

Е.Ф. Кахановський, В.Ф. Сагач

Дослідження оксидативного стресу, антиоксидантного захисту та ендотеліальної дисфункції при гострій ішемії–реперфузії нижніх кінцівок у людини

Дослідження проведено у людей похилого віку ($70 \pm 2,2$ роки), котрі були прооперовані з приводу гострої оклюзії стегнової артерії на різних анатомічних рівнях. На основі отриманих результатів про суттєве збільшення первинних продуктів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) гідроперекисів ліпідів і одного із кінцевих продуктів ПОЛ малонового дільдегіду зроблено висновок, що при ішемії–реперфузії в ураженій нижній кінцівці розвивався оксидативний стрес. Істотне підвищення активності каталази в крові свідчить імовірно, що система антиоксидантного захисту в цих умовах працює з напругою. За умов ішемії–реперфузії виявлено також збільшення активності аспаратамінотрансферази, аланінамінотрансферази і креатинінкінази, які традиційно використовуються в клінічних умовах як індикатори патологічних станів. У крові пацієнтів обох груп як у період ішемії, так і при реперфузії був виявлений стабільний мітохондріальний фактор, який є маркером відкриття мітохондріальної пори. Нами виявлені значні зміни вмісту NO_2^- в крові за умов реперфузії, направленість яких певною мірою залежала від тривалості ішемії. Значні зміни стабільного метаболіту NO^- нітриту в крові вказують на можливість розвитку ендотеліальної дисфункції. Сукупність усіх отриманих результатів вказує на розвиток оксидативного стресу і ендотеліальної дисфункції у людей з гострими оклюзуючими ураженнями нижніх кінцівок.

Ключові слова: оксидативний стрес, антиоксидантний захист, ішемія–реперфузія, ендотеліальна дисфункція.

ВСТУП

Гострими оклюзуючими ураженнями артерій нижніх кінцівок страждає близько 5 % осіб літнього віку, з них на частку оклюзійних уражень артерій нижніх кінцівок атеросклеротичного генезу припадає 90 % хворих, переважно чоловічої статі зрілого віку. При цьому за прогнозами експертів ВОЗ, найближчими роками очікується зростання цієї категорії хворих на 5–7 % [9, 20]. Думка про те, що ішемічні розлади у хворих з облітеруючими пошкодженнями артерій нижніх кінцівок переважно зумовлені недостатнім притоком крові в уражену кінцівку, була спростована результатами прижиттєвих ангіографічних, а також морфологічних досліджень стану судинної

мережі ампутованих кінцівок. Зокрема, було встановлено, що у деяких випадках об'єм капілярної мережі ураженої кінцівки та сумарний просвіт мікросудин перевищував діаметр оклюзованої магістральної судини [23]. Ішемія і гіпоксія тканин є лише пусковими чинниками патологічного процесу – його подальший перебіг визначається змінами метаболізму в ураженій кінцівці [9, 20, 23]. Одним із механізмів управління внутрішньоклітинним метаболізмом є перекисне окиснення ліпідів (ПОЛ). Посилення цього процесу призводить до утворення надлишкової кількості вільних радикалів кисню і азоту, а також розвитку оксидативного стресу. Часто в природних умовах (при тромбозі) і завжди в штучних

© Е.Ф. Кахановський, В.Ф. Сагач

умовах (при оперативному втручанні) ішемія при відновленні кровотоку супроводжується реперфузією і реоксигенацією, що призводить до розвитку оксидативного стресу, який значною мірою є необерненим деструктивним процесом. У цей час у клітинах активується синтез оксиду азоту та його активних форм, що може викликати нітрозильне ушкодження клітин.

Відомо, що оксид азоту (NO) відіграє суттєву роль у функціонуванні судин, причому в його циклі важливе значення мають продукти ферментативного і неферментативного окиснення NO, в першу чергу стабільні метаболіти NO_2^- і NO_3^- [16]. Останнім часом з'явилось достатньо відомостей про оксид азоту як універсальний регулятор клітинного і тканинного метаболізму [14, 25, 42]. Його ефекти в артеріальних судинах залежать від концентрації, ступеня дифузії через судинну стінку, здатності взаємодіяти з кисневими радикалами тощо [2]. Оксид азоту, який синтезується в ендотеліальних клітинах судин із L-аргініну за участю ендотеліальної NO-синтази, забезпечує вазодилатацію внаслідок активації гуанілатциклази в гладеньком'язових клітинах і стимуляції синтезу циклічного гуанізинмонофосфату (цГМФ). Метаболізм NO змінюється з віком, впливаючи на ендотеліальну функцію [10, 12]. Його порушення відіграють важливу роль у дисфункції ендотелію і є невід'ємною частиною патогенезу атеросклерозу, ішемічної хвороби серця, цукрового діабету тощо [6, 11, 13, 15, 28]. Нині отримано дані [18, 24, 40], що дисфункція ендотелію супроводжується послабленням його антиоксидантних можливостей, накопиченням активних форм кисню, що сприяє ініціації клітинної загибелі. Непрямим показником метаболізму NO в організмі є вміст нітритів і нітратів (кінцеві продукти), які можуть бути визначені в плазмі, сироватці крові, культуральних рідинах, сечі з використанням різноманітних методів [38, 39, 43].

Це отримало широке розповсюдження в експериментальних і клінічних роботах для оцінки загального синтезу NO [11, 38, 39, 43].

Внутрішньоклітинною мішенню ушкодження вважаються мітохондрії, в яких під впливом несприятливих факторів раптово збільшується проникність обох мітохондріальних мембран, що сприяє відкриванню мітохондріальних пор (МП). Останнє, в свою чергу, супроводжується виходом із мітохондрій цілої низки молекул (до 1500 Да), зокрема цитохрому *c*, фактора індукції апоптозу та інших проапоптичних білків [30, 35, 36], для яких внутрішня мітохондріальна мембрана за нормальних умов є непроникною. Ці метаболіти запускають розвиток порушень, які призводять до апоптозу або некрозу клітин. До цього часу в літературі відсутні дані про функціональний стан мітохондрій в ендотеліальних клітинах при гострих оклюзуючих ураженнях артерій нижніх кінцівок.

