

## БІЛКОВІ ФАКТОРИ ФОРМУВАННЯ ОКСИДАТИВНОГО СТАТУСУ І РОЗВИТКУ ПАТОЛОГІЧНОГО СТАНУ У ПАЦІЄНТІВ З АРТЕРІАЛЬНОЮ ГІПЕРТЕНЗІЄЮ

**О. Кучменко\*, Л. Мхітарян, О. Купчинська, І. Євстратова,  
Н. Василичук, О. Матова, М. Мостов'як, Т. Дроботько**

*ДУ «Національний науковий центр «Інститут кардіології  
імені академіка М.Д. Стражеска» НАМН України»  
вул. Народного ополчення, 5, Київ 03680, Україна  
e-mail: kuchmeb@yahoo.com*

Метою даної роботи було дослідити білкові фактори формування оксидативного статусу та розвитку патологічного процесу у пацієнтів з артеріальною гіпертензією (АГ). У дослідження були включені 30 пацієнтів з АГ II стадії (середній вік – 47,4±3,3 року). У пацієнтів з АГ зберігається інтенсифікація процесів вільнорадикального окислення білків, що супроводжується переокисленням ліпопротеїнів низької густини (ЛПНГ), ліпопротеїнів дуже низької густини (ЛПДНГ) і ліпопротеїнів високої густини (ЛПВГ) зі збільшенням їхнього індексу перекисної модифікації й атерогенного потенціалу крові. У пацієнтів з АГ встановлено зростання активності міслопероксидази (МПО), зниження активності лейкоцитарної еластази, параоксонази-1 (ПОН-1), каталази і супероксиддисмутази (СОД). Зміна активності МПО, лейкоцитарної еластази і ПОН-1 може бути використана як предиктор активності запальної реакції за участі нейтрофільних лейкоцитів і прогресування атеросклеротичного процесу, а також для оцінки ефективності лікування. Для оцінки якісного стану ліпопротеїнів (ЛП) крові та ступеня їхньої атерогенності інформативними показниками слід вважати активності ЛП-асоційованих білків-ферментів, а не тільки рівень холестеролу (ХС) у них.

*Ключові слова:* артеріальна гіпертензія, оксидативний статус, параоксоназа-1, міслопероксидаза, лейкоцитарна і макрофагальна еластази.

Згідно з літературними даними, оксидативний статус можна визначити як сукупність прооксидантів і антиоксидантів усіх клітинних компартментів і позаклітинного середовища та їхню якісну і кількісну взаємодію. Часто функціонування про- і антиоксидантних систем клітини розглядають окремо від інших систем. Проте, враховуючи глибоку інтегрованість цих систем у загальний метаболізм клітини, їхнє функціонування неможливо розглядати окремо від інших клітинних систем, що й буде обумовлювати участь систем окислювального статусу в патогенезі багатьох патологічних станів організму [11].

Артеріальна гіпертензія (АГ) у всьому світі залишається однією із найбільш значних проблем через її широку розповсюдженість (більше 40 % дорослого населення України має підвищений артеріальний тиск). Одночасно з цим АГ є важливим фактором ризику розвитку основних серцево-судинних захворювань, у першу чергу – атеросклерозу [12]. Відомо, що в механізмах розвитку АГ важливу роль відіграють системний запальний процес із формуванням оксидативного стресу й ендотеліальної дисфункції [12, 21, 22]. Водночас відомо, що вказані фактори лежать в основі механізмів розвитку атеросклерозу [14, 22]. При оцінці стану ліпідного обміну у пацієнтів з АГ зазвичай беруться до уваги кількісні характеристики ліпопротеїнів (ЛП) і, насамперед, – вміст у них холестеролу (ХС). Ці ж показники використовуються у клінічній практиці для оцінки ефективності лікування,

