

В.З. Ланкин, А.К. Тихазе

## ИТОГИ ИЗУЧЕНИЯ ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ПОСЛЕДСТВИЙ НАРУШЕНИЯ РЕГУЛЯЦИИ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ: ТУПИК ИЛИ НОВЫЙ ИМПУЛЬС?

ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Минздрава России, Москва, Россия

*В обзоре приводятся результаты многолетних работ авторов и данные зарубежных исследований, свидетельствующие о важной роли свободнорадикальных процессов в этиологии и патогенезе атеросклероза. Высказана гипотеза о том, что существует единый молекулярный механизм первичных предатерогенных повреждений стенки сосудов при атеросклерозе и диабете, который состоит в усиленном образовании карбонил-модифицированных липопротеидов низкой плотности, накапливающихся в пенистых клетках.*

**Ключевые слова:** свободные радикалы, модифицированные липопротеиды низкой плотности, окислительный стресс, карбонильный стресс, атеросклероз, сахарный диабет

## RESULTS OF THE STUDY OF THE PATHOPHYSIOLOGICAL EFFECTS OF DYSREGULATION OF FREE-RADICAL PROCESSES: DEADLOCK OR A NEW IMPULSE?

V.Z. Lankin, A.K. Tikhaze

Russian Cardiology Research and Production Complex, Moscow, Russia

*The review presents the results of the authors' work of many years and the data of foreign studies, indicating the importance of free radical processes in etiology and pathogenesis of atherosclerosis. The justification of the idea that oxidative stress in atherosclerosis develops more often during disorders of carbohydrate metabolism, contributing to emergence of carbonyl stress in diabetes. It is hypothesized that there is a single molecular mechanism of primary pro-atherogenic injuries of vessel walls in atherosclerosis and diabetes, which enhances the formation of carbonyl-modified low-density lipoproteins, accumulating in the foam cells. The results of recent studies indicate that oxidatively modified LDL involved not only the primary injury to the vessel walls, but also provoked the development of endothelial dysfunction, so that once again raises the issue of the need for the use of antioxidants to prevent injuries in vascular walls. It can be assumed that the result of years of intensive research of free radical process mechanisms in atherosclerosis and diabetes will be the development of new drugs for the combined therapy of these diseases that can be disposed not only reactive oxygen species and organic free radicals and reactive carbonyls, which are clearly playing an important role in the development of pro-atherogenic injuries.*

**Key words:** free radicals, modified low density lipoproteins, oxidative stress, carbonyl stress, atherosclerosis, diabetes

Более пятидесяти лет тому назад Д. Харманом (США) была высказана революционная идея о том, что свободнорадикальные реакции, вызывая повреждения клеточных структур, могут участвовать в механизме старения организма [22]. Практически одновременно Ф. Бернхейм [14] обосновал представление о природных антиоксидантах как о регуляторах свободнорадикальных реакций в тканях, а Н.М. Эмануэль [8] высказал гипотезу о том, что свободные радикалы могут провоцировать возникновение и развитие различных патологических состояний. Эти работы заложили краеугольные камни в фундамент новой научной дисциплины – свободнорадикальной биологии и медицины. Первоначальные представления о неферментативной природе свободнорадикальных процессов в организме, в регуляции которых участвуют низкомолекулярные фенольные антиоксиданты – «ловушки радикалов» (подобные α-токоферолу, восстановленной форме коэнзима Q и полифенолам растительного происхождения), – позднее были дополнены открытием ферментативных реакций, субстратами которых являются свободные радикалы или лабильные продукты свободнорадикального окисления. В частности, благодаря исследованиям

И. Фридовича [19] было установлено, что хорошо известный голубой белок эритроцитов – эритрокупреин – способен катализировать дисмутацию супероксидных анион-радикалов, т. е. является супероксиддисмутазой (СОД). В работах Б.О. Кристоферсена было установлено, что глутатион-пероксидаза обладает широкой субстратной специфичностью и способна восстанавливать не только пероксид водорода, но и разнообразные органические гидропероксиды, включая гидроперокси-производные полиненасыщенных жирных кислот [17]. Позднее нами было показано, что некоторые изоформы глутатион-S-трансферазы могут восстанавливать не только гидропероксиды полиеновых жирных кислот, но и гидроперокси-производные мембранных фосфолипидов [4].

