ИЗМЕНЕНИЕ БАЛАНСА МЕЖДУ АКТИВНОСТЬЮ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ, АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТОЙ И СОДЕРЖАНИЕМ ЖЕЛЕЗА У КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ИНФАРКТЕ МИОКАРДА

Л.Д. Хидирова*

Новосибирский государственный медицинский университет. 630091 Новосибирск, Красный проспект, 52

Изменение баланса между активностью перекисного окисления липидов, антиоксидантной защитой и содержанием железа у крыс при экспериментальном инфаркте миокарда

Л.Д. Хидирова*

Новосибирский государственный медицинский университет. 630091 Новосибирск, Красный проспект, 52

Цель. Изучить баланс между интенсивностью перекисного окисления липидов (ПОЛ), антиоксидантной активностью (АОА) крови и распределением железа в плазме крови, лимфе и миокарде у крыс в динамике экспериментального метаболического инфаркта миокарда (ЭМИМ).

Материал и методы. Эксперименты выполнены на 116 крысах-самцах линии Вистар массой 200–220 г. ЭМИМ у крыс вызвали подкожным введением 0,1% раствора адреналина (0,2 мг/100 г массы животного) и верифицировали электрокардиографически и гистологически. Плазменно-лимфатический индекс (ПЛИ) железа рассчитывали как отношение содержания данного микроэлемента в плазме крови к его содержанию в лимфе. Измеряли интенсивность хемилюминесценции (ХМЛ) нейтрофилов крови. Интенсивность ПОЛ оценивали по концентрации в крови малонового диальдегида (МДА), диеновых конъюгатов (ДК) и diketones. В гемолизате эритроцитов определяли активность каталазы и содержание восстановленного глутатиона, в сыворотке крови измеряли активность супероксиддисмутазы (СОД), а общую (суммарную) антиоксидантную активность крови измеряли хемилюминесцентным методом.

Результаты. Выявлены повышение активности нейтрофилов крови у экспериментальных животных, продукции активных форм кислорода, продуктов ПОЛ: МДА, ДК и diketones, а также значительное снижение суммарной антиоксидантной активности (в 2,5–5 раз) и активности каталазы, СОД, содержания восстановленного глутатиона.

Заключение. Нарушение баланса между перекисным окислением липидов и активностью антиоксидантной защиты вызывает повреждение миокарда. В динамике развития ЭМИМ и его восстановительного периода происходит перераспределение железа из плазмы крови в лимфу.

Ключевые слова: инфаркт миокарда, перекисное окисление липидов, антиоксидантная активность крови, содержание железа в плазме крови.

РФК 2010;6(2):216–219

Change in balance between activity of lipid peroxidation, antioxidant system and ferrum content in rats with experimental myocardial infarction

L.D. Hidirova*

Novosibirsk State Medical University. Krasny Prospect 52, Novosibirsk, 630091 Russia

Aim. To study the balance between activity of lipid peroxidation, antioxidant system and ferrum content in blood, lymph and myocardium of rats with experimental myocardial infarction (EMI).

Material and methods. Experimental study included 116 Wistar male rats (200–220 g of body mass). The EMI was caused by subcutaneous adrenaline injection (0.2 mg/100 g of body mass). The EMI was confirmed by electrocardiography and histopathologic data. The plasma/lymph ferrum index was calculated as blood/lymph ferrum content ratio. The neutrophil chemiluminescence analysis was also performed. Intensity of lipid peroxidation was evaluated by levels of malonic dialdehyde, the diene conjugates and diketones. The catalase activity and recovered glutathione was assessed in the erythrocyte hemolysate. Activity of superoxide dismutase was determined in serum; total blood antioxidant activity was assessed by chemoluminescent method.

Results. The neutrophil activity and lipid peroxidation intensity was increased. The total blood antioxidant activity was reduced (in 2.5–5 times) as well as catalase activity and recovered glutathione level.

