

М.К. Осяева, А.К. Тихазе, В.З. Ланкин

ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС ПРИ ГИПЕРТЕРМИИ

ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Минздрава России, Москва, Россия

Изучено влияние неблагоприятных факторов внешней среды на основные параметры окислительного стресса у практически здоровых испытуемых. Практически здоровые добровольцы были подвергнуты действию искусственно созданной гипертермии. Через поделенные интервалы времени у участников исследования определяли уровень МДА в плазме крови, активность ключевых антиоксидантных ферментов в эритроцитах. После 30 дней пребывания в условиях гипертермии у испытуемых было выявлено статистически значимое увеличение содержания МДА (на 62 %), а также снижение активности каталазы (на 11 %) и глутатионпероксидазы (на 19 %).

Ключевые слова: активные формы кислорода, свободнорадикальное окисление, малонилдиальдегид, каталаза, глутатионпероксидаза, супероксидсмутаза

OXIDATIVE STRESS IN HYPERTHERMIA

М.К. Osyayeva, A.K. Tikhaze, V.Z. Lankin

Russian Cardiology Research and Production Complex, Moscow, Russia

Oxidative stress is a risk factor for disease development and cardiovascular system, diabetes, neurodegenerative diseases, etc. The resulting product is thus free radical lipid peroxidation - malondialdehyde (MDA) is atherogenic modification of low density lipoproteins (LDL), so that they acquire the ability to be rapidly accumulated in the cells of the vessel walls, causing pre-atherosclerotic lipid damages. The aim of this study was to investigate the effect of high temperature (one of the environmental factors) for key operating parameters: the content of secondary products of free radical oxidation polyene lipids - MDA in blood plasma and erythrocyte antioxidant activity of key enzymes. Hyperthermia was triggered in practically healthy volunteers (6 males, 22-46 years). The analysis was made using a recording spectrophotometer Hitachi-557 (Japan). The statistical analysis was performed using the non-parametric Wilcoxon-test (AtteStat program). MDA levels in the blood plasma, the activity of key antioxidant enzymes in erythrocytes were determined through divided intervals in study participants. A significant increase in MDA content (62 %) and reduction of catalase activity (11 %) and glutathione peroxidase (19 %) were revealed after 30 days in the conditions of hyperthermia test.

Key words: reactive oxygen species, free radical oxidation, malondialdehyde, catalase, glutathione peroxidase

Нарушение регуляции свободнорадикальных реакций сопровождается неконтролируемым неферментативным окислением полиеновых липидов и автоокислением углеводов, а также окислительным повреждением белков и нуклеиновых кислот, что приводит к возникновению так называемого окислительного стресса (ОС) [4, 8], характеризующегося накоплением первичных (органические гидропероксиды) и вторичных (карбонильные соединения) высокотоксичных продуктов свободнорадикального окисления в крови и тканях вследствие усиленного генерирования активных форм кислорода (АФК), таких как супероксидный анион-радикал, пероксид водорода и др. и/или подавления активности утилизирующих АФК антиоксидантных ферментов [4, 8, 12]. Кроме того, ОС является фактором риска возникновения и развития заболеваний сердечно-сосудистой системы, сахарного диабета, нейродегенеративных болезней и др. [4, 3, 7, 13]. Образующийся при ОС продукт свободнорадикального окисления липидов – малоновый диальдегид (МДА) – вызывает атерогенную модификацию липопротеидов низкой плотности (ЛПНП), вследствие чего они приобретают способность ускоренно накапливаться в клетках стенки сосудов, вызывая предатеросклеротические липоидозные повреждения [5, 6, 9, 14]. Целью настоя-

щей работы было исследование влияния повышенной температуры (один из неблагоприятных факторов внешней среды) на ключевые параметры ОС: содержание вторичного продукта свободнорадикального окисления полиеновых липидов (МДА) в плазме крови и активность ключевых эритроцитарных антиоксидантных ферментов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование, которое проводили на базе медико-технического комплекса (МТК) Института медико-биологических проблем РАН, включили 6 практически здоровых добровольцев мужского пола в возрасте 22-46 лет. Все участники эксперимента прошли предварительное медицинское обследование и подписали информированное согласие на включение в исследование. В течение 30 дней добровольцы проживали в ограниченной изоляции в искусственно созданных климатических условиях, имевших место в июле-августе 2010 г. в г. Москва. Температура в дневное время колебалась в пределах 30-38 °С при влажности 30-60 %; температура в ночное время составляла 23-31 °С при влажности 50-75 %. Все перемещения между помещениями были строго регламентированы для предотвращения нарушений установленных пара-