Дані експериментів *in vivo* [29] свідчать про те, що оксидативний стрес, який виникає внаслідок накопичення окиснених ліпопротеїнів низької щільності, прискорює апоптоз ендотеліоцитів, однак до цього часу не проведено детальний аналіз стану антиоксидантного захисту при гострій ішемії–реперфузії нижніх кінцівок у людини. Тому метою нашої роботи стало дослідження характеру змін показників оксидативного стресу, антиоксидантного захисту та ендотеліальної дисфункції при гострій ішемії–реперфузії нижніх кінцівок у людини.

МЕТОДИКА

Обстежено 27 осіб (11 жінок і 16 чоловіків), які були прооперовані з приводу гострої оклюзії стегнової артерії на різних її анатомічних рівнях. Середній вік пацієнтів був $(70 \pm 2,2)$ років. Ішемія тривала в середньому $(135,8 \pm 52,1)$ год. Усі пацієнти страждали на супутню патологію: ішемічна хвороба серця, гіпертонічна хвороба,

облітеруючий атеросклероз нижніх кінцівок, цукровий діабет II типу, чоловіки мали тютюнову залежність.

Відбір проб крові проводили перед початком оперативного втручання зі стегнової вени ушкодженої кінцівки і через 20 хв реперфузії, після відновлення кровотоку в ураженій кінцівці. Як маркери оксидативного стресу визначали: малоновий діальдегід (МДА), що утворюється з продуктів ПОЛ при нагріванні в кислому середовищі, який при взаємодії з молекулами тіобарбітурової кислоти утворює фарбований комплекс, що досліджують за допомогою спектрофотометра при довжині хвиль 535 та 580 нм [6]; мітохондріальний фактор (МФ), який є маркером відкриття МП, – спектрофотометричне дослідження спеціально обробленої сироватки крові в ультрафіолетовій ділянці спектра при довжині хвилі від 230 до 260 нм [19]; вміст гідроперекисів ліпідів (ГПЛ) крові [3] – за описаною методикою обробляли зразки крові реактивами, відбирали гептановий шар, в якому за допомогою спектрофотометра вимірювали оптичну густину при довжині хвилі 233 нм і розраховували вміст ГПЛ за формулою у відносних одиницях [3]; стан антиоксидантної системи оцінювали за активністю каталази, яку визначали в сироватці крові [8], обробленої реактивами та реєстрували оптичне поглинання за допомогою спектрофотометра при довжині хвилі 410 нм. Стан системи оксиду азоту в судинах оцінювали за вмістом в крові NO_2^- [5], який визначали спектрофотометрично при довжині хвилі 517 нм відносно розчину порівняння. За допомогою автоматичного біохімічного аналізатора Vitros - 250 (США) вивчали ферменти крові: аспартатамінотрансферазу (АсТ), аланінамінотрансферазу (АлТ), креатинінкіназу, які традиційно використовуються в клінічних умовах для ідентифікації деяких патологічних станів. Статистичний аналіз отриманих результатів здійснювали за допомогою

критерію t Стьюдента, використовуючи стандартну комп'ютерну програму STATISTICA'99 Edition ("StatSoft. Inc", США). Як статистично значимі розглядалися відміни з $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Оскільки вважається, що визначення вмісту нітритів дає реальну інформацію про рівень метаболізму NO і, відповідно, функціональний стан ендотелію, ми проаналізували вміст нітритів в крові при ішемії–реперфузії у різних осіб і виявили, що він змінювався неоднозначно: здебільшого зменшувався відносно рівня при ішемії, однак спостерігалось також і його збільшення. Залежно від цього було виділено дві групи осіб. До першої групи ввійшли особи (37 %, 6 чоловіків і 4 жінки) віком ($71 \pm 2,4$) роки у яких вміст нітритів підвищувався при реперфузії, ішемія тривала ($91,5 \pm 14,5$) год. Другу групу склали люди (63 %, 10 чоловіків і 7 жінок) віком ($69 \pm 3,2$) роки, у яких вміст нітритів знизився, а ішемія тривала ($161,8 \pm 82,6$) год. У першій групі тривалість ішемії була на 70 год меншою, ніж у осіб другої групи. Виходячи з цього, складається враження, що при реперфузії напрямок змін вмісту нітритів в крові пацієнтів певною мірою залежав від тривалості ішемії. З іншого боку, в першій групі вік був дещо більшим за такий у осіб другої групи.

Як з'ясувалось, у першій групі вміст нітритів у венозній крові зі стегнової вени ураженої кінцівки при ішемії становив $0,60 \text{ мкг/мл} \pm 0,14 \text{ мкг/мл}$ ($P < 0,05$), а після відновлення кровообігу – $1,43 \text{ мкг/мл} \pm 0,4 \text{ мкг/мл}$ ($P < 0,05$; рис. 1), тобто він підвищився в 2,4 раза відносно значень при ішемії. Значне збільшення кінцевих метаболітів NO при реперфузії свідчить про виражене підвищення його продукції в цей період. Надмірне утворення NO звичайно пригнічує активність ендотеліальної NO-синтази і ушкоджує ендотеліальні клітини. В другій групі