особливо за включення в комплекс лікування гіполіпідемічних препаратів. Згідно зі сучасними уявленнями, якісна характеристика ЛП, їхні атерогенні або антиатерогенні властивості визначаються зв'язаними з ними білковими молекулами – апопротеїнами і ферментами, активність яких має більш важливе значення порівняно з рівнем самих ЛП у кровотоці або із вмістом ХС у них [3, 16]. Серед білків-ферментів, що асоційовані з ЛП, важливе місце займає параоксоназа-1 (ЕС 3.1.8.1) (ПОН-1), яка визначає антиоксидантні, протизапальні, антитромботичні й антиатерогенні властивості ЛПВГ [3, 18, 20]. З ЛП асоційований також білок-фермент мієлопероксидаза (ЕС 1.11.1.7) (МПО), який вивільнюється з активованих поліморфноядерних лейкоцитів у процесі активації запальної реакції та може обумовлювати окислювальну модифікацію ЛП й інших макромолекул, інактивацію ПОН-1, сприяючи атерогенезу [1, 15, 20].

За умов розвитку запалення і локальних патологічних процесів найбільш активними ферментами, що беруть участь у пошкодженні міжклітинного матриксу, є лейкоцитарна та макрофагальна еластази. Потрапляючи у позаклітинний простір унаслідок активації поліморфноядерних лейкоцитів, вона розщеплює майже всі компоненти позаклітинного матриксу, еластинові й колагенові волокна базальних мембран, а також білки плазми крові, виступаючи, таким чином, і як регулятор запалення [6, 9, 17]. Основним субстратом макрофагальної еластази (матриксної металопротеїнази-12, ММП-12) є еластин, проте цей фермент також може брати участь у деградації широкого спектра білків міжклітинного матриксу. Крім того, ММП-12 здатна активувати інші ММП, зокрема ММП-2 і ММП-3, підсилюючи, таким чином, каскад протеолітичних реакцій [5, 6, 9].

У зв'язку з вищезазначеним метою нашої роботи було дослідити білкові фактори формування оксидативного статусу та розвитку патологічного процесу у пацієнтів з артеріальною гіпертензією.

#### Матеріали і методи

У дослідження були включені 30 пацієнтів з АГ II стадії (середній вік – 47,4±3,3 років). Контрольну групу становили 15 практично здорових донорів (середній вік – 49,2±2,1 років). Всім обстеженим проводили комплекс необхідних загальноклінічних і функціональних методів дослідження. Пацієнти отримували базисну терапію згідно з Рекомендаціями Європейського товариства кардіологів і Асоціації кардіологів України.

Вміст карбонільних продуктів вільнорадикального окислення білків (1,4-динітрофенілгідразонів (1,4-ДНФГ)) (КПВОб) у сироватці крові, сумарній фракції ЛПНГ та ЛПДНГ, фракції ЛПВГ визначали спектрофотометрично за методом Дубініної [2]. Вміст продуктів перекисного окислення ліпідів – ТБК-позитивних продуктів (ТБКПП) у сироватці крові визначали спектрофотометрично за методом Стальної [10]. Індекс перекисної модифікації атерогенних ліпопротеїнів (ЛПМАЛП) визначали спектрофотометрично за методом Євстратова [8]. Активність антиоксидантних ферментів каталази та супероксиддисмутази (СОД) у сироватці крові визначали спектрофотометрично і спектрофлюориметрично за методами Королюка і Misra, відповідно [4 і 19]. Арилестеразну активність ПОН-1 у сироватці крові визначали спектрофотометрично за методом Manolescu [18]. Активність МПО у плазмі крові визначали спектрофотометрично за методом Горудко [1]. Активність протеолітичних ферментів – лейкоцитарної та макрофагальної еластаз у сироватці крові визначали спектрофотометрично за методом Кубишкіна [7]. В сироватці крові вимірювали величини показників ліпідного обміну, зокрема вміст загального ХС, тригліцеридів (ТГ), ХС-ЛПНГ і ХС-ЛПВГ з використанням тест-систем. Результати дослідження оброблені за допомогою методів математичної статистики, критерієм вірогідності розходжень вважалось ( $P \leq 0,05$ ).

