

УДК 577.153:612.397.

С. А. Щекатолина¹, М. С. Бычкова¹, С. П. Попович², И. Н. Бараненко¹, У. Байзигель³, А. С. Контуш³¹Одесская государственная академия холода,
ул. Дворянская, 1/3, Одесса, 65026, Украина.²Одесский государственный медицинский университет,
пер. Валиховский, 2, 65026, Украина.³Медицинская клиника университета Эппендорф,
Гамбург, Германия

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ МЕДИ И АСКОРБАТА НА ТЕЧЕНИЕ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ ПЛАЗМЫ

Представлены результаты экспериментальных измерений окисления 150-кратно разбавленной плазмы крови человека *in vitro* при использовании в качестве инициаторов ионов меди. Изучено действие различных концентраций прооксидантов Cu^{2+} и антиоксиданта аскорбата на окисление плазмы. Для объяснения результатов измерений использовано компьютерное моделирование процесса.

Ключевые слова: окисление плазмы, ионы Cu^{2+} , аскорбат, спектрофотометрия, компьютерное моделирование.

Известно, что в человеческом организме в эндотелиальной стенке сосудов образуются склеротические полосы, которые со временем модифицируются и превращаются в бляшки [1, 2]. Последние затем разрастаются в развитые бляшки, ядро которых содержит некротические ткани и различные продукты перекисного окисления липидов (ПОЛ). Разрастание ядра может приводить к двум тяжелым последствиям: 1) замене нормальной эластичной стенки сосуда некротической тканью, легко разрушающейся при стенозе, и 2) к последующей закупорке просвета сосуда, что приводит к развитию инфаркта или инсульта [1—3]. Причиной возникновения склеротических полосок считается накопление окисленных липопротеинов в интиме сосуда [3]. До сих пор не известны точные причины, приводящие к ПОЛ *in vivo*; среди них назывались некоторые ферменты, свободные радикалы, ионы переходных металлов, окислы азота и хлора и др. [3—6]. Изучен, в частности, механизм окисления липопротеинов под действием ионов железа (Fe^{3+}) и меди (Cu^{2+}) *in vitro*. Эти ионы катализируют перекисное окисление липидов липопротеина путем извлечения атома водорода из двойной связи в метиленовой группе полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) [5]. Неустойчивыми продуктами этого процесса являются гидропероксиды липидов, из них образуются разнообразные вторичные продукты, главным образом альдегиды типа 4-гидроксиноненала [5]. Эти альдегиды способны взаимодействовать с белками

типа аполипопротеина В, при этом нарушается распознавание липопротеинов с помощью рецепторов [7]. Окисление липопротеинов подавляется антиоксидантами плазмы, которые, захватывая радикалы, образуют более устойчивые продукты ПОЛ. Учитывая значимость процессов ПОЛ в организме как источника ряда заболеваний или негативных сопутствующих процессов, а также в связи с большими трудностями изучения ПОЛ в организме в “чистом” виде, были разработаны экспериментальные методы изучения ПОЛ *in vitro* [5, 8—15].

Материал и методы исследования

Были изучены результаты спектрофотометрии (СФ) — исследования плазмы крови здоровых доноров. Пробы здоровой донорской крови получены у практически здоровых лиц, прошедших всестороннее обследование перед сдачей крови в университетской клинике Эппендорф (Гамбург, Германия). Так как доноры допускаются к сдаче крови после достаточного жесткого врачебного контроля, исключающего острые и хронические заболевания, данные СФ, полученные при исследовании образцов донорской плазмы, квалифицировались как показатели нормы. Объектом исследования служила поступающая самотёком венозная кровь, во избежание повреждения эритроцитов. Взятие крови из вены осуществлялось путём пункции одной из периферических вен с помощью одноразовых стерильных инъекционных игл. Забор крови осуществлялся натощак (время последнего приёма пищи не менее 9 часов), в утренние часы.

