиевым синим (НТС) в качестве акцептора. Реакционная смесь содержала 50 мМ карбонатный буфер, pH 10,2, 100 мкМ ЭДТА, 45 мкМ НТС, 350 мкМ ксантин и 0,007 ед/мл ксантиноксидазы в общем объеме 2,8 мл. Реакцию запускали добавлением 10 мкл лизата эритроцитов. Одна единица активности СОД соответствовала количеству фермента, вызывающему 50%-ое торможение восстановления НТС.

Активность каталазы определяли спектрофотометрически [10] с 30 мМ H_2O_2 в качестве субстрата. Реакцию запускали добавлением лизата эритроцитов. Убыль светопоглощения регистрировали при 240 нм и 22°C.

Активность ГЛР определяли спектрофотометрически при 340 нм по снижению светопоглощения при окислении NADPH окисленным глутатионом [11]. Реакционная смесь общим объемом 2,6 мл содержала 100 мМ фосфатный буфер, 1 мМ GSSG и 0,23 мМ NADPH. Реакцию запускали добавлением 25–50 мкл лизата эритроцитов.

Активность ГЛП определяли спектрофотометрически по окислению NADPH в сопряжённой глутатионредуктазной реакции [12] с *трет*-бутилгидропероксидом в качестве субстрата и 5 мМ GSH, т.к. предварительно было найдено, что значение $K_м$ для GSH составляет 2,5 мМ [13]. 25–50 мкл лизата эритроцитов добавляли в реакционную смесь общим объёмом 2,6 мл, содержащую 100 мМ фосфатный буфер, 1 мМ GSSG, 0,23 мМ NADPH и 10 ед ГЛР. Реакцию запускали добавлением 288 мкМ H_2O_2 и регистрировали светопоглощение при 340 нм.

Статистический анализ выполняли с помощью компьютерной программы Prizm 4.0. Результаты выражали как среднее значение ± стандартное отклонение. Различия между группами анализировали методом ANOVA с последующим t-тестом Стьюдента для определения статистической значимости.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. После 3-месячного курса монотерапии лизиноприлом активность каталазы в эритроцитах пациентов повышалась приблизительно в 2 раза ($p<0,0001$) (рис. 1), активность ГЛП снижалась на 30,6% ($p<0,001$) (рис. 2), а активность СОД (рис. 3) и ГЛР (не показано) не менялась. После 6-месячного курса монотерапии активность каталазы и ГЛП в эритроцитах изменялась так же (в 2 раза и на 28,2%), как и после 3-месячного курса (рис. 1 и 2), но дополнительно повышалась активность СОД (на 9,4%) ($p=0,0345$) (рис. 3).

При комбинированной терапии лизиноприлом и симвастатином происходили такие же (качественно и количественно) изменения активности всех антиокислительных ферментов, как и при монотерапии лизиноприлом (рис. 1–3). Исключения составляли увеличение активности СОД после 6-месячного приёма лизиноприла и его устранение дополнительным приёмом симвастатина испытуемыми. Однако отличия всех измеряемых показателей в группе “лизиноприл” и группе “лизиноприл + симвастатин” недостоверны на обоих сроках наблюдений. Это означает, что симвастатин не изменяет действие лизиноприла.