### Результати і їхнє обговорення

Проведені дослідження показали, що у пацієнтів з АГ спостерігається значне зменшення арилестеразної активності ПОН-1 на 65 % порівняно з контрольною групою (табл. 1). Гідролізуючи пероксили ліпідів, ПОН-1 сприяє елімінації окислених ЛПНГ, інгібуванню біосинтезу ХС і стимуляції ЛПВГ-опосередкованого виходу ХС із макрофагів, перешкоджаючи акумуляції ХС і окистеролів у клітинах. Крім того, ПОН-1 захищає власне самі ЛПВГ від надмірної ліпідної пероксидації [3, 18]. Зменшення арилестеразної активності ПОН-1 відбувається на фоні зростання вмісту продуктів перекисного окислення ліпідів, зокрема ТБКПП у сироватці крові на 22 % порівняно з контролем (табл. 1). Разом з цим у пацієнтів спостерігається більш виражена активація процесів вільнорадикального окислення білкових молекул, про що свідчить зростання КПВОБ у сироватці крові на 35 % порівняно з контролем. Привертає увагу зростання вмісту цих продуктів також у фракціях ЛПНГ+ЛПДНГ і ЛПВГ відповідно на 47 % і 91 % порівняно з контролем (табл. 1), що може свідчити про їх переокислений стан. Ці зміни разом із накопиченням в ЛП ТБКПП є основою підвищеного атерогенного потенціалу крові. Вказані зміни відбуваються на фоні зменшення активності ферментної ланки антиоксидантної системи захисту. Так, активність СОД і каталази в сироватці крові пацієнтів з АГ зменшується відповідно на 14 % і 46 % порівняно з контролем (табл. 1). Встановлені зміни відображають загальну реакцію організму пацієнтів і вказують на формування окислювального стресу за участі як ліпідних, так і білкових компонентів, та пригнічення механізмів антиоксидантного захисту.

У обстежених пацієнтів з АГ відмічається зростання активності МПО на 45 % порівняно з контролем (табл. 1). На сьогодні зібрано багато доказів важливої ролі лейкоцитів у процесі ураження судин. Зокрема, припускають, що активація лейкоцитів може слугувати альтернативним фактором ризику розвитку атеросклерозу [14, 15]. Продемонстроване зростання активності МПО у пацієнтів з АГ вказує на наявність запальної реакції. У циркуляції МПО може утворювати комплекс з ЛПВГ-асоційованим ферментом ПОН-1. ПОН-1 частково інгібує активність МПО, тоді як остання здатна інактивувати ПОН-1, окислюючи залишок тирозину-71, що призводить до порушення зв'язку молекули ферменту з ЛПВГ. В результаті активації МПО утворюється низка АФК, що може призводити до пошкодження макромолекул, ЛП тощо. У разі зв'язування МПО з ендотелієм і її активації можливе локальне загострення запалення судин [13, 20].

У результаті проведених досліджень встановлено зменшення активності лейкоцитарної еластази та ММП-12 в сироватці крові пацієнтів відповідно на 33 % і 13 % порівняно з контрольною групою осіб. Зниження активності лейкоцитарної еластази у пацієнтів з АГ II стадії узгоджується з даними інших авторів і може бути обумовлене виснаженням можливостей її вивільнення та/або синтезу, беручи до уваги значну її роль у формуванні патологічного процесу на стадії прегіпертензії [9].

Із наведених у табл. 2 даних видно, що показники ліпідного обміну в крові пацієнтів з АГ достовірно не відрізняються від таких у контрольній групі, за винятком вмісту ТГ та ХС-ЛПНГ, які, відповідно, на 29 % і 28 % перевищують контрольну величину.

Слід відмітити, що незважаючи на відносно нормальні значення кількісних характеристик показників ліпідів, у пацієнтів з АГ зберігається активація вільнорадикальних окислювальних реакцій, на що вказують достовірно високі порівняно з контролем рівні продуктів окислення ліпідів і білків у сироватці крові та фракціях ЛП. Нижчими за контрольний рівень залишаються активність каталази і СОД, що вказує на наявність дисбалансу між про- і антиокислювальними системами. Привертає увагу достовірно вища

за контроль на 37 % величина ПМАЛП через накопичення в них продуктів переокислення ліпідів і білків (табл. 1). Аналогічні якісні зміни відбуваються також в ЛПВГ, вміст у яких продуктів окиснення білків є вищим на 91 % порівняно з контрольною групою. Це може бути обумовлено пригніченням активності ПОН-1, що відповідальна за захист ЛПВГ, і одночасним зростанням активності МПО, що спрямована на переокислення ЛП та інших макромолекул, які беруть участь у процесах атерогенезу і прогресуванні патологічного процесу за атерогенезу.