Для приготовления плазмы данным путём отбирали 5 мл крови в контейнер с ЭДТА и немедленно центрифугировали в течение 10 минут при 3000 об./мин при 4 °С. После центрифугирования отбирали плазму крови в объёме 1 мл с помощью специального дозатора и разливали в стерильные сухие пробирки типа эппендорф и сразу же замораживали в низкотемпературной морозильной камере при температуре –80 °С. Образец для измерения отбирался из эппендорфа с помощью дозатора. Кварцевые спектрофотометрические кюветы заполняли исследуемой плазмой в объёме 20 мкл, при этом осуществляли контроль заполнения (недопустимо образование в поле зрения менисков или пузырьков). Плазму разбавляли раствором фосфатного буфера (РФБ) pH = 7,4, содержащего 0,16 М NaCl (2950 мкл), предварительно выдержанного в термостате при 37 °С в течение 15 минут. Раствор РФБ готовили на бидистиллированной деионизированной воде, обработанной при помощи хелатора Chelex 100 ion-exchange resin (Bio-Rad, München, Germany) для удаления ионов переходных металлов. Высокое разбавление плазмы (в 150 раз) необходимо для обеспечения достаточно медленной абсорбции по методике [13]. В качестве окислителя к плазме добавляли 30 мкл водного раствора Cu²⁺.

К плазме добавляли различные концентрации аскорбата (от 1 до 100 мкм) при неизменной концентрации ионов меди Cu²⁺, а также

различные концентрации этих ионов (от 2 до 50 мкМ). Изучали влияние различных концентраций указанных антиоксиданта и окислителя на течение ПОЛ. Затем кювету закрывали крышечкой, которую фиксировали парафиновой пленкой во избежание попадания в кювету пыли или постороннего света и для исключения выпаривания содержимого. Затем образцы инкубировали при 37°C в спектрофотометре (УФ2), оборудованном восемью ячейками с термоконтролем (ATI Unicam, Cambridge, Great Britain). Исследовали поглощение при длине волны 234 нм. Измерения проводили каждые 5 минут в течение 20 часов. Результаты измерений анализировали с помощью программы Vision Software, поставляемой вместе со спектрофотометром.

После измерения кюветы промывали этиловым спиртом и дистиллированной водой не менее 3 раз, после чего обрабатывали ультразвуком в течение 3 минут, высушивали под азотом, после чего кюветы были готовы к измерению очередного образца.

Результаты измерений отображаются на мониторе и накапливаются в памяти компьютера на диске в виде отдельного файла для каждого измерения.

3. Результаты исследования и их анализ

1. Влияние концентрации Cu^{2+} на кинетику накопления конъюгированных диенов.

При изменении концентрации окислителя — Cu^{2+} (рис. 1) от 2 до 50 мкМ наблюдается различная кинетика течения ПОЛ.

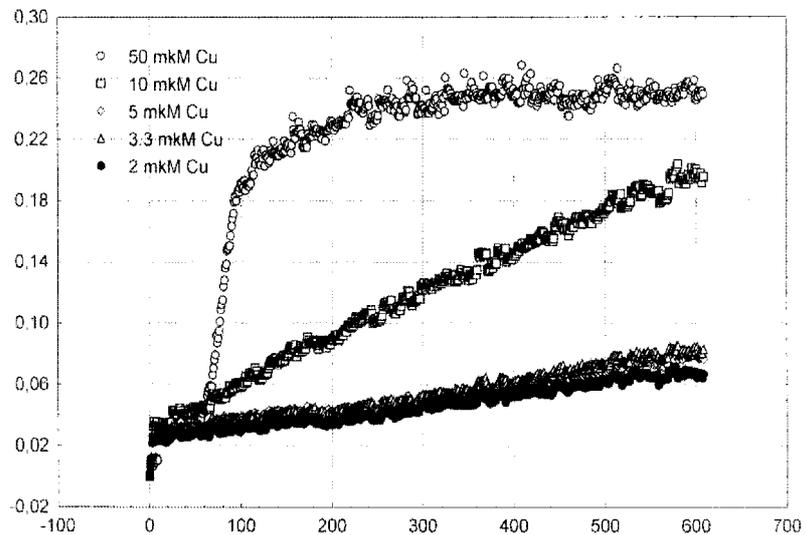


Рис 1. Окисление плазмы при различных концентрациях меди: по оси ординат – плотность раствора (Е) при 234 нм; по горизонтали – время замеров (мин)

Изменяется скорость окисления плазмы. При наименьшей концентрации меди (2 мкМ) процесс ПОЛ значительно замедляется, характерных фаз ПОЛ уже не наблюдается. При увеличении концентрации Cu^{2+} до 50 мкМ отмечали значительное сокращение лаг-фазы — до 50 минут, а также фазы быстрого роста, которая составляла 100 минут.