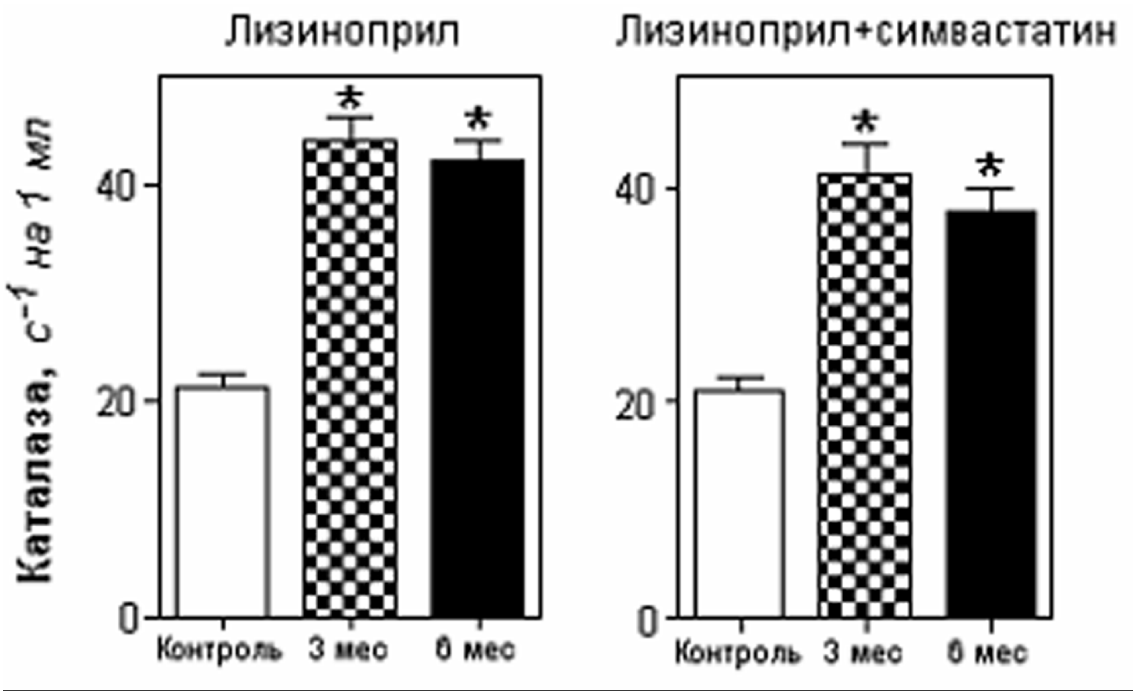

Рисунок 1.
Активность каталазы в эритроцитах пациентов, получающих монотерапию лизиноприлом или комбинированную терапию лизиноприлом и симвастатином в течение 3 или 6 месяцев.
* - достоверное отличие от контроля, p<0,0001.

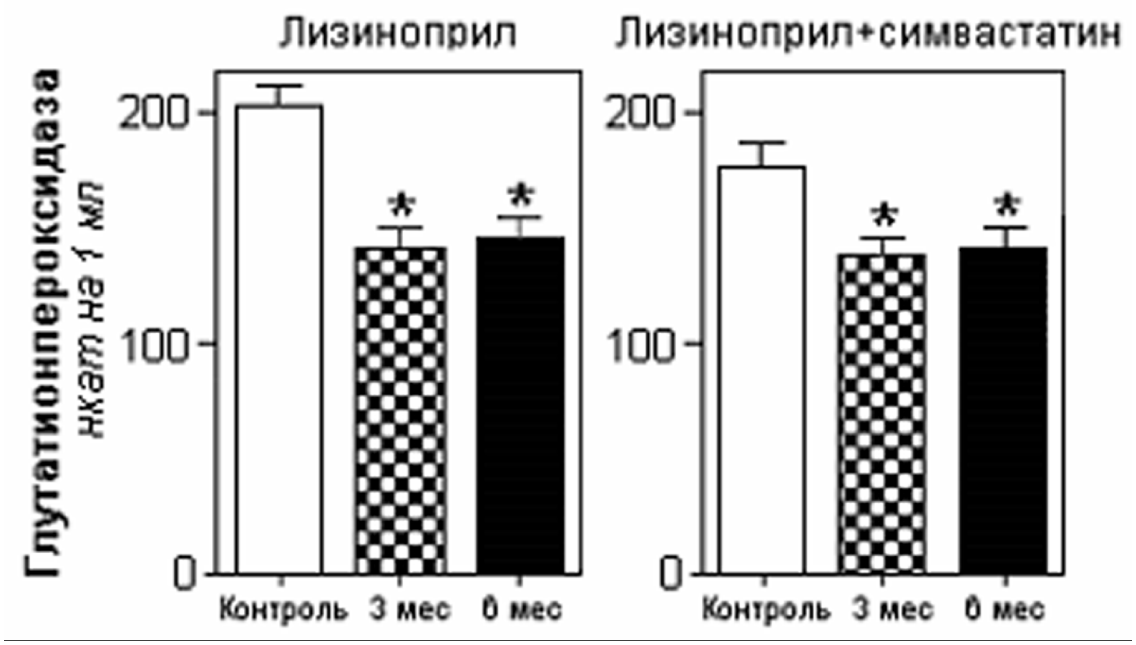

Рисунок 2.
Активность глутатионпероксидазы в эритроцитах пациентов, получающих монотерапию лизиноприлом или комбинированную терапию лизиноприлом и симвастатином в течение 3 или 6 месяцев. * - достоверное отличие от контроля, p<0,001.

