

ОКСИДАТИВНЫЙ СТРЕСС И ЕГО РАЗНОВИДНОСТИ В ПАТОГЕНЕЗЕ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТОНИИ

Горшунова Н.К.¹, Рахманова О.В.¹

¹ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России, Курск, e-mail: gorsh@kursknet.ru

С целью выяснения патогенетической значимости изменений активности свободнорадикального окисления липидов, белков и нитроперекисей, их сочетаний на фоне артериальной гипертензии у людей разного возраста обследованы 77 больных артериальной гипертензией II стадии – 35 человек среднего и 42 - пожилого возраста; 38 человек среднего и 30 людей пожилого возраста с нормальным уровнем артериального давления. Используются методы иммуноферментного анализа, спектрофотометрии, доплерографии плечевой артерии в пробе с реактивной гиперемией. Полученные результаты обработаны методами описательной статистики и корреляционного анализа. Выявлено достоверное увеличение содержания нитротирозина в плазме крови больных артериальной гипертензией по мере увеличения их календарного возраста. Установлено, что интенсификация процессов общей окислительной активности, малонового диальдегида, усиление окисления нитритов до пероксинитрита и изменения активности пероксидации пептидов служит прямым подтверждением развития проявлений оксидативного стресса при хронической гипертензии с участием его нитрозилирующего и карбонильного компонентов, взаимно потенцирующих выраженность друг друга. Нарастание их интенсивности имело возрастзависимый характер и приводило к развитию повреждений клеточных и тканевых структур. Корреляционным анализом подтверждено, что описанные виды окислительных изменений служат непосредственной причиной формирования эндотелиальной дисфункции на фоне артериальной гипертензии, имеют возрастассоциированный характер.

Ключевые слова: артериальная гипертензия, эндотелиальная дисфункция, общая окислительная активность, карбонильный стресс, нитрозилирующий стресс.

OXIDATIVE STRESS AND ITS VARIATIONS IN THE PATHOGENESIS OF ARTERIAL HYPERTENSION

Gorshunova N.K.¹, Rakhmanova O.V.¹

¹Kursk State Medical University, Kursk, e-mail: gorsh@kursknet.ru

In order to elucidate the pathogenetic significance of the changes in the activity of free radical oxidation of lipids, proteins and nitroperoxides, their combinations due to arterial hypertension in patients of different ages, 77 patients with arterial hypertension II stage were examined: 35 patients middle age and 42 elderly, 38 middle and 30 elderly people with a normal blood pressure level. Methods of enzyme immunoassay, spectrophotometry, dopplerography of the brachial artery in a test with reactive hyperemia were used. The obtained results are processed by the methods of descriptive statistics and correlation analysis. A significant increase in the content of nitrotyrosine in the blood plasma of patients with hypertension was revealed as their calendar age increased. It was found that the intensification of the general oxidative activity, malonic dialdehyde, the enhancement of the nitrites oxidation to peroxy nitrite, and the change in the activity of peptide peroxidation are direct confirmation of the oxidative stress development in chronic hypertension involving its nitrosylating and carbonyl components mutually potentiating each other. The increase in their intensity was of an age-dependent nature and led to the development of damage to cellular and tissue structures. Correlation analysis confirmed that the described types of oxidative changes are the direct cause of the endothelial dysfunction formation due to hypertension, have an age associated.

Keywords: arterial hypertension, endothelial dysfunction, general oxidative activity, carbonyl stress, nitrosylating stress.

В современной медицинской науке четко определилось значение окислительного (оксидативного) стресса как ключевого патогенетического механизма при заболеваниях, входящих в сердечно-сосудистый континуум. Одно из самых распространенных среди них – артериальная гипертензия - изначально сопровождается активацией ренин-ангиотензиновой и

симпато-адреналовой систем, развитием тканевой гипоксии, приводящих к избыточному образованию активных форм кислорода (АФК) и различных продуктов его метаболизма. Дисбаланс между интенсификацией свободнорадикального окисления, вызываемого АФК, и активностью защитной антиокислительной системы организма называется оксидативным или окислительным стрессом [1]. Его развитие чревато серьезными нарушениями: дезорганизацией клеточных структур, изменениями их функциональной активности. При артериальной гипертензии (АГ) это эндотелиоциты, кардиомиоциты, миофибробласты, фибробласты, а также окружающий их внеклеточный матрикс, модификации которых лежат в основе гипертензивных поражений сосудистой стенки и кардиоваскулярного ремоделирования. Согласно современным представлениям, причинами усиления свободнорадикальных процессов при стрессе являются гиперкатехоламинемия и обусловленная ею тканевая гипоксия.