вміст нітритів у венозній крові стегнової вени ураженої кінцівки при ішемії становив $1,4 \text{ мкг/мл} \pm 0,28 \text{ мкг/мл}$ ($P < 0,05$; див. рис. 1), а після відновлення кровообігу – $0,68 \text{ мкг/мл} \pm 0,1 \text{ мкг/мл}$ ($P < 0,05$). Це свідчить про значне зниження продукції NO, яке також сприяє розвитку ендотеліальної дисфункції. У здорових людей зрілого віку вміст нітритів у крові коливається від 0 до $4,2 \text{ мкмоль/л}$ [44]. У проведених нами досліджах вміст нітритів при ішемії–реперфузії ми аналізували у осіб похилого віку, причому з наявністю супутньої серцево-судинної патології. Існують дані про виражену негативну кореляцію між вмістом нітритів і віком пацієнтів ($r = -0,89$, $P < 0,05$) [12]; показано, що синтез NO у осіб старших за 75 років у 4 рази нижчий, ніж у 25-річних осіб [37]. Аналогічним чином було визначено, що у старих щурів вміст нітрит-аніона значно зменшувався (на 40 %) внаслідок зниження активності ендотеліальної NO-синтази, яка у старих щурів на 52 % нижча, ніж у дорослих, а вміст індукцибельної NO-синтази виявився на 67 % вищим, що пов'язують із надлишковим утворенням і накопиченням у тканинах пероксинітриту в процесі старіння [10]. Вважають, що дисбаланс у системі NO, який лежить в основі виникнення ендотеліальної дисфункції, відіграє важливу роль у розвитку серцево-судинної патології залежно від віку. Як з'ясувалося, вміст нітритів у крові переважно знижується і при різних видах серцево-судинної патології [11, 37]. Типовим для дисфункції ендотелію на фоні серцево-судинної патології (гіпертензія, ішемічна хвороба серця, хронічна серцева недостатність, гострий інфаркт міокарда, атеросклероз) вважається зниження вмісту кінцевих метаболітів NO в крові та сечі. Це свідчить про депресію генерації NO і може бути пов'язано з пригніченням експресії гена ендотеліальної NO-синтази, зниженням експресії і активності цього ферменту, недостатністю ко-

факторів синтезу NO, недостатністю L-аргініну, збільшенням локальної концентрації пероксинітриту у судинній стінці, пригніченням антиоксидантного захисту тощо. Підвищення вмісту кінцевих метаболітів NO і, відповідно, його синтезу може відбуватися при вираженій дисфункції ендотелію на фоні високого рівня генерації NO. Отже, отримані нами результати відповідають загальній тенденції динаміки вмісту кінцевих метаболітів NO у осіб похилого віку, які до того ж мають порушення діяльності серцево-судинної системи – ішемічну хворобу серця, гіпертонічну хворобу, облітеруючий атеросклероз нижніх кінцівок, цукровий діабет II типу, тобто серцево-судинні захворювання, в патогенезі яких значну роль відіграють зміни в системі оксиду азоту. Істотні зміни вмісту нітритів при ішемії–реперфузії у осіб з гострими оклюзуючими ураженнями артерій нижніх кінцівок свідчать про значні порушення метаболізму NO і можливість розвитку ендотеліальної дисфункції у цих осіб.

Одним із механізмів управління внутрішньоклітинним метаболізмом вважається ПОЛ, яке є необхідною ланкою багатьох життєво важливих процесів. Його поси-

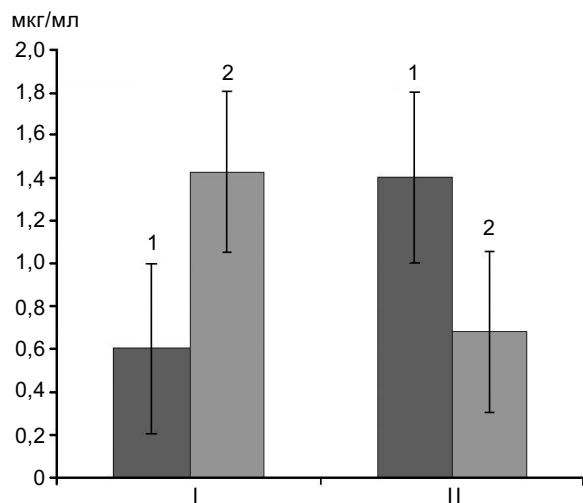


Рис. 1. Концентрація нітритів крові при ішемії (1) і реперфузії (2) нижньої кінцівки у осіб з гострою оклюзією стегнової артерії: I, II – групи 1 і 2 – особи з підвищеним і зниженим вмістом нітритів відповідно

лення призводить до утворення надлишкової кількості вільних радикалів, що відіграє важливу роль у розвитку багатьох патологічних станів і призводить до зниження вмісту NO і розвитку ендотеліальної дисфункції [31]. Первинним продуктом ПОЛ є ГПЛ, а одним із кінцевих продуктів вільнорадикального окиснення – МДА. Зважаючи на те, що дисфункція ендотелію звичайно супроводжується послабленням його антиоксидантних можливостей і накопиченням активних форм кисню, нами було проаналізовано зміни активності каталази, вмісту ГПЛ і МДА для оцінки ролі оксидативного стресу при гострій ішемії–реперфузії нижніх кінцівок.

Активність каталази, яка характеризує стан антиоксидантної системи, підвищувалась при реперфузії у пацієнтів обох груп. Так, у осіб першої групи при реперфузії вона підвищилася на 67 % (206,9 мкат/л ± 47 мкат/л; P<0,05) у порівнянні з її значеннями до реперфузії (139,2 мкат/л ± 42 мкат/л; P<0,05). У пацієнтів другої групи цей показник після реперфузії підвищився на 69 % (354,2 мкат/л ± 58,5 мкат/л; P=0,14) у порівнянні із її значеннями при ішемії (245,4 мкат/л ± 58,9 мкат/л; P=0,14; рис. 2,а). Якщо порівняти ці результати з такими у пацієнтів першої групи, то виявляються відмінності в абсолютних значеннях активності цього ферменту, в другій групі вона майже вдвічі більша, ніж у першій групі. Що стосується збільшення активності цього ферменту при реперфузії, то воно було майже однаковим в обох групах. Отримані результати можуть свідчити про те, що антиоксидантна система при ішемії–реперфузії працює з напругою.