2. Влияние аскорбата

Аскорбат понижает окисляемость плазмы, создавая, таким образом, дополнительную защиту от окисления.

Серия экспериментов с добавлением к плазме различных концентраций аскорбата (от 1 до 100 мкМ) показала заметное различие в кинетике окисления и длительности характерных фаз окисления (рис. 2). Так, лаг-фаза проб с концентрацией аскорбата 100 мкМ (при $[\text{Cu}^{2+}] = 50 \text{ мкМ}$) составила около 400 минут, а при концентрации аскорбата 10 мкМ — 150 минут.

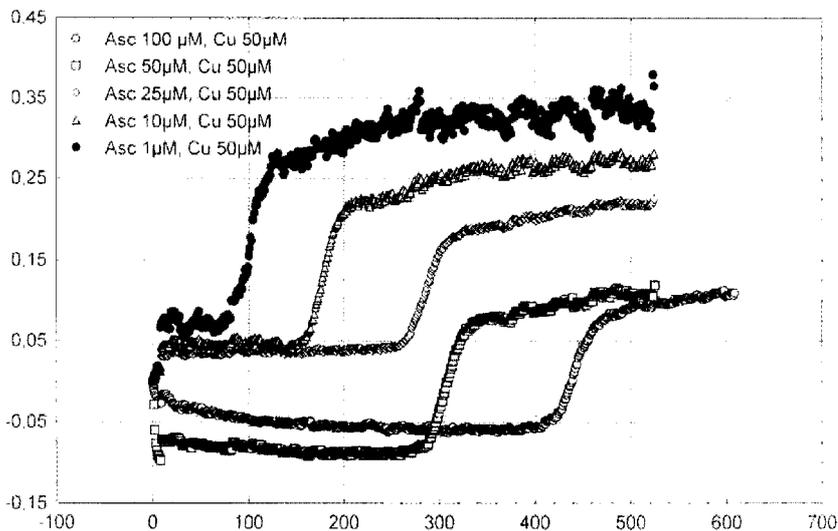


Рис. 2. Окисление плазмы при различных концентрациях аскорбата:
по оси ординат — плотность раствора (E) при 234 нм;
по горизонтали — время замеров (мин)

Для объяснения влияния про- и антиоксидантных соединений на ПОЛ в плазме нами была разработана компьютерная модель этого процесса. Модель учитывает наличие водного и липидного компартментов, а также процессы, происходящие на поверхности липопротеинов, включая адсорбцию ионов Cu^{2+} — инициаторов ПОЛ. Модель включает 56 уравнений химических реакций с участием 28 веществ и позволяет проследить за действием радикалов при окислении ЛПНП плазмы. Расчеты проводили для экспериментальных условий: в 150-кратно разбавленной плазме окисление инициировано 50 мкМ

меди, и система подвержена действию аскорбата в концентрациях, использованных в эксперименте. На рис. 3 приведены кинетические кривые накопления и разрушения основных радикалов: водных (OH_w) и поверхностных (OH_{lip}) гидроксил-радикалов, пергидроксил (HOO)- и пероксил-радикалов (LOO).