В окислительно-восстановительных реакциях организма принимают участие все компоненты его метаболизма. В первую очередь АФК вступают в химические реакции с ненасыщенными жирными кислотами, запуская процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ). Активация ПОЛ вызывает альтерацию белков, нуклеиновых кислот, липидных структур клетки. Кроме жирных кислот, АФК окисляют в липопропротеиды низкой плотности (ЛПНП) сыворотки крови и иные субстраты. Стимуляция свободнорадикальных процессов в тканях внутренних органов вызывает усиление генерации в них эндогенных альдегидов и, как следствие этого, возникновение карбонильного стресса. При распаде липопероксидов в окисленных ЛПНП генерируются ненасыщенные альдегиды и малоновый диальдегид (МДА) - один из наиболее распространенных альдегидов, образующихся в результате перекисного окисления арахидоновой, эйкозапентаеновой и докозагексаеновой кислот. В свою очередь они способны образовывать комплексы с аминогруппами лизиновых остатков молекул апо-В-100, что вызывает изменение структуры частиц ЛПНП. Кроме того, МДА индуцирует процесс карбонилирования - образование окисленных модифицированных белков. Среди продуктов перекисидации существенная роль в повреждении клеточных структур и нарушениях их функционирования принадлежит также перекисям азота - нитритам, нитропероксиду и пероксинитриту, обладающему сильным токсическим воздействием на клетки и ткани организма [2; 3]. Дополнительные белковые продукты окисления (AOPP - advanced oxidation protein product) рассматриваются в качестве маркеров выраженности окислительного стресса, повышение их уровня в сыворотке крови сопряжено с развитием возрастассоциированных заболеваний. Следует также подчеркнуть патогенетическую роль карбонильного стресса в формировании клеточных повреждений внутренних органов.

Модифицированные белки - продукты токсического действия свободных радикалов и

активных форм кислорода/азота, которые представляют собой один из мощных элементов клеточной сигнализации. В силу широкой природной распространенности белков и стабильности продуктов их окисления оценка окислительной модификации протеинов считается надежным маркером оксидативного повреждения.

Таким образом, предикторами и непосредственными факторами патогенеза большого числа заболеваний сердечно-сосудистой системы, в том числе АГ, признается интенсификация свободнорадикального окисления всех главных метаболических субстратов – липидов, белков, оксида азота, которая при неэффективности системы антиокислительной защиты превращается в оксидативный стресс с его нитрозилирующим и карбонильным компонентами. При изучении метаболических окислительных механизмов в патогенезе АГ остается много невыясненных и противоречивых вопросов, особенно в отношении сочетанных окислительных изменений. Приведенные аргументы определили **цель настоящего исследования** - выяснить патогенетическую значимость изменений активности свободнорадикального окисления липидов, белков и нитроперекисей, их сочетаний при АГ у больных разного возраста.

Материалы и методы исследования

В исследовании приняли участие 77 больных АГ II стадии, у которых диагностированы такие поражения органов-мишеней, как гипертрофия миокарда левого желудочка и эндотелиальная дисфункция (ЭД) I-IV ст. Среди них 35 пациентов среднего (календарный возраст – $49,3 \pm 1,0$ год) и 42 пожилого возраста (календарный возраст – $64,7 \pm 0,68$ года), длительность течения АГ в средней возрастной группе составила $6,6 \pm 0,87$ года, в пожилой – $14,5 \pm 1,2$ года, которые оформили письменное согласие на участие в работе. Избыточная масса тела и ожирение 1 степени выявлены у 80% больных среднего и 85% пожилого возраста. В группу сравнения были включены 68 человек: 38 среднего возраста ($47,2 \pm 0,68$ года) и 30 пожилых людей ($64,6 \pm 0,7$ года) с нормальным уровнем артериального давления. Диагноз АГ и ее стадия устанавливались в соответствии с рекомендациями рабочей группы по диагностике и лечению Европейского общества по артериальной гипертензии и Европейского общества кардиологов (2016) [4]. Критериями исключения из исследования служили вторичные гипертензии, сахарный диабет, заболевания щитовидной железы, внутренних органов в стадии обострения, хроническая сердечная недостаточность (ХСН), системные заболевания соединительной ткани, анемии, злокачественные новообразования, тяжелые нарушения сердечного ритма.