Таблиця 1

Вміст продуктів вільнорадикального окислення білків, ліпідів,  
активність ПОН-1, каталази, СОД, МПО і еластаз у пацієнтів з АГ (M±m)

Показник	Контрольна група (практично здорові особи), n=15	Пацієнти з АГ, n=30
Активність параоксонази-1, кU/л	5.66 ± 0.93	1.99 ± 0.21*
ТБК-позитивні продукти, Од./л	9.11 ± 0.21	11.15 ± 0.09*
Активність каталази, Од./л	12.5 ± 2.50	6.80 ± 0.35*
Активність супероксиддисмутази, Од./л	1906 ± 117	1642 ± 71*
Продукти вільнорадикального окислення білків (1,4-ДНФГ) в сироватці крові, ум.од./мл	4.13 ± 0.16	5.59 ± 0.70*
Продукти вільнорадикального окислення білків (1,4-ДНФГ) в ЛПНГ+ЛПДНГ, ум.од./мг ліпідів	0.57 ± 0.05	0.84 ± 0.04*
Продукти вільнорадикального окислення білків в ЛПВГ, ум.од./мл	1.82 ± 0.07	3.48 ± 0.32*
Індекс перекисної модифікації атерогенних ліпопротеїнів, ум.од./мг ліпідів	2.41 ± 1.10	3.31 ± 0.16*
Активність мієлопероксидази, ум.од./хв.	0.00242 ± 0.0005	0.00350 ± 0.0005*
Активність лейкоцитарної еластази, нмоль/мл за хв	0,49 ± 0,07	0,33 ± 0,02*
Активність макрофагальної еластази, нмоль/мл за хв	0,15 ± 0,03	0,13 ± 0,01

**Примітка.** \* - P ≤ 0,05 щодо контролю.

Таблиця 2

Показники ліпідного обміну в крові пацієнтів з АГ (M±m)

Показник	Контрольна група (практично здорові особи), n=15	Пацієнти з АГ, n=30
Холестерол, мкмоль/л	4.45 ± 0.15	4.93 ± 0.36
Тригліцериди, мкмоль/л	1.45 ± 0.17	1.88 ± 0.13*
ХС ЛПВГ, мкмоль/л	1.12 ± 0.09	1.22 ± 0.08
ХС ЛПНГ, мкмоль/л	2.10 ± 0.19	2.70 ± 0.21*
Коефіцієнт атерогенності	2.70 ± 0.35	2.88 ± 0.29

**Примітка.** \* - P ≤ 0,05 щодо контролю.

**Висновки.** У пацієнтів з АГ II стадії зберігається інтенсифікація процесів вільнорадикального окислення білків, що супроводжується переокисленням ЛПНГ, ЛПДНГ і ЛПВГ зі збільшенням їх ПМАЛП і атерогенного потенціалу крові. Крім того, у цих пацієнтів встановлено зростання активності МПО на фоні зниження активності антиоксидантних ферментів – ПОН-1, каталази і СОД. Зміна активності ПОН-1, МПО і лейкоцитарної еластази може бути використана як предиктор активності запальної реакції за участі нейтрофільних лейкоцитів і атеросклеротичного процесу, а також для оцінки ефективності лікування. На нашу думку, для оцінки якісного стану ЛП крові та ступеня їх атерогенності інформативними показниками слід вважати активності ЛП-