Conclusion. The balance disorders between lipid peroxidation and antioxidant activity can result in myocardial injury. The ferrum redistribution from serum to lymph is observed in clinical course of myocardial infarction.

Key words: myocardial infarction, lipid peroxidation, blood antioxidant activity, plasma ferrum level.

Rational Pharmacother Cardiol 2010;6(2):216–219

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author): h_ludmila73@mail.ru

В изучении вопросов этиологии и патогенеза инфаркта миокарда (ИМ) с развитием медицинской науки постоянно появляются новые вопросы. Доказано, что такие микроэлементы (МЭ), как железо, медь, цинк, марганец и селен, являясь неотъемлемыми частями самых различных ферментных систем, могут оказывать существенное влияние на течение ИМ. При этом

основной точкой приложения действия МЭ считается их активное влияние на функционирование про- и антиоксидантных систем. Малоизученным остается вопрос об особенностях обмена МЭ, в том числе и железа, при ишемическом повреждении миокарда [1,2].

Цель настоящей работы – проанализировать нарушения баланса между интенсивностью ПОЛ, антиоксидантной активностью и распределением железа в плазме крови, лимфе и миокарде у крыс в динамике экспериментального метаболического инфаркта миокарда (ЭМИМ) [3].

Сведения об авторах:

Хидирова Людмила Даудовна, доцент кафедры биохимии НГМУ

Материал и методы исследования

Эксперименты выполнены на 116 крысах-самцах линии Вистар массой 200–220 г. Содержание, питание, уход за животными и выведение их из эксперимента осуществляли в соответствии с требованиями «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу МЗ СССР от 12.08.1977 г. №755).

ЭМИМ у крыс вызывался подкожным введением 0,1% раствора адреналина (0,2 мг/100 г массы животного) и верифицировался электрокардиографически и гистологически. Изменения на ЭКГ появлялись уже через 24 часа после введения адреналина. Через неделю после ежедневного введения адреналина на ЭКГ отмечалась депрессия сегмента ST и появлялся отрицательный зубец T. Морфологические изменения, начинаясь через сутки после введения адреналина, постепенно нарастали, а уже через неделю было выявлено поражение кардиомиоцитов, которое носило островковый характер, отмечалась частичная потеря поперечно-полосатой исчерченности, то есть появлялись изменения, характерные для метаболического инфаркта миокарда.

После декапитации предварительно наркотизированных эфиром крыс на 1-е, 2-е, 3-и, 7-е, 14-е и 21-е сутки ЭМИМ производился забор крови, сердечной мышцы и лимфы для анализа. Забор лимфы осуществлялся из цистерны Хиля грудного протока, которая пунктировалась с помощью аспирационного насоса после пересечения реберной дуги с m. erector spinae. Лимфа немедленно центрифугировалась при 900 g (3000 об/мин) в течение 10 минут. До момента определения лимфа хранилась при -20°C в морозильной камере. Из желудочков сердца брали сырые навески в 300 мг (с точностью + 10 мг) и высушивали при +105°C в течение 48 часов. В сухих навесках желудочков, в плазме крови и лимфе определяли содержание железа на атомно-абсорбционном спектрофотометре «Unicam-939». Плазменно-лимфатический индекс (ПЛИ) железа рассчитывали как отношение содержания данного микроэлемента в плазме крови к его содержанию в лимфе. В крови измеряли интенсивность хемилюминесценции (ХМЛ) нейтрофилов на биохемилюминиметре «СКИФ-0301 (СКТБ «Наука», Красноярск, Россия) с люминалом (5-амино-2,3-дигидрофталазиндион-1,4) в качестве люминофора. Интенсивность ПОЛ оценивали по концентрации в крови малонового диальдегида (МДА), диеновых конъюгатов (ДК) и дикетонов. В гемолизате эритроцитов определяли активность каталазы и содержание восстановленного глутатиона, в сыворотке крови измеряли активность супероксиддисмутазы (СОД). Кроме того, хемилюминесцентным методом измеряли общую (суммарную) АОА крови [4]. В качестве контроля исполь-

зовали интактных животных.