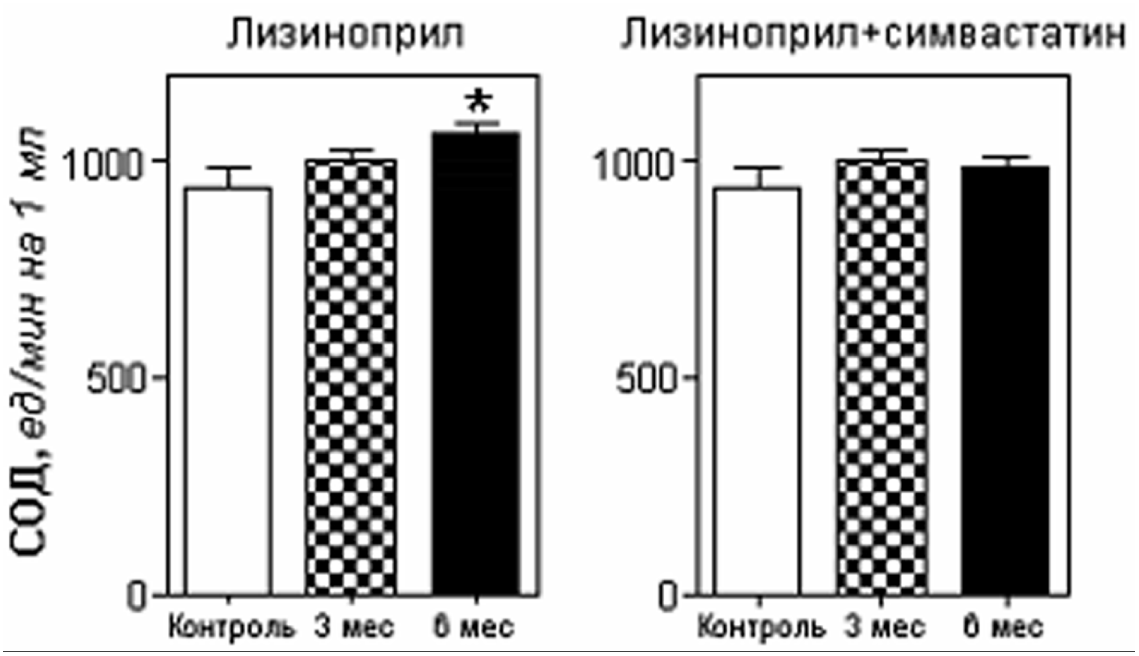

Рисунок 3.
Активность супероксиддисмутазы (СОД) в эритроцитах пациентов, получающих монотерапию лизиноприлом в течение 3 или 6 месяцев. * -достоверное отличие от контроля, p=0,0345.

Указанные изменения активности каталазы наблюдались у 100% пациентов, активности ГЛП – у 96,6% (у 28 из 29) и активности СОД – у 57,1% (8 из 14) пациентов.

Ни лизиноприл, ни комбинация лизиноприл + симвастатин не оказывали влияния на активность ГЛР через 3 и 6 месяцев наблюдений.

В литературе (в базе данных PubMed) есть лишь 4 работы, посвященные антиокислительным ферментам в эритроцитах больных при терапии ингибиторами АПФ. Так, активность СОД, ГЛП и каталазы в эритроцитах пациентов с системной гипертонией не изменялась после 6- и 12-месячной терапии каптоприлом или энаприлом [15, 16]. За 6 месяцев приема энаприла активность ГЛП в эритроцитах пациентов, находящихся в стационаре на хроническом диализе, повышалась на 35% [17]. У больных с метаболическим синдромом активность СОД в эритроцитах повышалась на 35% после 4 недель терапии хинаприлом [18].

Всего три исследования влияния ингибиторов АПФ на активность антиокислительных ферментов в эритроцитах выполнены на лабораторных животных. Каптоприл не изменял активность СОД и ГЛП у крыс [19]. Активность ГЛР в эритроцитах повышалась после 11-недельного скармливания каптоприла или эналаприла мышам [7]. Употребление эналаприла с питьевой водой приводило к повышению активности СОД в эритроцитах мышей на 19% через 11 недель при неизменной активности каталазы [20].