Всем пациентам проводилось стандартное общеклиническое и лабораторное обследование, физикальные и антропометрические методы. В биохимический комплекс входило определение уровня общего холестерина (ОХС) и липидных фракций крови:

липопротеиды высокой плотности (ЛПВП), липопротеиды низкой плотности (ЛПНП), триглицериды (ТГ). В работе исследовались следующие параметры окислительного метаболизма: общая окислительная активность (ООА), которую оценивали с помощью колориметрического метода определения перекисей в образцах с этилендиаминтетраацетатом (ЭДТА) сыворотки крови набором PerOx, (Германия); уровень малонового диальдегида – показателя выраженности карбонильного стресса измеряли спектрофотометрически с помощью набора «ТБК-Агат» (Россия), продукты окисления белков - методом спектрального анализа модифицированных белков при длине волны 340 нм с помощью набора AOPP Kit Immundiagnostik (Германия), активность оксида азота в сыворотке крови с помощью реактива Грисса. Степень дисфункции эндотелия устанавливали во время доплерографии плечевой артерии с помощью линейного датчика 7,5 МГц ультразвукового аппарата «LOGJQ 7» (Япония). Измерения проводили линейным методом, предложенным D.S. Celermajer и соавт. 1992. Плечевая артерия лоцировалась в продольном сечении на 2-15 см выше локтевого сгиба. Степень дисфункции эндотелия определяли по уровню изменения диаметра сосуда в пробе с реактивной гиперемией. Нормальной признавали степень дилатации плечевой артерии более чем на 10% от исходного диаметра, значение показателя от 9-7,5% расценивали как I степень ЭД, 7,5-3% - как вторую; 3-2% - как третью; меньше 2% или выявление вазоконстрикции - как четвертую степень.

Статистический анализ полученных результатов выполнен на персональном IBM-совместимом компьютере с использованием программ Statistica 10.0, BIOSSTAT, Microsoft Excel. Для проверки формы распределения изучаемых переменных использован тест Шапиро-Уилка. Статистический анализ результатов исследования представлялся как $M \pm m$ (среднее арифметическое, стандартная ошибка средней) для переменных с нормальным распределением. Для сравнения двух независимых групп с нормальным распределением применены параметрический метод обработки - критерий Стьюдента. Для оценки силы связей между различными показателями с нормальным распределением проведен корреляционный анализ с расчетом коэффициента корреляции Пирсона (r).

Результаты и их обсуждение

Процессы свободнорадикального окисления (СРО) считаются общепризнанными патогенетическими факторами развития АГ и эндотелиальной дисфункции. Хроническая гипертензия приводила к активации окислительных реакций в организме, имеющей разную степень выраженности в зависимости от возраста. Результаты липидных и пептидных трансформаций, индуцированных окислительным стрессом, представлены в таблице 1.

Липидные и пептидные трансформации, индуцированные окислительным стрессом, при АГ
у больных разного возраста

Показатели	Возраст пациентов				p
	Средний		Пожилой		
	Нормотенз. n=38	АГ n=35	Нормотенз. n=30	АГ n=42	
	1	2	3	4	
PerOx, мкмоль/л	143,5±15	142,44±18,8	213±17**	224,3±18,06**	p ₁₋₃ =0,003 p ₂₋₄ =0,002
МДА, мкмоль/л	2,6±0,07	3,5±0,1***	4,78±0,1***	4,96±0,07***	p ₁₋₂ =0,0008 p ₁₋₃ =0,0001 p ₂₋₄ =0,0003
ЛПНП, ммоль/л	2,3±0,1	2,5±0,14	2,6±0,13	2,6±0,1	
ЛПВП, ммоль/л	0,7±0,02	0,64±0,02	0,66±0,01	0,72±0,02	
ТГ, ммоль/л	2,2±0,1	2,3±0,15	2,2±0,12	2,6±0,1*	p ₃₋₄ =0,016
ОХС, ммоль/л	5,2±0,1	5,86±0,1**	5,7±0,15	5,86±0,15	
ИМТ, кг/м ²	26,1±0,7	33,1±0,7**	27,5±0,7	31,2±0,7	
АОРР, мкмоль/л	25,5±1,9	27,9±1,75	17,7±1,48**	18,96±1,23***	p ₁₋₃ =0,003 p ₂₋₄ =0,0001

Примечание: * p<0,05; ** - p<0,01; *** p<0,001.