Статистический анализ результатов был произведен с помощью пакетов программ Statistica 6.0, MS Excel 2003. Выборочные данные проверялись на нормальность распределения по критерию Шапиро-Уилка для применения параметрических методов вариационного анализа с использованием t-критерия Стьюдента. Результаты представлены в виде среднего арифметического + стандартная ошибка среднего ($\bar{x}$), где $\bar{x}$ – количество измерений. Уровень $p < 0,05$ принимался за статистически значимый.

Результаты

Начиная с первых суток развития ЭМИМ обнаруживалось повышение активности нейтрофилов крови у экспериментальных животных, при этом значимо увеличивались и величины количества импульсов на пике ХМЛ, и время достижения максимума ХМЛ-ответа (табл. 1). Соответственно, увеличивалось производство активных форм кислорода (АФК). Результаты исследования интенсивности ПОЛ и АОЗ (табл. 2) показали, что у животных с МИМ уже с первых суток обнаруживалось повышение накопления продуктов ПОЛ: МДА, ДК и дикетонов. Этот процесс нарастал параллельно с увеличением размеров повреждения миокарда. Одновременно на фоне повышенной продукции липоперекисей наблюдалось снижение активности каталазы, СОД, содержания восстановленного глутатиона. Определение суммарной антиоксидантной активности также показало ее значительное (в 2,5–5 раз) снижение, которое держалось вплоть до 21 суток эксперимента (табл. 3).

У экспериментальных животных на всем протяжении ЭМИМ отмечались более высокие показатели уровня железа, плазмы и лимфы (табл. 4).

Эффект ионов железа связывается с его активным влиянием на процессы ПОЛ. Так, при повышении концентрации железа в плазме резко интенсифицируются процессы ПОЛ в самых различных тканях: сердце, печени, селезенке, самой плазме и т.д. Показано, что

Таблица 1. Изменение ХМЛ активности лейкоцитов у крыс в динамике ЭМИМ

Условия опыта	I max (имп/100 Нф\мин)	T max (мин)
Контроль	4,8±0,06	5,3±0,37
ЭМИМ 1-е сут	7,1±0,09*	9,2±0,75*
ЭМИМ 3-е сут	8,4±0,10*	10,18±0,67*
ЭМИМ 7-е сут	12,0±0,11*	11,3±0,78*
ЭМИМ 14-е сут	6,4±0,07	8,8±0,72*

I max - количество импульсов на пике ХМЛ-ответа в минуту на 100 нейтрофилов; T max – время достижения максимума (мин);
* - статистически значимые различия между показателями у крыс с ЭМИМ и у контрольных животных, $p < 0,05$

Таблица 2. Изменение показателей ПОЛ, активности каталазы, концентрации восстановленного глутатиона (GSH) и активности супероксиддисмутазы (СОД) в крови в динамике метаболического инфаркта миокарда ($M \pm m$; $n=10$)

Условия опытов	МДА (Ммоль/л)	ДК (Ед опт. пл./мл)	Дикетоны (мг%)	Каталаза (моль/л/мин)	GSH (мг%)	СОД (усл.ед./л)
Контроль	8,9±0,36	1,2±0,07	0,25±0,03	8,3±0,32	10,6±0,57	4,0±0,32
ЭМИМ 1-е сут	10,2±0,32*	1,3±0,06	0,37±0,04*	5,8±0,13*	4,3±0,35*	3,5±0,30
ЭМИМ 3-и сут	14,3±0,76*	1,5±0,05*	0,48±0,06*	10,2±0,21*	7,1±0,33*	2,9±0,15*
ЭМИМ 14-е сут	14,9±0,54*	1,7±0,06*	0,47±0,05*	6,7±0,32*	6,5±0,31*	3,8±0,17