У контролі вміст МДА в крові не перевищує 3,6 нмоль/мл ± 0,13 нмоль/мл. При ішемії в першій групі він становив 6,52 нмоль/мл ± 0,53 нмоль/мл (P<0,05), а в другій групі – 6,45 нмоль/мл ± 0,47 нмоль/мл (P<0,05), тобто в обох групах він значно перевищував рівень у здорових людей. У

разі реперфузії в першій групі вміст МДА становив 5,97 нмоль/мл ± 0,4 нмоль/мл (P=0,26), а в другій групі – 5,58 нмоль/мл ± 0,53 нмоль/мл (P<0,05), тобто при ішемії–

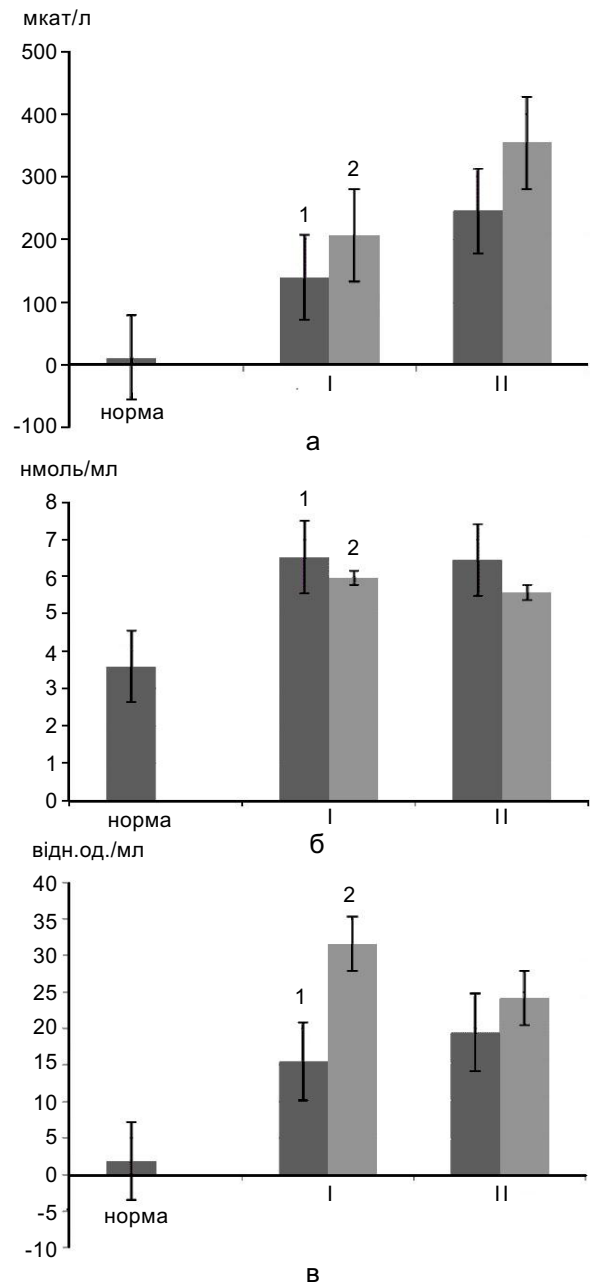


Рис. 2. Зміни показників оксидативного стресу і антиоксидантного захисту при ішемії (1) і реперфузії (2) нижньої кінцівки людей: а – активність каталази; б – вміст малонового діальдегіду; в – вміст гідроперекисів ліпідів; I, II – групи 1 і 2 – особи з підвищеним і зниженим вмістом нітритів відповідно

реперфузії цей показник значно перевищував такий у контролі, що вказує на розвиток оксидативного стресу в обох групах (див. рис. 2,б).

Аналогічно вміст ГПЛ при реперфузії теж збільшувався в крові осіб обох груп. У першій групі він достовірно збільшився в 2 рази ($P < 0,05$) порівняно з таким при ішемії ($P < 0,05$). У пацієнтів другої групи цей показник збільшився на 20 % ($P < 0,05$) щодо значень при ішемії ($P < 0,05$; рис. 2,в). Таким чином, в обох групах при ішемії–реперфузії значно збільшився вміст первинних продуктів ПОЛ ГПЛ і одного із кінцевих продуктів – МДА, що вказує на розвиток оксидативного стресу, який звичайно сприяє розвитку деструктивних процесів.

Відомо, що АсТ і АлТ є внутрішньоклітинними ферментами, які виявляються в усіх клітинах людського організму і відомі також як трансамінази. Вони виконують важливу функцію – перенесення аміногруп від амінокислот на кетокислоти. В нормі активність АсТ у плазмі крові становить 0,2–0,46 мкмоль/(год · мл), а АлТ – 0,1–0,66 мкмоль/(год · мл). Разом із креатинкіназою вони традиційно використовуються в клінічній практиці для визначення ступеня пошкодження тканин при різних патологічних станах. Креатинкіназа є ферментом, який бере участь в енергетичному обміні клітин, вона каталізує реакцію утворення і розпаду креатинфосфату і вважається одним із основних ферментів, який характеризує ішемічні ушкодження скелетної мускулатури. В нормі його активність в плазмі крові становить 42–150 од./л неорганічного фосфору і звичайно підвищується при ураженнях м'язової тканини внаслідок травми, оперативного втручання тощо. Аналіз активності цих ферментів у осіб із гострими оклюзуючими ураженнями артерій нижніх кінцівок показав, що їх значення в обох групах збільшується в період реперфузії відносно показника при ішемії за наявності кількісних відмінностей. Так, у

першій групі активність АлТ при ішемії і реперфузії знаходилася в межах, характерних для здорових осіб, хоча вона збільшилася при реперфузії на 2 % порівняно з такою при ішемії. Активність АсТ при реперфузії достовірно збільшилася на 50 % ($P < 0,05$) порівняно зі значеннями при ішемії (рис. 3,а).