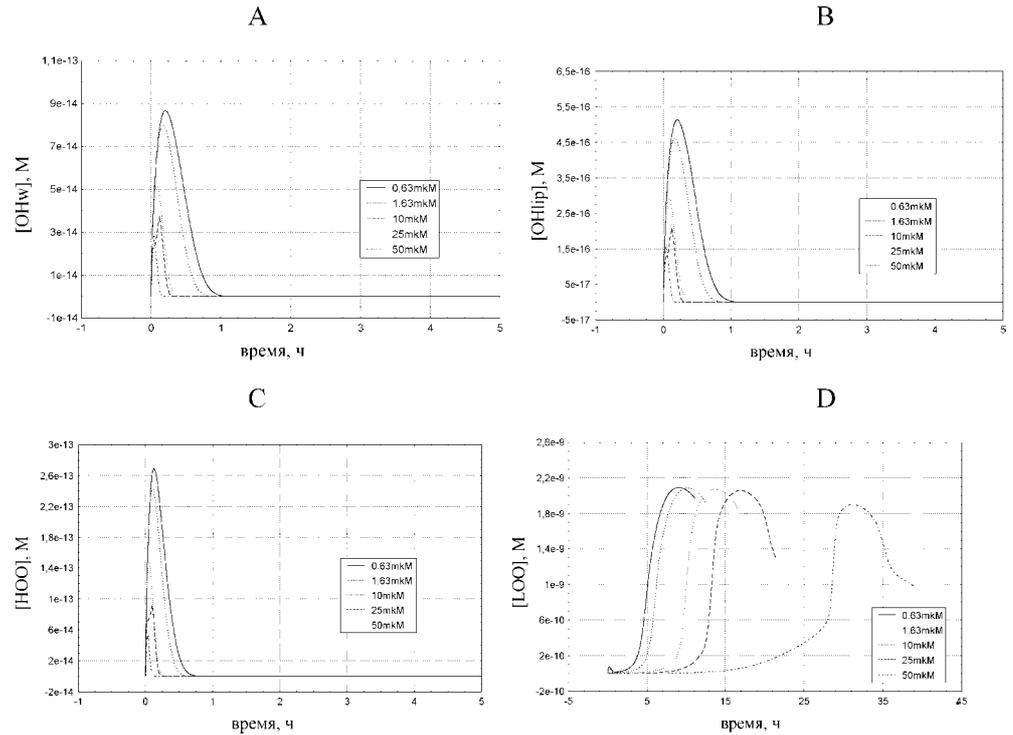


Рис. 3. Результаты модельных расчетов кинетики накопления и разрушения радикалов в 150-кратно разбавленной плазме под действием 50 мкМ меди при различных экспериментальных концентрациях аскорбата

Примечание: А — водные гидроксил-радикалы; В — липидные гидроксил-радикалы; С — пергидроксил-радикалы, D — пероксил-радикалы.

Расчеты показывают, что добавление аскорбата в систему *in vitro* резко уменьшает количество (OH_w) и поверхностных (OH_{lip}) гидроксил-радикалов, пергидроксил (HOO)- и пероксил-радикалов (LOO). Добавление аскорбата в систему резко уменьшает количество OH_w , OH_{lip} и HOO и существенно тормозит образование липидных пероксил-радикалов, не снижая, однако, скорости их накопления *in vitro* в фазе быстрого роста. Это хорошо согласуется с представленными на рис. 2 результатами экспериментов и достаточно полно объясняет их.

Выполненная работа подтверждает очевидные преимущества объединения экспериментального и расчетного методов при исследовании биохимических процессов. Это может быть полезно также и в прак-

тическом отношении, например при определении индивидуальных дозировок антиоксидантов или хелаторов металлов, а также при разработке стратегии лечения.