Таким образом, стало очевидно, что регуляция свободнорадикального окисления в организме осуществляется хорошо сбалансированной системой, включающей как неферментные реакции с участием низкомолекулярных «ловушек радикалов», так и процессы с участием ферментов, утилизирующих активные формы кислорода ( $O_2^{\cdot-}$ ,  $HO_2^{\cdot}$ ,  $HO^{\cdot}$  и  $H_2O_2$ ) или предотвращающих их образование, а также с участием ферментов, восстанавливающих лабильные про-

дукты свободнорадикального окисления (такие как липогидропероксиды), которые способны к гомолизу с образованием активных вторичных органических радикалов (типа аоксильных радикалов  $RO\cdot$ ) [25].

Мы впервые предложили называть эти ферменты (СОД, каталаза, глутатион-пероксидаза, глутатион-S-трансфераза) «антиоксидантными ферментами» [2], причем в настоящее время эта терминология широко используется в мировой научной литературе. Следует отметить, что к антиоксидантным ферментам необходимо также отнести сравнительно недавно открытые пероксиредоксины, способные, подобно глутатион-пероксидазе, восстанавливать и пероксид водорода, и различные органические гидропероксиды [36]. Несмотря на то, что с момента первых публикаций Д. Хармана и Н.М. Эмануэля прошло немало времени, их гипотезы не утратили своего значения и получили многочисленные экспериментальные подтверждения.

О наличии первичных продуктов свободнорадикального окисления липидов – липопероксидов – в атеросклеротических бляшках аорты человека впервые было сообщено Й. Главиндом с соавт. в 1952 г. [21]. Следует отметить, что существенным недостатком этой работы было использование неспецифичного метода определения липопероксидов. Несмотря на это долгие годы статья Й. Главинды с соавт. активно цитировалась в качестве экспериментального подтверждения возможного участия свободных радикалов в процессах атеросклеротического повреждения стенки сосудов, однако спустя более 10 лет выводы статьи данной статьи были подвергнуты сомнению группой авторов из лаборатории К. Этте, разработавших чувствительный и высокоспецифичный метод йодометрического титрования с амперометрической регистрацией точки эквивалентности для определения концентрации гидропероксидов в липидных экстрактах тканей [43]. В этой работе при анализе аутопсийного материала с использованием специфичного метода определения не было обнаружено статистически значимых отличий в содержании липопероксидов в непораженных зонах аорты человека и липофиброзных бляшках. К сожалению, в этой работе так же, как и в предыдущей, было изучено небольшое количество аутопсий, причем не было указано время забора материала после наступления смерти, что является чрезвычайно важным ввиду возможности как дополнительного посмертного образования липопероксидов, так и посмертной деструкции этих весьма лабильных соединений. Вследствие этого нами было предпринято уникальное исследование, в котором забор аутопсийного материала после несчастных случаев с летальным исходом осуществлялся в интервале 1–3 часов после наступления смерти (в рамках специальной программы по исследованию атеросклероза, осуществлявшейся в Советском Союзе в 1977–1982 гг.). При использовании специфичного метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) нами было установлено, что содержание липопероксидов (преимущественно 13-гидропероксилинолеата), по сравнению с непораженными зонами стенки сосуда (интима + медиа), статистиче-

ски значимо увеличено в области липидных пятен и еще в большей степени – в области фиброзных бляшек (проанализировано более 20 аутопсий) [29]. Анализ липопероксидов, выделенных из различных зон атеросклеротических повреждений при ВЭЖХ на колонке с хиральной фазой позволил идентифицировать практически равное соотношение R- и S-стериоизомеров 13-гидроперокси-производных линолеата, что свидетельствует о неферментативном происхождении окисленных липидов в стенке сосудов при атеросклерозе [29]. Кроме того, при исследовании этого же материала нами было показано статистически значимое снижение активности ключевых антиоксидантных ферментов (СОД и глутатионпероксидазы) в липидных пятнах и еще в большей степени – в фиброзных бляшках, по сравнению с непораженными зонами аорты [29]. Очевидно, что увеличение образования продуктов свободнорадикального окисления в тканях при одновременном снижении активности систем утилизации этих продуктов можно рассматривать в качестве проявления окислительного стресса [25].