У другій групі активність АлТ при реперфузії становила 0,63 мкмоль/(год · мл) \pm 0,15 мкмоль/(год · мл), ($P = 0,86$) порівняно зі значенням при ішемії (0,64 мкмоль/(год · мл) \pm 0,17 мкмоль/(год · мл), ($P = 0,86$). Тобто в цій групі активність АлТ була вищою при ішемії і реперфузії за таку в нормі і у осіб першої групи. Активність АсТ при ішемії і реперфузії була істотно вищою щодо норми на відміну від пацієнтів першої групи. Вона збільшилася при реперфузії на 22 % і становила 1,04 мкмоль/(год · мл) \pm 0,2 мкмоль/(год · мл), ($P < 0,05$), порівняно зі значеннями при ішемії (0,82 мкмоль/(год · мл) \pm 0,2 мкмоль/(год · мл), ($P < 0,05$; рис. 3,б). Активність цього ферменту в крові осіб другої групи при ішемії була в 2,7 рази вищою за таку у пацієнтів першої групи, але її зміни при реперфузії були менш вираженими у порівнянні зі значеннями у пацієнтів першої групи.

Активність креатинкінази в обох групах осіб при ішемії і при реперфузії суттєво перевищувала таку у здорових осіб. Слід відмітити, що при ішемії у осіб другої групи вона виявилася в 2,5 рази більшою, ніж у першій групі. Аналогічна закономірність спостерігалася при реперфузії: активність креатинкінази у осіб першої групи становила (666,7 \pm 94,3) од./л, а у осіб другої групи – (1085 \pm 418,3) од./л (див. рис. 3,в). Таким чином, отримані результати про надмірну активацію АсТ, АлТ і креатинкінази у осіб із гострими оклюзуючими ураженнями артерій нижніх кінцівок вказують на розвиток деструктивних процесів при ішемії–реперфузії.

У крові осіб обох груп як у період іше-

мії, так і при реперфузії був виявлений стабільний мітохондріальний фактор (МФ). Збільшення його рівня через 20 хв реперфузійного періоду відносно його значення при ішемії становило 5 % у пацієнтів першої групи (рис. 4,а). У пацієнтів другої групи

(див. рис. 4,б) збільшення рівня МФ через 20 хв реперфузійного періоду було статистично вірогідним і становило 3 % ($P < 0,05$), тобто в другій групі пацієнтів збільшення рівня МФ при реперфузії відносно його значення при ішемії було менш вираженим, ніж у пацієнтів першої групи (5 %). Фактор, який вивільнюється під час реперфузії ішемізованого серця, вважається маркером відкривання МП [21]. Отже, є підстави вважати, що вивільнення МФ є індикатором порушень в ендотеліальних клітинах судин.

Аналіз отриманих результатів вказує на наявність ендотеліальної дисфункції у хворих з гострою ішемією–реперфузією нижньої кінцівки. Безумовно свій внесок у розвиток ендотеліальної дисфункції у осіб, які обстежувалися, вносила супутня соматична патологія та вікові зміни ендотелію. Відомо, що функціонально та структурно повноцінний ендотелій регенерує тільки до 30-річного віку [31]. У більш пізньому віці при природному оновленні регенерують «неповноцінні» ендотеліоцити. За даними морфологічних досліджень [22] у здорових людей, старших за 60 років, визначається гетерохромність ядра ендотеліоцитів, збідніння рибосомами мембран гранулярного ендоплазматичного ретикулума, що вказує на порушення білоксинтезувальної функції клітин. Змінюється структура частини мітохондрій, що проявляється в їх набуханні, загибелі крист, руйнуванні окремих органел, що супроводжується погіршенням енергетичного обміну клітини. Збільшується число первинних і вторинних лізосом. Порушується структура мікрофібрил [22]. Описані зміни є морфологічним підтвердженням функціональної неспроможності ендотеліоцитів. Це доводять експериментальні та клінічні дослідження, в яких показано вікові зміни судинно-рухової, антитромботичної, антиоксидантної, протизапальної активності ендотелію [31, 32]. Морфофункціональні зміни в ендотелії судин у людей похилого віку

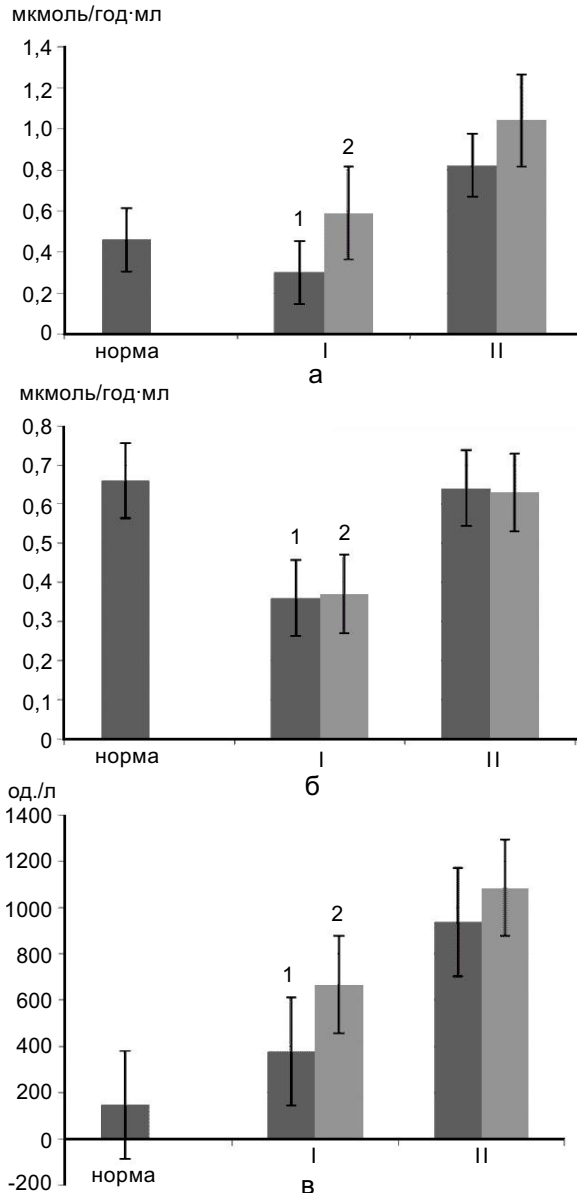


Рис. 3. Зміни показників ушкодження тканин при ішемії (1) і реперфузії (2) нижньої кінцівки людей: а – активність аспартатамінотрансферази; б – активність аланінамінотрансферази; в – активність креатинкінази; I, II – групи I і 2 – особи з підвищеним і зниженим вмістом нітритів відповідно