Установлена активация свободнорадикального окисления, носящая возрастзависимый характер. У пожилых больных общая окислительная активность (ОАА) по тесту PerOx в 2 раза превышала аналогичный параметр группы среднего возраста. Об активации окислительных процессов в организме больных АГ свидетельствовал и показатель МДА, который в первую очередь отражает усиление окисления ЛПНП, пероксидные видоизменения их структуры. Модификация указанного параметра также зависела от возраста как у больных АГ, так и нормотензивных лиц. При достижении ими 60 и более лет активность МДА увеличивалась до 4,78±0,1 мкмоль/л по сравнению с нормотензивными обследованными, у которых уровень диальдегида составил 2,6±0,07 мкмоль/л. У больных АГ как среднего, так и пожилого возраста наблюдалось повышение активности данного бифункционального альдегида.

Высокий уровень активности общих окислительных реакций свидетельствовал о том, что АГ – одно из заболеваний, относящихся к окислительной патологии. Старение организма независимо от уровня артериального давления (АД) вносило свой вклад в активацию реакций свободнорадикального окисления, тем самым способствуя повреждениям клеточных и тканевых структур. Среди липидных фракций сыворотки крови (ЛПНП, ЛПВП) у больных АГ и нормотензивных лиц не найдено достоверных изменений, выходящих за пределы

референсных значений, но отмечена тенденция к снижению уровня ЛПВП, а также достоверное повышение концентраций ОХС и ТГ, максимально выраженное у больных пожилого возраста. Начинающиеся изменения липидного метаболизма и повышение ООА, по-видимому, связано с высокой частотой ожирения (1 степени), установленного у 80% больных среднего и 85% пожилого возраста. По результатам проведенного исследования выявлены возрастассоциированные изменения окисления пептидов, выразившиеся в снижении его интенсивности, итогом чего стала более низкая концентрация у больных АГ пожилого возраста по сравнению с аналогичной группой среднего возраста ($p < 0,001$).

К другим высоко реактогенным окислительным субстратам относится газотрансмиттер оксид азота. Его функции многообразны. Кроме регуляции сосудистого тонуса и основного вазодилатирующего эффекта, оксид азота тормозит адгезию и агрегацию тромбоцитов, адгезию лейкоцитов, синтез эндотелина 1, пролиферацию гладкомышечных клеток сосудов, участвует в механизмах апоптоза, оказывает цитопротекторный эффект и вызывает развитие других адаптивных реакций. Дисметаболические сдвиги в цикле оксида азота играют важную роль в патогенезе АГ и могут служить непосредственной причиной её прогрессирования. В реализации оксидативного стресса участвуют и такие продукты нитрозилирования, как диоксид азота, нитрозотиолы и пероксинитрит.

Образование нитротирозина (пероксинитрита) наблюдается в сосудистом русле и тканях миокарда как у здоровых людей, так и у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями. В процессе роста синтеза оксида азота, увеличения активной концентрации его метаболитов и последующего взаимодействия с активными формами кислорода с образованием токсичных нитрозилирующих продуктов развивается нитрозативный (нитрозилирующий) стресс, приводящий к клеточным, тканевым и системным повреждениям. Изменения содержания продуктов нитрозилирования приведены в таблице 2.

Таблица 2

Содержание продуктов нитрозилирования у практически здоровых лиц и у больных АГ среднего и пожилого возраста ($M \pm m$)

Показатели	Нормотензия		АГ		p
	Средний возраст (n=38)	Пожилой возраст (n=30)	Средний возраст (n=35)	Пожилой возраст (n=42)	
	1	2	3	4	
Степень ЭД	0 - 1	1-2	1-2	2-3	
NO, мкмоль/л	2,9±0,15	3,2±0,2	3,2±0,18	3,3±0,15	p ₁₋₂ =0,21 p ₁₋₃ =0,26 p ₂₋₄ = 0,75 p ₃₋₄ =0,57

Нитротирозин, нМ	5,2±0,35	5,9±0,38	6,9±0,49**	7,9±0,38***	p ₁₋₃ =0,0046 p ₂₋₄ =0,0006
---------------------	----------	----------	------------	-------------	--

Примечание: * p<0,05; ** - p<0,01; *** p<0,001.

В проведенном исследовании установлена тенденция к увеличению перекисей оксида азота в плазме крови больных АГ с возрастом. Отсутствие достоверных однозначных изменений уровня нитритов очевидно связано с разной степенью выраженности эндотелиальной дисфункции [5; 6].