Очень немного работ посвящено антиокислительным ферментам в эритроцитах человека при терапии статинами. У пациентов с коронарной болезнью сердца, ежедневно принимающих аторвастатин или флувастатин в течение 6 недель, наблюдалось повышение активности СОД, ГЛП и каталазы в эритроцитах [21]. Повышение активности СОД происходило также у больных

с неишемическими формами кардиомиопатии после 12-недельного курса терапии аторвастатином [22]. Флувастатин вызывал повышение активности СОД, ГЛП и каталазы в эритроцитах пациентов со стенокардией и смешанной формой гиперлипидемии [23]. В эритроцитах пациентов с нарушенным липидным обменом активность СОД, ГЛП и каталазы повышалась после 4 недель ежедневного приема аторвастатина или симвастатина и восстанавливалась к норме через 12 недель, тогда как правастатин повышал только активность каталазы и только после 12 недель терапии и не изменял активность СОД и ГЛП [5]. Таким образом, в вышеуказанных исследованиях описано четкое повышение активности СОД, ГЛП и каталазы в эритроцитах пациентов с разными болезнями при терапии статинами. Passi и соавт. [24] нашли, что активность СОД, ГЛП и каталазы в эритроцитах пациентов с гиперхолестеринемией не меняется после 3-месячной терапии аторвастатином, правастатином или симвастатином в дозах, отчетливо снижающих уровни общего холестерина и холестерина ЛНП в крови. В целом такие результаты соответствуют нашим данным (рис. 1–3), хотя и не идентичны им. В наших наблюдениях изменения активности СОД, ГЛП и каталазы после 3 и 6 мес комбинированной терапии сходны с изменениями этих ферментов после монотерапии, косвенно подтверждая отсутствие действия симвастатина.

Из этого полного перечня опубликованных работ видно, что данные литературы не однозначны и изменяются в зависимости как от типа ингибитора АПФ или статина, так и от характера заболевания, и что полностью отсутствуют работы, посвященные влиянию лизиноприла или комбинации лизиноприл + симвастатин на антиокислительные ферменты в эритроцитах человека и животных. Не проводились также исследования действия такой или подобной терапии у одних и тех же лиц, служащих самоконтролем для последующих анализов; обычно группы испытуемых сравнивались с другой группой лиц, не принимающих медикаменты. В настоящей работе мы сравнивали два способа терапии у пациентов с гипертонией и гиперхолестеринемией и нашли, что монотерапия лизиноприлом или комбинированная терапия лизиноприлом с симвастатином оказывает влияние на окислительное состояние эритроцитов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ. В данной работе впервые проведены исследования, направленные на выявление влияния монотерапии лизиноприлом и комбинированной терапии лизиноприлом и симвастатином на активность антиокислительных ферментов в эритроцитах одних и тех же пациентов с умеренной гипертонией. Впервые показано, что монотерапия лизиноприлом и комбинированная терапия лизиноприлом и симвастатином оказывают специфическое, явно выраженное и одинаковое влияние на активность избранных антиокислительных ферментов в эритроцитах. Это позволяет предполагать, что приём лизиноприла и симвастатина может защищать эритроциты и другие ткани от окислительного повреждения.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Abuja P.M., Albertini R.* (2001) Clin. Chim. Acta, **306**, 1–17.
2. *John S., Schmieder R.E.* (2003) Curr. Hypertens. Rep., **5**, 199–207.
3. *Maselli R., Grembiale R.D., Pelaia G., Cuda G.* (2002) Monaldi Arch. Chest. Dis. **57**, 180–181
4. *Brzeszczynska J., Pieniazek A., Gwozdzinski L., Gwozdzinski K., Jegier A.* (2008) Appl. Physiol. Nutr. Metab., **33**, 1223–1231.
5. *Broncel M., Koter-Michalak M., Chojnowska-Jezierska J.* (2006) Przegl. Lek., **63**, 738–742.
6. *Spósito A.C., Mansur A.P., Coelho O.R., Nicolau J.C., Ramires J.A.* (1999) Am. J. Cardiol., **83**, 1497–1499.
7. *de Cavanagh E.M., Inserra F., Ferder L., Fraga C.G.* (2000) Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol., **278**, R572–R577.