сприяють розвитку судинної патології, і в умовах дії таких факторів ризику, як куріння, гіперхолестеринемія, підвищений рівень артеріального тиску та інші можуть бути тригером розвитку захворювань серцево-судинної системи [33]. Стан ішемії–реперфузії, який супроводжується розвитком оксидативного стресу, здійснює потужну руйнівну дію на систему NO. Джерелом вільних радикалів можуть бути лейкоцити, які містять рецепторрегульовану НАД(Ф)Н-оксидазу з високою здатністю виробляти цитотоксичні рівні вільних радикалів. Іншим їх джерелом може бути підвищена активність циклооксигенази

ендотеліоцитів. Вільні радикали, особливо пероксиди, збільшуючи вміст внутрішньоклітинного кальцію, здатні активувати ендотеліальну NO-синтазу (NOS-3), що у свою чергу призводить до синтезу надмірної кількості NO і, як наслідок, до утворення ONOO⁻. Велика кількість вільних радикалів і надмірне посилення продукції NO, причому відразу за рахунок активації двох типів NOS – індукцйбельної NOS (NOS-2), яка індукується цитокінами [27] і надмірної активації ендотеліальної NOS (NOS-3), що індукується підвищеним вмістом внутрішньоклітинного кальцію в ендотелії, створюють умови для утворення токсичних рівнів ONOO⁻.

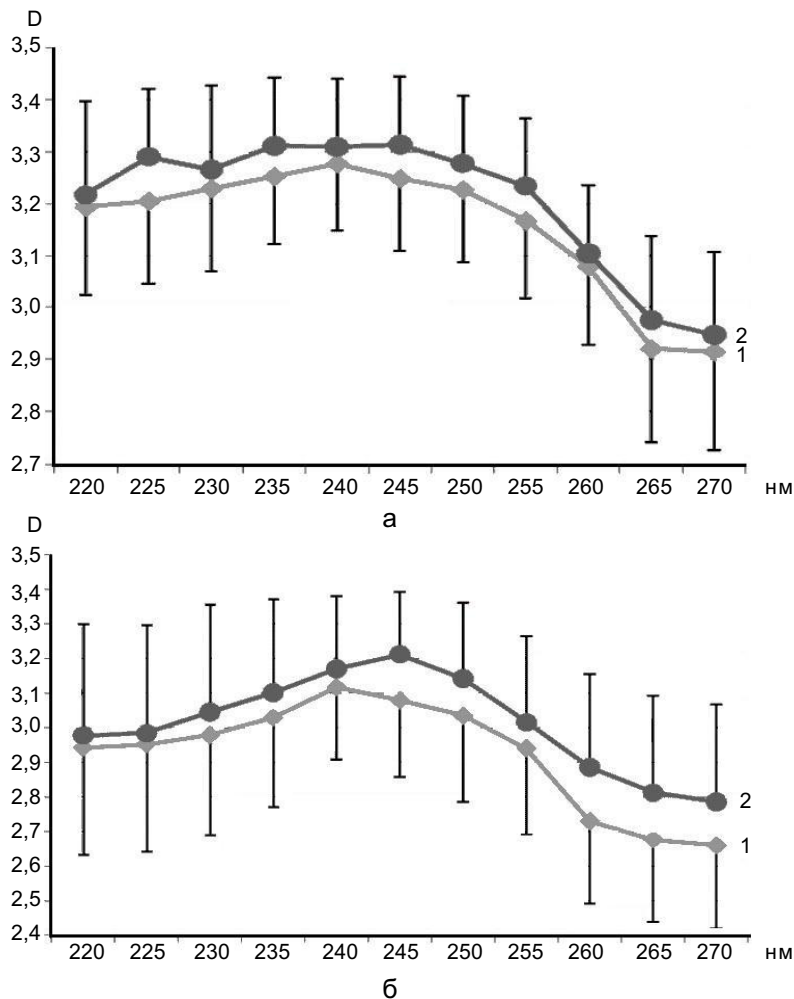


Рис. 4. Вивільнення мітохондріального фактора при ішемії (1) і реперфузії (2) нижньої кінцівки у осіб з гострою окклюдією стегнової артерії: а – під час відновлення кровообігу у осіб із зниженням вмісту нітритів крові; б – при ішемії–реперфузії у осіб із підвищенням вмісту нітритів крові

Таким чином, проведені дослідження свідчать про те, що у всіх осіб розвинувся оксидативний стрес під час відновлення кровообігу в ураженій кінцівці, що підтверджується підвищенням вмісту МДА, ГПЛ, МФ. У цих умовах система антиоксидантного захисту працює з навантаженням, про що свідчить збільшення активності каталази крові майже в 2 рази. Зміни в крові стабільного метаболіту NO – нітриту у осіб з гострими оклюзуючими ураженнями артерій нижніх кінцівок говорять про розвиток ендотеліальної дисфункції. Цікавими є результати про два типи реакції ендотелію на відновлення кровообігу в постраждалій кінцівці: підвищення вмісту нітритів крові та його зниження. Якоюсь мірою напрямом змін вмісту NO_2^- корелює із тривалістю ішемії: він зменшувався при більш тривалій і збільшувався при менш тривалій ішемії. Але при цьому при зменшенні вмісту нітритів в крові, всі досліджені показники знаходилися на більш високому рівні при ішемії і реперфузії.