метров обитания; нормативный уровень микробной обсемененности газовой среды поддерживался за счет работы установки для обеззараживания воздуха. Взятие венозной крови проводили утром натощак в вакутейнеры фирмы Monovette, содержащие ЭДТА в качестве антиоксиданта и антикоагулянта. Содержание вторичных продуктов свободнорадикального окисления (преимущественно МДА) в плазме крови определяли по реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой в кислой среде, анализируя количество образовавшегося триметинового комплекса при 532 нм [2]. Активность каталазы определяли по скорости утилизации пероксида водорода при 240 нм [1]. За единицу активности каталазы принимали количество фермента, необходимое для восстановления 1 мкмольа H_2O_2 /мин. Активность селен-содержащей глутатионпероксидазы (GSH-Px) определяли в сопряженной глутатионредуктазной системе по скорости окисления NADPH при 340 нм [1]. При расчете начальной скорости вводили поправку на неферментативное окисление глутатиона за время реакции. За единицу активности GSH-Px принимали количество фермента, необходимое для окисления 1 мкмольа GSH/мин. Активность антиоксидантных ферментов выражали в ед/гHb; результаты, представленные на рисунке 1, выражены в процентах от исходного уровня. Определения производили, используя регистрирующий спектрофотометр Hitachi-557 (Япония). Статистическую обработку результатов проводили, используя непараметрический критерий Вилкоксона (программа AteStat).

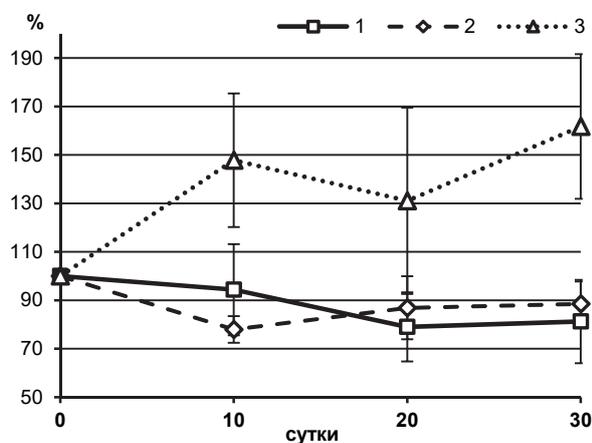


Рис. 1. Изменение содержания малонового диальдегида в плазме крови (3), а также активности глутатионпероксидазы (1), каталазы (2) в эритроцитах испытуемых при экспериментальной гипертермии.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Гипертермия может провоцировать повышенное генерирование АФК [10, 11]. При свободнорадикальном окислении липидов в плазме крови накапливается МДА, который можно рассматривать в качестве маркера ОС [4, 8, 12]. Стационарная концентрация МДА в плазме крови определяется двумя факторами: во-первых, интенсификацией образования АФК и свободнорадикальных интермедиатов, иницииру-

ющих окисление липидного субстрата [4, 8, 12] и, во-вторых, снижением эффективности природных антиоксидантных систем, включая антиоксидантные ферменты, утилизирующие АФК и другие прооксиданты [4, 8, 12]. Результаты наших предшествующих исследований указывали на то, что увеличение уровня продукта свободнорадикального окисления МДА при одновременном подавлении активности антиоксидантных ферментов является надежным критерием наличия ОС [1, 2]. Природные дикарбонилы, в частности МДА, могут ингибировать антиоксидантные ферменты, что должно приводить к увеличению стационарной концентрации токсичных альдегидов в плазме крови и усугублять проявления ОС вследствие снижения эффективности утилизации АФК [1]. Исходя из этого, в условиях гипертермии можно было ожидать проявления ОС, в частности увеличение содержания продуктов свободнорадикального окисления и одновременное снижение активности антиоксидантных ферментов в крови. За время исследования у испытуемых существенно вырос (на 62 %; $p < 0,001$) уровень одного из основных продуктов свободнорадикального окисления полиеновых липидов – МДА – в плазме крови (рис. 1) и одновременно в эритроцитах статистически значимо снизилась активность антиоксидантных ферментов каталазы (на 11 %; $p < 0,01$) и GSH-Px (на 19 %; $p < 0,045$), ответственных за утилизацию пероксида водорода и липогидропероксидов (рис. 1).

Следовательно, полученные данные однозначно доказывают, что при моделировании экстремальных условий природной среды у участников эксперимента развился ОС. Это подтверждается как существенным увеличением уровня продукта свободнорадикального окисления – МДА, – так и статистически значимым снижением активности ключевых антиоксидантных ферментных систем (каталазы и GSH-Px), что, согласно данным ранее выполненных нами исследований [1, 2], является характерным проявлением ОС. В последние годы обсуждается возможность развития осложнений заболеваний сердечно-сосудистой системы, связанных с глобальным изменением климатических условий. Поскольку можно считать установленным, что ОС играет важную роль в этиологии и патогенезе атеросклероза и его осложнений [4, 7, 13], исходя из результатов настоящего исследования, негативное влияние аномальных повышений температуры окружающей среды в прогрессировании атеросклероза нельзя недооценивать.