Литература

1. *Chisolm, G. M., and Steinberg, D.* The oxidative modification hypothesis of atherogenesis an overview // *Free Radical Biology and Medicine*. — 2000. — Vol. 28, № 12. — P. 1815–1826.
2. *Meagher, E. A., and Fitzgerald, G. A.* Indices of Lipid Peroxidation in vivo: Strengths and Limitations in vivo // *Free Radical Biology and Medicine*. — 2000. — Vol. 28, №12. — P. 1745–1750.
3. *Saunders, B.* Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine. — 1980.
4. *Heinecke, J. W.* Oxidants and antioxidants in the pathogenesis of atherosclerosis: implications for the oxidized low density lipoprotein hypothesis // *Curr. Opin. Lipidol.* — 1997. — Vol. 8. — P. 268–274.
5. *Halliwel, B., Gutteridge, J. M.* Free Radicals in Biology and Medicine // Clarendon Press, Oxford. — 1997.
6. *Heinecke, J. W.* Mass spectrometric quantification of amino acid oxidation products in proteins: insights into pathways that promote LDL oxidation in the human artery wall // *The FASEB Journal*. — 1999. — Vol. 13. — P. 1113–1120.
7. *Girotti, A. W.* Lipid hydroperoxide generation, turnover and effect or action in biological systems // *Journal of Lipid Research*. — 1998. — Vol. 39. — P. 1529–1540.
8. *Bowry, V., Stocker, R.* Tocopherol- mediated peroxidation. The prooxidant effect of vitamin E on the radical- initiated oxidation of human low-density lipoprotein // *J. Am. Chem. Soc.* — 1998. — Vol. 115. — P. 6029–6044.
9. *Abuja, P. M., Esterbauer, H.* Simulation of Lipid Peroxidation in Low-Density Lipoprotein by high copper concentrations: evidence for a nonconstant rate of initiation // *Chem. Res. Toxicol.* — 1997. — Vol. 10. — P. 644–651.
10. *Spranger, T., Finckh, B., Fingerhut, R., Kohlschütter, A., Beisiegel, U., Kontush, A.* How different constituents of human plasma and low density lipoprotein determine plasma oxidizability by copper // *Chemistry and Physics of Lipids*. — 1998. — Vol. 91. — P. 39–52.
11. *Karten, B., Beisiegel, U., Gercken, G., Kontush, A.* Mechanisms of lipid peroxidation in human blood plasma: a kinetic approach // *Chemistry and Physics of Lipids*. — 1997. — Vol. 88. — P. 83–96.
12. *Kontush, A., and Beisiegel, U.* Measurement of Oxidizability of Blood Plasma // *Methods in Enzymology*. Academic Press. — 1999. — Vol. 299. — P. 35–49.
13. *Kontush, A., Meyer, S., Finckh, B., Kohlschütter, A., Beisiegel, U.* a-Tocopherol as a reductant for Cu (II) in human lipoproteins // *The Journal of Biological Chemistry*. — 1996. — Vol. 271. — P. 1–7.
14. *Giese, S. P., and Esterbauer, H.* Low Density lipoprotein is saturable by pro-oxidant copper // *FEBS Letters*. — 1994. — Vol. 343. — P. 188–194.
15. *Ziuzenkova, O., Giese, S. P., Ramos, P., and Esterbauer, H.* Factors affecting resistance of low density lipoproteins to oxidation // *Lipids*. — 1996. — Vol. 3. — P. 71–76.

**С. А. Щекатолина, М. С. Бычкова, С. П. Попович, І. Н. Бараненко,
У. Байзігель, А. С. Контущ**

Одеська державна академія холоду,
вул. Дворянська, 1/3, Одеса, 65026, Україна.

Одеський державний медичний університет,
пров. Валіховський, 2, 65026, Україна.

Медична клініка університету Еппендорф,
Гамбург, Німеччина.

ВПЛИВ РІЗНИХ КОНЦЕНТРАЦІЙ МІДІ ТА АСКОРБАТА НА ПЕРЕБІГ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСНЕННЯ ЛІПІДІВ

Резюме

Показані результати експериментальних вимірювань окиснення розведеної 1:150 плазми крові людини *in vitro* при використанні в якості ініціаторів іонів міді. Вивчено дію різних концентрацій прооксидантів міді та антиоксиданта аскорбата на окиснення плазми. Комп'ютерне моделювання процесу використано для пояснення результатів вимірювань.

Ключові слова: окиснення плазми, іони міді, аскорбат, спектрофотометрія, комп'ютерне моделювання.

**S. A. Shcekatolina, M. S. Bychkova, S. P. Popovich, I. N. Baranenko,
U. Beisiegel, A. S. Kontush**

Odessa State Academy of Refrigeration,
st. Dvoryanskaya, 1/3, Odessa, 65026, Ukraine.

Odessa State Medical University,
lane Valikhovsky, 2, Odessa, 65026, Ukraine.

University Medical Clinic of Eppendorf,
Hamburg, Germany.

THE INFLUENCE OF DIFFERENT CUPRUM AND ASCORBATE CONCENTRATIONS ON PLASMA LIPID PEROXIDATION

Summary

The results of experimental measurements of lipid peroxidation are showed for 150-times diluted human blood plasma *in vitro* with using Cu^{2+} ions as initiators.

The action of different concentration of prooxidant (Cu^{2+}) and antioxidant (ascorbate) on plasma oxidation is studied. Simulation of the process is used for explanation of the experimental results.

Key words: plasma oxidation, Cu^{2+} ions, ascorbate, spectrophotometry, simulation.