Е.Ф. Кахановський, В.Ф. Сагач

ИССЛЕДОВАНИЕ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА, АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ И ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ ПРИ ОСТРОЙ ИШЕМИИ–РЕПЕРФУЗИИ НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ У ЧЕЛОВЕКА

Исследование проведено у людей преклонного возраста ($70 \pm 2,2$ лет), прооперированных по поводу острой окклюзии бедренной артерии на разных ее анатомических уровнях. На основе результатов о существенном увеличении первичных продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) гидроперекисей липидов и одного из конечных продуктов – малонового диальдегида (МДА) сделан вывод, что при ишемии–реперфузии в тканях пораженной нижней конечности развивался оксидативный стресс. Существенное увеличение активности каталазы в крови позволяет думать, что система антиоксидантной защиты в этих условиях работает с напряжением. При ишемии–реперфузии у этих лиц нами выявлено выраженное увеличение активности ряда ферментов – аспартат-аминотрансферазы, аланинаминотрансферазы и креатининкиназы, которые традиционно используются в клинических условиях в качестве индикатора повреждения тканей. Содержание нитритов существенно уменьшалось при

реперфузии относительно их уровня при ишемии у большей части лиц (63 %), хотя в ряде случаев (33 %) наблюдалось его столь же существенное увеличение. Выраженное снижение продукции NO, также как и существенное ее увеличение свидетельствуют о дисфункции эндотелия. Как в период ишемии, так и при реперфузии, был выявлен стабильный митохондриальный фактор, что свидетельствует об открытии митохондриальной поры. При открытой митохондриальной поре становится возможным транспорт проапоптических веществ из митохондрий в цитозоль клетки, что обычно приводит к деструктивным изменениям в ней. Совокупность всех полученных результатов указывают на развитие оксидативного стресса и эндотелиальной дисфункции у людей с острыми окклюзирующими поражениями нижней конечности. Ключевые слова: оксидативный стресс, антиоксидантная защита, ишемия–реперфузия, эндотелиальная дисфункция.

E.F. Kakhanovsky, V.F. Sagach

STUDY OF CHANGES IN THE PARAMETERS OF OXIDATIVE STRESS, ANTI-OXIDATIVE DEFENCE AND ENDOTHELIAL DYSFUNCTION IN ACUTE ISCHEMIA/REPERFUSION IN LOWER EXTREMITIES IN HUMANS

We carried out a study on elderly people ($70 \pm 2,2$ years old) operated on as an acute occlusion of the femoral artery at its different anatomical levels. In those people, development of oxidative stress has been shown in injured lower extremity in the process of restoring of circulation. Marked increase in catalase activity in the blood gives evidence for work of the anti-oxidative defence system with tense. We determined an increase in aspartataminotransferase, alaninaminotransferase and creatininkinase in ischemia/reperfusion which are widely used to identify injures in muscular tissues. It has been shown that NO_2^- content in the blood at reperfusion depended on the level of nitrites and the duration of ischemia. Significant changes in NO metabolite content in the blood of the patients suffering from acute occlusion injures of the arteries in the lower extremities could be related with endothelial dysfunction.

O.O. Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Акопова О.В., Коцюруба А.В., Ткаченко Ю.П., Сагач В.Ф. Оксид азоту пригнічує відкриття митохондриальної пори і збільшує кальцієву ємність митохондрий *in vivo* // Фізіол. журн. – 2005. – 51, №3. – С. 3–11.
2. Беридзе М.З., Урушадзе И.Т., Шакаришвили Р.Р. (2001) Механизмы отсроченной гибели нейронов при острой церебральной ишемии в эксперименте // Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. Инсульт (приложение). – 3. – С. 35–40.