асоційованих білків-ферментів, а не тільки рівень ХС у них. Продемонстровані в даній роботі зміни якісного стану ЛП крові можуть лежати в основі розвитку та прогресування атеросклеротичного процесу у пацієнтів з АГ.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Горудко И.В., Костевич В.А., Соколов А.В. и др. Повышенная активность миелопероксидазы – фактор риска ишемической болезни сердца у больных сахарным диабетом // Биомед. химия. 2012. Т.58. Вып. 4. С. 475–484.
2. Дубинина Е.Е., Бурмистров С.О., Ходов Д.А. Окислительная модификация белков крови человека: метод определения // Вопросы мед. химии. 1995. Т. 41. С. 24–26.
3. Коваленко В.М., Кучменко О.Б., Мхітарян Л.С. Молекулярно-генетичні особливості функціонування параоксонази та її значення в розвитку серцево-судинної патології // Укр. кардіол. журнал. 2014. № 5. С. 105–116.
4. Королюк М.А., Иванова М.И. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело. 1988. № 1. С.16–18.
5. Кубышкин А.В., Фомочкина И.И. Эластолитическая активность бронхоальвеолярного лаважа при моделировании воспалительного процесса в легких // Укр. біохім. журнал. 2008. Т.80. №1. С. 89–95.
6. Олемтцева Е.В. Изменение компонентов межклеточного матрикса при гипертонической болезни у беременных и небеременных женщин // Всерос. междисциплин. мед. журнал. 2013. №4. С. 16–19.
7. Патент №28914, Україна. Спосіб визначення активності макрофагальної еластази / Кубишкін А.В., Пальона Ю.В., Фомочкина І.І. Бюл. № 1. 2006.
8. Патент №30972А, Україна. Спосіб діагностики прогресуючого атеросклерозу / Євстратова І.Н., Мхітарян Л.С. та ін. Бюл. №2. 2000.
9. Самохина Л.М., Коваль С.Н., Снегурская И.А. и др. Активность эластаз и эластазоингибиторная активность  $\alpha$ -1-ингибитора протеиназ в сыворотке крови при гипертонической болезни с учетом нарушений обмена пуринов // Вісник проблем біології і медицини. 2011. Вип. 4. С. 142–144.
10. Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты // Современные методы в биохимии / под ред. В.Н. Ореховича. М.: Медицина, 1977. С. 66–68.
11. Burton G.J., Jauniaux E. Oxidative stress // Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol. 2010. Vol. 25. № 3. P. 287-299.
12. Dinh Q.N., Drummond G.R., Sobey C.G., Chrissobolis S. Roles of inflammation, oxidative stress, and vascular dysfunction in hypertension // Biomed. Res. Int. 2014; 2014:406960. doi: 10.1155/2014/406960.
13. Huang Y., Wu Zh., Riwanto M. et al. Myeloperoxidase, paraoxonase-1, and HDL form a functional ternary complex // J. Clin. Invest. 2013. Vol. 123. № 9. P. 3815–3828.
14. Libby P. Fanning the flames: inflammation in cardiovascular diseases // Cardiovascular Research. 2015. Vol. 107. P. 307–309.
15. Loria V., Dato I., Graziani F., Biasucci L.M. Myeloperoxidase: a new biomarker of inflammation in ischemic heart disease and acute coronary syndromes // Mediators Inflamm. 2008; 2008:135625. doi: 10.1155/2008/135625.
16. Mangge H. Beyond cholesterol – new cardiovascular biomarkers // Nestle Nutr. Inst. Workshop Ser. 2016. Vol. 84. P. 81–88.

17. Mangold A., Alias S., Scherz T. et al. Coronary neutrophil extracellular trap burden and deoxyribonuclease activity in ST-elevation acute coronary syndrome are predictors of ST-segment resolution and infarct size // *Circ. Res.* 2015. Vol. 116. № 7. P. 1182–1192.
18. Manolescu B.N., Berteanu M., Cinteza D. Effect of the nutritional supplement ALAnerv® on the serum PON1 activity in post-acute stroke patients // *Pharmacological Reports.* 2013. Vol. 65. P. 743–750.
19. Misra H.P., Fridovich I. Role of Superoxide anion in the autooxidation of epinephrine. A simple assay for superoxide dismutase // *J. Biol. Chem.* 1972. Vol. 247. № 10. P. 3170–3175.
20. Razavi A.E., Basati G., Varshosaz J., Abdi S. Association between HDL particles size and myeloperoxidase/paraoxonase-1 (MPO/PON1) ratio in patients with acute coronary syndrome // *Acta Medica Iranica.* 2013. Vol. 51. № 6. P. 365–371.
21. Sinha N., Dadla P.K. Oxidative stress and antioxidant in hypertension – a current review // *Curr. Hypertens. Rev.* 2015. Vol. 1. № 2. P. 132–142.
22. Solak Y., Afsar B., Vaziri N.D., Aslan G. Hypertension as an autoimmune and inflammatory disease // *Hypertens Res.* 2016. Apr 7. doi: 10.1038/hr.2016.35.