8. *Kosenko E., Kaminsky Y., Kaminsky A., Valencia M., Lee L., Hermenegildo C., Felipo V.* (1997) Free Radic. Res., **27**, 637–644.
9. *Beauchamp C., Fridovich I.* (1971) Anal. Biochem., **44**, 276–287.
10. *Aebi H.E.* (1984) in: Methods of enzymatic analysis, V.3 (H.U. Bergmeyer, ed.) Wiley, New York, pp. 273–286.
11. *Goldberg D.M., Spooner R.J.* (1984) in: Methods of enzymatic analysis, V.3 (H.U. Bergmeyer, ed.) Wiley, New York, pp. 259–265.
12. *Косенко Е.А., Соломадин И.Н., Каминский Ю.Г.* (2009) Биоорг. Химия, **35**(2), 172–177.
13. *Kosenko E., Venediktova N., Kaminsky Y., Montoliu C., Felipo V.* (2003) Brain Res., **981**, 193–200.
14. *Rubin R., Farber J.L.* (1984) Arch. Biochem. Biophys., **228**, 450–459.
15. *Djordjević V.B., Pavlović D., Pejović M., Cvetković T., Leciæ N., Deljanin-Ilić M.* (1997) Clin. Nephrol., **47**, 243–247.
16. *Djordjević V.B., Grubor-Lajsić G., Jovanovic-Galović A., Pavlović D., Cvetković T., Pejović M., Lecić N.* (1998) J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol., **17**, 277–280.
17. *de Cavanagh E.M., Ferder L., Carrasquedo F., Scrivo D., Wassermann A., Fraga C.G., Inserra F.* (1999) Am. J. Kidney Dis., **34**, 445–455.
18. *Khan B.V., Sola S., Lauten W.B., Natarajan R., Hooper W.C., Menon R.G., Lerakis S., Helmy T.* (2004) Diabetes Care., **27**, 1712–1715.
19. *Djordjević V.B., Cosić V., Pavlović D., Vlahović P., Jevtović T., Kocić G., Savić V.* (2000) Ren. Fail., **22**, 535–544.
20. *de Cavanagh E.M., Fraga C.G., Ferder L., Inserra F.* (1997) Am. J. Physiol., **272**, R514–R518.
21. *Kowalski J., Pawlicki L., Grycewicz J., Bùaszczyk J., Irzmańiski R., Ceglińiski T., Kowalczyk E., Liban-Gaika B.* (2005) Wiad Lek., **58**, 275–279.
22. *Sola S., Mir M.Q., Lerakis S., Tandon N., Khan B.V.* (2006) J. Am. Coll. Cardiol., **47**, 332–337.
23. *Kowalski J., Olejniczak J., Bùaszczyk J., Bùaszczyk-Suszyńska J., Kowalski M., Petecka E., Kedziora J.* (2003) Pol. Merkur. Lekarski., **14**, 285–288.
24. *Passi S., Stancato A., Aleo E., Dmitrieva A., Littarru G.P.* (2003) Biofactors., **18**, 113–124.

Поступила: 21. 04. 2009.

ANTIOXIDANT ENZYMES IN ERYTHROCYTES FROM HYPERTENSION PATIENTS RECEIVING LISINOPRIL MONOTHERAPY OR COMBINED LISINOPRIL PLUS SIMVASTATIN THERAPY

E.A. Kosenko[1], A.V. Suslikov[2], N.I. Venediktova[1], Y.G. Kaminsky[1]

[1]Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, RAS, Institutskaya str., 3, Pushchino, 142290 Russia; tel.: +7 (496) 773-52-46; fax: +7 (496) 733-05-53; e-mail: kaminsky@iteb.ru
[2]Hospital at Pushchino Scientific Center, RAS, Pushchino, 142290 Russia

Statins and angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors have beneficial impact on the serum cholesterol and blood pressure. It is supposed that statins and ACE inhibitors may modify the antioxidative status of erythrocytes. The study objective was to compare the effects of two treatments, lisinopril alone vs lisinopril plus simvastatin, on erythrocyte antioxidant enzyme activities. The study involved 32 patients with arterial hypertension, the initial serum total cholesterol, LDL-cholesterol and triglycerides within the normal range. Patients of two groups, each of 16 subjects, were treated with lisinopril (10 mg/day) or with lisinopril (10 mg/day) plus simvastatin (20 mg/day). Before and after 3 and 6 months of follow-up therapy, activities of superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GLR) in purified erythrocytes were determined. In all patients, significantly higher catalase activity (by 79.3–106.5%, $p<0.0001$) and significantly lower GPx activity (by 20.7–30.6%, $p<0.001$) were observed after therapy as compared to the baselines. Just the same results were obtained in both groups (lisinopril and lisinopril + simvastatin), after both periods (3 and 6 month) of treatments. SOD activity was increased only in the lisinopril group and only after 6 months ($p=0.0345$). No changes of GLR reductase activity were seen under all conditions indicated. Thus, the lisinopril monotherapy and combined lisinopril plus simvastatin therapy exhibit specific, pronounced and equipotent effects on antioxidant enzymes in human erythrocytes. Administration of lisinopril or lisinopril plus simvastatin may protect erythrocytes and other tissues from oxidative damage.

Key words: erythrocyte; antioxidant enzymes; lisinopril; simvastatin; catalase; glutathione peroxidase.