3. Гаврилов В.Б., Мишкорудная М.И. Спектрофотометрическое определение содержания гидроперекисей липидов в плазме крови // Лаб. дело. – 1983. – № 3. – С. 34–37.
4. Камышников В.С. О чем говорят медицинские анализы. Справочное пособие. Минск: Беларус. Наука, 1997. – 197 с.
5. Катаев С.С., Чухустова В.С., Акимов П.А., Опутина Л.А. Спектрофотометрический метод определения нитритов в трупной крови // Актуальные проблемы паталогической анатомии и судебной медицины: Межвуз. сб. науч. работ. – 2001. – С. 158–161.
6. Коваленко В.Н, Гулая Н.М, Семикоппая Т.В, Коцюруба А.В., Корниенко Т.М. Нарушение функции эндотелия у пациентов с ишемической болезнью сердца в сочетании с артериальной гипертонией // Укр. кардиол. журн. – 2002. – 3. – С. 5–8.
7. Коробейникова Э.Н. Модификация определения продуктов перекисного окисления липидов в реакции с тиобарбитуровой кислотой // Лаб. дело. – 1989. – №7. – С. 8–9.
8. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. Метод определения активности каталазы // Там же. – 1988. – №1. – С. 16–19.
9. Кошкин В.М. Консервативное лечение хронической артериальной недостаточности нижних конечностей / Под ред. Савельева В.С. – М.: Медиа Медика, 2003. – С. 84–90.
10. Кульчицкий О.К. Эндотелиальная функция и процесс старения // Лікування та діагностика. – 2002. – 4. – С.6–9.
11. Лапшина Л.А, Кравчук П.Г., Титова А.Ю., Глебова О.В. Значение определения нитритов-нитратов как маркеров дисфункции эндотелия при сердечно-сосудистой патологии // Укр. мед. часопис. – 2009. – 6(74). – С. 49–52.
12. Лапшина Л.А, Титова А.Ю, Горбач Т. В. Уровень S-нитрозотиола и нитритов-нитратов в сыворотке крови при хронической сердечной недостаточности у больных пожилого и старческого возраста // Эксперим. і клін. медицина. – 2005. – 2. – С.61–64.
13. Малая Л.Т, Корж А.Н, Балковая Л.Б. Эндотелиальная дисфункция при патологии сердечно-сосудистой системы. – Харьков: Торсинг, 1999. – 432 с.
14. Малышев И.Ю., Манухина Е.Б. Стресс, адаптация и оксид азота // Биохимия. – 1998. – 63. – С.992–1006.
15. Манухина Е.Б, Малышев И.Ю. Роль оксида азота в сердечно-сосудистой патологии: взгляд патофизиолога // Рос. кардиол. журн. – 2000. – 5. – С.55–63.
16. Менщикова Е.Б., Зенков Н.К., Реутов В.П. Оксид азота и NO-синтазы в организме млекопитающих при различных состояниях // Биохимия. – 2000. – 65. – № 4. – 485–503.
17. Мотавкин П.А., Гельцер Б.И. Клиническая и экспериментальная патофизиология легких. – М.: Наука, 1998. – 336 с.
18. Паливода С.Н, Черепок А.А. Роль оксидативного стресса и нарушения метаболизма оксида азота при гипертонической болезни // Серце і судини. – 2004. – 5 (1). – С.39–44.
19. Патент на корисну модель №23948 Україна. Спосіб оцінки розвитку оксидативного стресу в ішемізованій нижній кінцівці/ Кахановський Е.Ф., Сагач В.Ф. // Бюл. №8, 2007.
20. Савельев В.С., Кошкин В.М. Критическая ишемия нижних конечностей. – М.: Медицина, 1997. – 160 с.
21. Сагач В.Ф., Шиманська Т.В, Надточій С.М. Фактор, який вивільнюється під час реперфузії ішемізованого серця, може бути маркером відкриття мітохондріальної пори// Фізіол. журн. – 2003. – 49, №4. – С.6–12.
22. Саркисов К.Г., Коркушко О.В., Ступина А.С. Дужак Г.В., Лишнева В.Ю. Микроциркуляция и гемореология при старении человека// Проблемы старения и долголетия. – 1998. – 7, №3. – С. 269–278.
23. Соколович А.Г., Соколович Г.Е., Дамбаев Г.Ц. Новые аспекты патогенеза, диагностики и лечения критической ишемии нижних конечностей. – Томск, 2001. – 485 с.
24. Яковлева Л.Н, Савченко Н.П, Стогінчук О.В. Антиоксидантна корекція ендотеліальної дисфункції у хворих на ішемічну хворобу серця// Медицина світу. – 2004. – Додаток. 2. – С. 4.
25. Bredt D.S., Hwang P.M., Glatt C.E., Lowenstein C.L., Reed R.R., Snyder S.H. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase // Nature. – 1991. – 351. – P.714–718.
26. Brookes P.S., Darley-Usmar V.M. Role of calcium and superoxide dismutase in sensitizing mitochondria to peroxynitrite-induced permeability transition // Amer. J. Physiol. Heart Circ.Physiol. – 2004. – 286, №1. – P.H39–H46.
27. Chartrain N.A., Geller D.A., Koty P.P., Sitrin N.F., Nussler A.K., Hoffman E.P., Billiar T.R., Hutchinson N.I., Mudgett J.S. Molecular cloning, structure, and chromosomal localization of the human inducible nitric oxide synthase gene // J. Biol. Chem.. – 1994. – 269. – P. 6765–6772.
28. Chou T.C., Ven M.H., Li C.V., Ding Y.A. Alterations of nitric oxide synthase expression with aging and hypertension in rats // Hypertension. – 1998. – 31, 2. – P.643–648.
29. Heermeier K., Galle J. Oxidative stress mediated apoptosis induced by oxLDL // Kidney Int. – 1999. – 56. – P. 1310–1312.
30. Hunter P., Haworth R., Sousard J. Relationship between configuration, function and permeability in calcium-treated mitochondria // J. Biol. Chem. – 1976. – 251. – P.5069–5077.
31. Ji L.L. Antioxidants and oxidative stress in exercise // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. – 1999. – 222. – P. 283–292.
32. John S., Schmieder R.E. Impaired endothelial function in arterial hypertension and hypercholesterolemia:

- potential mechanisms and differences // J. Hypertens. – 2000. – **18**. – P. 363–374.
33. Kannel W. Prospects for prevention of coronary disease in the elderly // Amer. J. Geriatric Cardiol. – 2002. – **9**, №2. – P. 83–86.
34. Kim J.S., Ohshima S., Peditadakis P., Lemasters J.J. Nitric oxide protects rat hepatocytes against reperfusion injury mediated by the mitochondrial permeability transition // Hepatology. – 2004. – **39**, №6. – P.1533–1543.
35. Kowaltowski A., Castilho R.F., Vercesi A.E. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress // FEBS Lett. – 2001. – **495**. – P.12–15.
36. Kroemer G. Mitochondrial control of apoptosis: an introduction // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2003. – **304**, №3. – P. 433–435.
37. Lyons D., Roy S., Patel M. Impaired nitric oxide-mediated vasodilatation and total body nitric oxide production in healthy old age // Clin.Sci.(Lond). – 1997. – **93**, №6. – P. 519–526.
38. Marzinzig M., Nussler A., Sradler J. Improved methods to measure end products of nitric oxide in biological fluids: nitrite, nitrate, and S-nitrosothiols // Nitric. Oxide. – 1997. – № 1, 2. – P.177–189.
39. Moshage H, Kok B, Huizenga J.R. Nitrite and nitrate determinations in plasma :a critical evaluation // Clin. Chem. – 1995. – **41**, №6, Pt1. – P.892–896.
40. Rosenfield M.E. Inflammation, lipids and free radicals: Lessons learned from the atherogenic process // Semin. Reprod. Endocrinol. – 1999. – **16**. – P. 249–261.
41. Tanaka S, Yashiro A, Nakashima Y. Plasma nitrite/nitrate level is inversely connected with plasma low-density lipoprotein cholesterol level// Clin.Cardiol. – 1997. – **20**, № 4. – P.361–365.
42. Tavaf-Motamen H., Miner T.J., Starnes B.W. Nitric oxide mediates acute injury by modulation of inflammation // J. Surg. Res. – 1998. – **78**, № 2. – P.137–142.
43. Tsikas D. Methods og quantitative analysis of the nitric oxide metabolites nitrite and nitrate in human biological liquids // Free Radic. Res. – 2005. – **39**, № 8. – P.797–815.
44. Vinikka L. Nitric oxide as a challenge of laboratory-clinical chemistry // Scand. J.Clin. Lab.Invwst. – 1996. – **56**, № 7. – P. 577–581.

*Ин-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України,
Київ*

*Матеріал надійшов до
редакції 21.01.2011*