*Стаття: надійшла до редакції 28.07.16  
доопрацьована 6.09.16  
прийнята до друку 7.09.16*

## PROTEIN FACTORS OF OXIDATIVE STATUS AND DEVELOPMENT OF PATHOLOGICAL STATE IN PATIENTS WITH ARTERIAL HYPERTENSION

**O. Kuchmenko, L. Mkhitarian, O. Kupchynska, I. Ievstratova,  
N. Vasylynychuk, O. Matova, M. Mostovyak, T. Drobotko**

*National Scientific Centre «M.D. Strazhesko Institute of Cardiology»  
NAMS of Ukraine  
5, Narodnoho Opolchennia St., Kyiv 03680, Ukraine  
e-mail: kuchmeh@yahoo.com*

The aim of this study was to evaluate the protein factors of oxidative status and development of pathological state in patients with arterial hypertension (AH). The study included 30 patients (mean age of 47.4±3.3 years) with AH 2 grade. The accumulation of carbonyl oxidation protein products in blood, HDL and LDL eventually results in oxidative modification of HDL and LDL, and loss of its qualitative properties. Increase of myeloperoxidase activity, decrease of leukocyte elastase, paraoxonase-1, catalase and superoxide-dismutase activity were observed in patients with AH. Changes of MPO, leukocyte elastase and PON1 activity may serve as a useful marker of intensity of inflammation, progression of atherosclerotic process, and also to evaluate the effectiveness of treatment. The activity of HDL-associated enzymes (PON1 and MPO) is the most informative indicator of qualitative state of HDL, and not the level of HDL-Cholesterol.

*Keywords:* arterial hypertension, atherogenesis, oxidative stress, paraoxonase-1, myeloperoxidase, leukocyte elastase, matrix metalloproteinase-12.



**БЕЛКОВЫЕ ФАКТОРЫ ФОРМИРОВАНИЯ ОКСИДАТИВНОГО СТАТУСА  
И РАЗВИТИЯ ПАТОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ У ПАЦИЕНТОВ  
С АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ**

**Е. Кучменко, Л. Мхитарян, Е. Купчинская, И. Евстратова,  
Н. Василичук, Е. Матова, М. Мостовьяк, Т. Дроботько**

*ГУ «Национальный научный центр  
«Институт кардиологии им. акад. М.Д. Стражеска» НАМН Украины»  
ул. Народного ополчения, 5, Киев 03680, Украина  
e-mail: kuchmeb@yahoo.com*

Целью данной работы было изучение белковых факторов формирования оксидативного статуса и развития патологического процесса у пациентов с артериальной гипертензией. В исследование были включены 30 пациентов с АГ II стадии (средний возраст –  $47,4 \pm 3,3$  лет). У пациентов с АГ сохраняется интенсификация процессов свободнорадикального окисления белков, что сопровождается переокислением ЛПНП, ЛПОНП и ЛПВП с увеличением индекса их перекисной модификации и атерогенного потенциала крови. У пациентов с АГ установлено возрастание активности МПО, снижение активности лейкоцитарной эластазы, ПОН-1, каталазы и СОД. Изменение активности МПО, лейкоцитарной эластазы и ПОН-1 может быть использовано в качестве предиктора активности воспалительной реакции с участием нейтрофильных лейкоцитов и прогрессирования атеросклеротического процесса, а также для оценки эффективности лечения. Для оценки качественного состояния ЛП крови и степени их атерогенности информативными показателями следует считать активности ЛП-ассоциированных белков-ферментов, а не только уровень ХС в них.

*Ключевые слова:* артериальная гипертензия, атерогенез, оксидативный статус, параоксоназа-1, миелопероксидаза, лейкоцитарная и макрофагальная эластазы.