В то же время показатель активности нитрозилирования – пероксинитрит достоверно повышался по мере увеличения возраста больных АГ и усиления выраженности эндотелиальной дисфункции. Пероксинитрит анион – один из компонентов реализации окислительного стресса. Он подавляет активность ферментов, участвующих в репликации дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), индуцирует их повреждение и мутации, может непосредственно повреждать ДНК и клеточные мембраны [7].

В развитии клеточных дисфункций при АГ необходимо также учитывать роль биоэффекторов из класса альдегидов, в частности МДА, описанного выше, который индуцирует развитие субклинического воспаления сосудистой стенки. Вследствие бифункциональных возможностей он одновременно участвует в окислении пептидов, входящих в состав аминокислот, ферментов пептидной природы, т.е. в процессе карбонилирования белка.

В современной научной литературе сведения о значении пептидных перекисей в патогенезе клеточных и тканевых повреждений при АГ на фоне старения крайне скудны либо отсутствуют.

В настоящем исследовании установлено нарастание содержания окисленных пептидных продуктов в плазме крови больных АГ по мере увеличения их календарного возраста на фоне их общего снижения по сравнению с аналогичными показателями у нормотензивных лиц. Аналогичная направленность их изменений отмечена и у людей с нормальным уровнем АД. Это связано с сопряжением карбонильного стресса с нитрозилирующим, приведшим к модификациям белковых молекул, изменениям чувствительности их рецепторов и ферментов, ассоциация которых прослеживается при старении, что подтверждено корреляционным анализом между показателями PerOx и AOPP (r= -0,561; p<0,001), МДА и AOPP (r= -0,43; p<0,001) у пожилых; PerOx и AOPP (r= -0,695; p<0,001); МДА и концентрацией оксида азота (r= 0,475; p<0,01) в группе больных АГ среднего возраста. По данным литературы, процесс карбонилирования пептидов длительный и наиболее ярко проявляется при ассоциированных с АГ процессах и ее осложнениях, таких

как хроническая почечная недостаточность (ХПН), ХСН, сахарный диабет, постинфарктное состояние и др. [8].

Выводы

1. Сочетанное действие продуктов свободнорадикального окисления, нитрозилирования и карбонилирования играет важную роль в патогенезе артериальной гипертензии, инициируя повреждения сосудистого эндотелия.
2. Степень клеточных эндотелиальных поражений при артериальной гипертензии зависит от выраженности реакций пероксидации и нитрозилирования.
3. Активация процессов перекисного окисления липидов, нитрозилирования и карбонилирования белков на фоне АГ наиболее выражена у пациентов пожилого возраста, имеет возрастассоциированный характер.

Список литературы

1. Состояние параметров перекисного окисления липидов крови и эластических свойств сосудистой стенки у больных ишемической болезнью сердца на фоне терапии дженерическими статинами / Ю.А. Жилиева [и др.] // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье». - 2013. - № 4. - С. 66-72.
2. Forstermann U., Sessa W.S. Nitric oxide synthases: regulation and function // European Heart Journal, 2012, vol. 33, no. 7, pp. 829-837.
3. Белковый оксидативный стресс при сочетанной респираторно-кардиальной коморбидности / А.Х. Ахминеева [и др.] // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье». – 2015. - № 4. – С. 8-12.
4. Кобалава Ж.Д. Новые европейские рекомендации по артериальной гипертензии: долгожданные ответы и новые вопросы // Артериальная гипертензия. – 2014. – № 1. – С. 19-26.
5. Шишкин А.Н., Лындина М.Л. Эндотелиальная дисфункция и артериальная гипертензия // Арт. гипертензия. - 2008. – Т. 14. - № 4. - С. 315-319.
6. Горшунова Н.К., Мауер С.С. Взаимодействие вазотонических биоэффекторов в патогенезе эндотелиальной дисфункции при артериальной гипертензии на фоне старения // Успехи геронтологии. - 2012. - Т. 25, № 3. - С. 461-467.
7. Рациональная нейропротекция / И.Ф. Беленичев и др. – Донецк: Издатель Заславский А.Ю., 2009. – 262 с.
8. Давыдов В.В., Божков А.И. Карбонильный стресс как неспецифический фактор патогенеза // Журнал НАМН Украины. - 2014. – № 1. - С. 25-34.