* – статистически значимые различия от соответствующих показателей у интактных животных, $p < 0,05$; n – число животных на каждом сроке наблюденияТаблица 3. Антиоксидантная активность плазмы крови у крыс в динамике МИМ ($M \pm m$, $n=10$)

Условия эксперимента	Показатели АОА
Контрольные животные	2,58±0,034
ЭМИМ 1-е сут	0,91±0,037*
ЭМИМ 2-е сут	0,88±0,051*
ЭМИМ 3-и сут	0,97±0,003*
ЭМИМ 7-е сут	0,69±0,016*
ЭМИМ 14-е сут	0,50±0,022*

АОА выражено в условных единицах; * – статистически значимые различия показателей у экспериментальных животных от показателя у интактных крыс $p < 0,05$; n – число животных на каждом сроке наблюдения

присутствие железа обязательно во всех системах образования АФК из O_2 (митохондриальной, микросомальной, ксантиноксидазной и др.) и особенно при образовании ОН в реакциях Фентона и Хабера – Вейса.

У крыс Вистар в течение ЭМИМ ПЛИ постоянно снижается (в поздние сроки он в 2-3 раза снижен в сравнении с контролем).

Обсуждение

Как известно, гиперкатехоламинемия – один из основных патогенетических факторов развития как стрессорного, так и ишемического повреждения миокарда [5,6]. При этом одной из основных причин клеточного повреждения считается инициация катехоламинами процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ), обусловленного наработкой АФК [7,8].

Как показали результаты исследования, уже начиная с первых суток развития МИМ обнаруживалось повышение активности нейтрофилов крови у экспериментальных животных. Результаты исследования интенсивности ПОЛ и АОЗ показали, что у животных с МИМ уже с первых суток обнаруживалось повышение накопления продуктов ПОЛ, которое нарастало параллельно с увеличением размеров повреждения миокарда. Вместе с этим наблюдалось снижение активности антиоксидантной системы. Следовательно, нарушался естественный баланс между про- и антиоксидантными системами организма, что является причиной деструктивного действия АФК и как следствие – поражения клеточных мембран. Кроме того, АФК, по-видимому, самостоятельно могут являться индукторами коронарораспазма [9,10]. Замыкается своеобразный порочный круг: повышение концентрации катехоламинов приводит к резкому усилению продукции АФК, активации процессов ПОЛ. Последние, в свою очередь, могут индуцировать коронарораспasm, истощение антиоксидантных факторов, что еще более усугубляет ишемию сердечной мышцы, в конечном итоге опять же приводя к усилению свободнорадикальных процессов в миокарде. Таким образом, активация эндогенных механизмов генерации АФК приводит к напряжению антиоксидантной защиты и развитию так называемого «окислительного стресса», который является важным звеном патогенеза повреждения миокарда [11,12].

Широко известно, что железо способно запускать окислительный стресс, особенно если его уровень по-

Таблица 4. Содержание железа в плазме крови, в лимфе и миокарде у крыс Вистар в динамике ЭМИМ в % к сухому весу вещества ($M \pm m$; $n=7$)

Условия опытов	В плазме крови	В лимфе	ПЛИ железа	В ткани сердца
Контроль	0,42±0,01	0,27±0,02	1,54±0,03	0,0071±0,0005
ЭМИМ 1-е сут	0,30±0,02*	1,0±0,03*	0,33±0,01*	0,0052±0,0001*
ЭМИМ 2-е сут	0,31±0,03*	0,83±0,01*	0,36±0,05*	0,0044±0,0002*
ЭМИМ 3-и сут	0,62±0,05*	0,67±0,04*	1,03±0,02*	0,0033±0,0001*
ЭМИМ 7-е сут	1,54±0,05*	3,91±0,03*	0,39±0,03*	0,0032±0,0001*
ЭМИМ 14-е сут	1,42±0,06*	2,54±0,05*	0,54±0,01*	0,0043±0,0002*
ЭМИМ 21-е сут	1,64±0,05*	2,0±0,02*	0,84±0,04*	0,0036±0,0001*