ЛИТЕРАТУРА REFERENCES

- Ланкин В.З., Коновалова Г.Г., Тихазе А.К. Влияние атерогенных альдегидных соединений на активность антиоксидантных ферментов // Кардиологический вестник. – 2011. – Т. 6, № 2. – С. 26–30.
- Lankin VZ, Konovalova GG, Tikhaze AK (2011). Influence of atherogenic aldehydes on antioxidant enzyme activity. [Vliyanie aterogennykh al' degidnykh soedineniy na aktivnost' antioksidantnykh fermentov]. *Kardiologicheskij vestnik*, 6 (2), 26-30.

2. Ланкин В.З., Коновалова Г.Г., Тихазе А.К., Недосугова Л.В. Глюкоза инициирует атерогенную окислительную модификацию липопротеидов низкой плотности *in vitro* и у больных сахарным диабетом типа 2 // Кардиологический вестник. – 2011. – Т. 6, № 1. – С. 16–22.

Lankin VZ, Konovalova GG, Tikhaze AK, Nedosugova LV (2011). Glucose triggers atherogenic oxidative modification of low-density lipoproteins *in vitro* and in diabetic patients [Glyukoza initsiiрует aterogennuyu okislitel'nyuyu modifikatsiyu lipoproteidov nizkoy plotnosti *in vitro* i u bol'nykh sakharnym diabetom tipa 2]. *Kardiologicheskii vestnik*, 6 (1), 16-22.

3. Ланкин В.З., Тихазе А.К., Беленков Ю.Н. Антиоксиданты в комплексной терапии атеросклероза: pro et contra // Кардиология. – 2004. – Т. 44, № 2. – С. 72–81.

Lankin VZ, Tikhaze AK, Belenkov YN (2004). Antioxidants in complex therapy of atherosclerosis: pro et contra [Antioksidanty v kompleksnoy terapii ateroskleroza: pro et contra]. *Kardiologiya*, 44 (2), 72-81.

4. Ланкин В.З., Тихазе А.К., Беленков Ю.Н. Свободнорадикальные процессы при заболеваниях сердечно-сосудистой системы // Кардиология. – 2001. – Т. 40, № 7. – С. 48–61.

Lankin VZ, Tikhaze AK, Belenkov YN (2001). Free-radical process in cardiovascular diseases [Svobodnoradikal'nye protsessy pri zabolovaniyakh serdechno-sosudistoy sistemy]. *Kardiologiya*, 40 (7), 48–61.

5. Ланкин В.З., Тихазе А.К., Капелько В.И., Шепелькова Г.С., Шумаев К.Б., Панасенко О.М., Коновалова Г.Г., Беленков Ю.Н. Механизм окислительной модификации липопротеидов низкой плотности при окислительном и карбонильном стрессе // Биохимия. – 2007. – Т. 72, № 10. – С. 1330–1341.

Lankin VZ, Tikhaze AK, Kapelko VI, Shepelkova GS, Shumaev KB, Panasenko OM, Konovalova GG, Belenkov YN (2007). Mechanism of oxidative modification of low-density lipoproteins in oxidative and carbonil stress [Mekhanizm okislitel'noy modifikatsii lipoproteidov nizkoy plotnosti pri okislitel'nom i karbonil'nom stresse]. *Biokhimiya*, 72 (10), 1330-1341.

6. Ланкин В.З., Тихазе А.К., Кумскова Е.М. Захват культивируемыми моноцитами-макрофагами человека липопротеидов низкой плотности, обогащенных первичными и вторичными продуктами свободнорадикального окисления липидов // Кардиологический вестник. – 2012. – Т. 7, № 1. – С. 18–22.

Lankin VZ, Tikhaze AK, Kumsikova EM (2012). Uptake of lipohydroperoxide-rich and malonyldialdehyde-modified low-density lipoproteins by human macrophages [Zakhvat kul'tiviruemyimi monotsitami-makrofagami cheloveka lipoproteidov nizkoy plotnosti, obogashchennykh pervichnymi i vtorichnymi produktami svobodnoradikal'nogo okisleniya lipidov]. *Kardiologicheskii vestnik*, 7 (1), 18-22.

7. Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К., Ланкин В.З., Бондарь И.А., Труфакин В.А. Окислительный стресс. Патологические состояния и заболевания. – Новосибирск: АРТА, 2008. – 284 с.

Menshchikova EB, Zenkov NK, Lankin VZ, Bondar IA, Trufakin VA (2008). Oxidative stress. Pathologic condi-

tions and diseases [Okislitel'nyy stress. Patologicheskie sostoyaniya i zabolvaniya], 284.

8. Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К., Бондарь И.А., Круговых Н.Ф., Труфакин В.А. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты. – М.: Слово, 2006. – 556 с.

Menshchikova EB, Lankin VZ, Zenkov NK, Bondar IA, Krugovykh NF, Trufakin VA (2006). Oxidative stress. Prooxidants and antioxidants [Okislitel'nyy stress. Prooksidanty i antioksidanty], 556.

9. Тихазе А.К., Вийгимаа М., Коновалова Г.Г., Кумскова Е.М., Абина Е., Земцовская Г., Янушевская Е.В., Власик Т.Н., Ланкин В.З. Взаимосвязь между наличием малонилдиальдегид-зависимой модификации и содержанием холестерина в липопротеидах низкой плотности // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2010. – № 2. – С. 143–145.

Tikhaze AK, Viygimaa MA, Konovalova GG, Kumsikova EM, Abina E, Zemtsovskaya G, Yanushevskaya EV, Vlasik TN, Lankin VZ (2010). Relation between malondialdehyde-depended modification and content of cholesterol in low-density lipoproteins [Vzaimosvyaz' mezhdu nalichiem malonildial'degid-zavisimoy modifikatsii i soderzhaniem kholesterina v lipoproteidakh nizkoy plotnosti]. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*, (2), 143-145.

10. Черников А.В., Гудков С.В., Штаркман И.Н., Брусков В.И. Кислородный эффект при тепловых повреждениях ДНК // Биофизика. – 2007. – Т. 52, Вып. 2. – С. 244–251.

Chernikov AV, Gudkov SV, Shtarkman IN, Bruskov VI (2007). Oxygen effect in DNA heat injury [Kislородnyy effekt pri teplovykh povrezhdeniyakh DNK]. *Biofizika*, 52 (2), 244-251.

11. Штаркман И.Н., Гудков С.В., Черников А.В., Брусков В.И. Образование перекиси водорода и гидроксильных радикалов в водных растворах L-аминокислот при воздействии рентгеновского излучения и тепла // Биофизика. – 2008. – Т. 53, Вып. 1. – С. 1–14.

Shtarkman IN, Gudkov SV, Chernikov AV, Bruskov VI (2008). Hydric dioxide and hydroxyl radical formation in water solutions of L-aminoacids in case of X-ray and heat impact [Obrazovanie perekisi vodoroda i gidroksil'nykh radikalov v vodnykh rastvorakh L-aminokislot pri vozdeystvii rentgenovskogo izlucheniya i tepla]. *Biofizika*, 53 (1), 1-14.

12. Lankin VZ (2003). The enzymatic systems in the regulation of free radical lipid peroxidation. In: A. Tomasi, T. Özben, V. Skulachev (eds.). Free radicals, nitric oxide, and inflammation: molecular, biochemical, and clinical aspects. *NATO Science Series*, (344), 8-23.

13. Lankin VZ, Tikhaze AK (2003). Atherosclerosis as a free radical pathology and antioxidative therapy of this disease. In: A. Tomasi, T. Özben, V. Skulachev (eds.). Free radicals, nitric oxide, and inflammation: molecular, biochemical, and clinical aspects. *NATO Science Series*, (344), 218-231.

14. Lankin VZ, Tikhaze AK, Konovalova GG. (2011). Aldehyde-dependent modification of low density lipoproteins. *Handbook of Lipoprotein Research*, 85-107.

Сведения об авторах
Information about the authors

Осяева Мария Константиновна – лаборант-исследователь отдела хронической ишемической болезни сердца ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Минздрава России (121552, г. Москва, ул. 3-я Черепковская, 15а; e-mail: osyeva.m@gmail.com)

Osyeva Maria Konstantinovna – Clinical Research Assistant of the Department of Chronic Ischemic Heart Disease of Russian Cardiology Research and Production Complex (121552, Moscow, 3rd Cherepkovskaya str., 15a; e-mail: osyeva.m@gmail.com)

Ланкин Вадим Зиновьевич – доктор биологических наук, профессор, руководитель лаборатории биохимии свободнорадикальных процессов Института клинической кардиологии ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Минздрава России (e-mail: lankin@cardio.ru)

Lankin Vadim Zinovyevich – Doctor of Biological Sciences, Professor, Head of the Laboratory of Biochemistry of Free-Radical Processes of Institute of Clinical Cardiology of Russian Cardiology Research and Production Complex (e-mail: lankin@cardio.ru)

Тихазе Алла Карловна – доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории биохимии свободнорадикальных процессов Института клинической кардиологии ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Минздрава России

Tikhaze Alla Karlovna – Doctor of Medical Sciences, Professor, Leading Research Officer of the Laboratory of Biochemistry of Free-Radical Processes of Institute of Clinical Cardiology of Russian Cardiology Research and Production Complex