ПЛИ – плазменно-лимфатический индекс, выражен в условных единицах; статистически значимые различия от соответствующих показателей у интактных животных, $p < 0,05$

вышен. При аутоокислении железо способно инициировать формирование липидных радикалов без образования АКМ. Железо играет важную роль в интенсификации процессов ПОЛ. Кроме того, повышенное содержание железа в среде значительно снижает активность глутатионпероксидазы — одного из основных ферментов-антиоксидантов. Полученные нами результаты подтверждают клинические и экспериментальные данные о повышенном содержании железа как факторе риска развития ИБС и ИМ [13]. Установлено, что существует прямая связь между высоким уровнем сывороточного железа и риском фатального исхода ИМ [14].

При этом не исключается, что отрицательное воздействие повышенного содержания железа при ИМ может не только быть связано с его прооксидантной активностью, но и может обуславливаться некими другими механизмами, природа которых пока не установлена.

Интересно изменение ПЛИ железа у животных в ди-

намике МИМ. Динамика содержания Fe в миокарде у крыс Вистар направлена в сторону снижения концентрации данного МЭ, что, на наш взгляд, является адаптивной реакцией, защищающей миокард от повреждающего действия Fe.

Заключение

Таким образом, длительное введение адреналина экспериментальным животным вызывает активацию кислород-зависимой биоцидности нейтрофилов и усиливает интенсивность перекисного окисления липидов. В свою очередь, нарушение баланса между процессами ПОЛ и активностью антиоксидантной защиты вызывает повреждение миокарда.

В динамике развития МИМ и его восстановительного периода происходит перераспределение железа из плазмы крови в лимфу. Усиление интенсивности ПОЛ связано с повышением содержания железа в плазме крови.

Литература

1. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике. Минск: Беларусь; 2000.
2. Aukrust P, Berge R.K., Ueland T. et al. Interaction between chemokines and oxidative stress: possible pathogenic role in acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol* 2001;37(2):485-91.
3. Благодосклонная Я.В., Шляхто Е.В., Красильникова Е.И. Метаболический сердечно-сосудистый синдром. *РМЖ* 2001;9(2):67-71.
4. Маянский Д.Н., редактор. Диагностическая ценность лейкоцитарных тестов: методические рекомендации. Новосибирск, 1995.
5. Ланкин В.З., Тихазе А.К., Беленков Ю.Н. Свободнорадикальные процессы в норме и при заболеваниях сердечно-сосудистой системы. Пособие для врачей. М.: Медицина; 2001.
6. Соколов Е.И. Эмоции, гормоны и атеросклероз. М.: Наука; 1991.
7. Марри Р., Греннер Д., Мейес П., Родуэлл В. Биохимия человека. М.: Мир; 1993.
8. Ambrosio G., Tritto I. How important is oxidative stress in ischemia, reperfusion, and heart failure? *Dialogues Cardiovasc Med* 1998;3(1):25-31.
9. Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньщикова Е.Б. Окислительный стресс. Биохимический и патофизиологический аспекты. М.: МАИК «Наука Интерпериодика»; 2001.
10. Меерсон Ф.З., Малышев И.Ю. Феномен адаптационной стабилизации структур и защита сердца. М.: Наука; 1993.
11. Barandier C., Tanguy S., Pucheu S., et al. Effect of antioxidant trace elements on the response of cardiac tissue to oxidative stress. *Ann N Y Acad Sci.* 1999;874:138-55.
12. Скальный А.В. Химические элементы в физиологии и экологии человека. М.: Оникс; 2004.
13. Balla G., Jacob H.S., Balla J., et al. Ferritin: a cytoprotective antioxidant strategem of endothelium. *J Biol Chem* 1992;267(25):18148-53.
14. Basaga H.S. Biochemical aspects of free radicals. *Biochem Cell Biol* 1990;68(7-8):989-98.

Поступила 09.11.2009
Принята в печать 10.12.2009