В крови больных атеросклерозом, выявленных при эпидемиологическом обследовании населения г. Москвы в рамках проводившегося в 1976–1980 гг. советско-американского сотрудничества, нами было обнаружено статистически значимое увеличение уровня первичных и вторичных продуктов свободнорадикального окисления липидов при одновременном статистически значимом снижении активности эритроцитарной глутатионпероксидазы [29]. Весьма важно, что контрольную группу в этом исследовании составляли лица из репрезентативной выборки, полученной в рамках проводимого эпидемиологического обследования [29].

В соответствии с нашими данными [29], активность антиоксидантных ферментов (СОД и глутатионпероксидазы) в цитозоле печени кроликов и мини-свиней с алиментарной гиперхолестеринемией была значительно снижена, тогда как содержание липопероксидов в микросомах печени этих же животных было существенно увеличено. Одновременно в печени исследованных животных наблюдали значительное снижение активности микросомальной  $7\alpha$ -гидроксилазы холестерина – ключевого фермента катаболизма холестерина [29]. Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что гиперхолестеринемия, способствуя снижению активности антиоксидантных ферментов в печени, является пусковым фактором свободнорадикального окисления мембранных фосфолипидов, сопровождающегося подавлением мембранносвязанных ферментных систем, ответственных за регуляцию уровня этого стерина по механизму обратной связи. Увеличение жесткости мембран при повышении в них содержания холестерина, по крайней мере частично, может быть компенсировано запуском свободнорадикального окисления мембранных фосфолипидов, поскольку накопление липогидропероксидов и, еще в большей степени, продуктов их восстановления глутатионпероксидазой способствует увеличению жидкости мембраны [5]. Алкоксильные и гидропероксидные

радикалы, образующиеся при свободнорадикальном окислении полиеновых фосфолипидов в липид-белковых комплексах, могут инициировать соокисление холестерина с образованием ряда цитотоксичных продуктов, включая 7 $\alpha$ -гидропероксихолестерин и 7 $\alpha$ -гидрохлестерин, холестерантриол и т. д. [29]. Данные наших экспериментов на кроликах показывают, что оксистерин обладает значительно большим атерогенным действием, чем неокисленный холестерин [41]. Совокупность полученных данных привела нас к выводу о том, что атеросклероз является «свободнорадикальной патологией», т. е. заболеванием, в этиологии и патогенезе которого важную роль играют процессы свободнорадикального окисления [24].

Формирование липидных отложений в магистральных артериях при атеросклерозе связывают с нерегулируемым захватом богатых холестерином липопротеидов низкой плотности (ЛПНП) клетками стенки сосудов (преимущественно макрофагами моноцитарного происхождения), после чего они превращаются в перегруженные липидами «пенистые клетки» и образуют зону липоидоза – первичное предатерогенное повреждение стенки сосуда [29]. В работах лауреатов Нобелевской премии Д.Л. Голдштейна и М.С. Брауна было показано, что химически модифицированные частицы ЛПНП – ацетилированные ЛПНП – захватываются макрофагами более эффективно, чем нативные частицы ЛПНП, поскольку этот процесс осуществляется с участием особых «сквенджер-рецепторов» [16]. Интенсификация перекисного окисления липидов способствует увеличению в плазме крови уровня природного дикарбонила – малонового диальдегида (МДА), – который является вторичным продуктом свободнорадикального окисления полиеновых липидов и образуется при окислительной деструкции первичных продуктов окисления – липогидропероксидов [29]. Было показано, что частицы ЛПНП, модифицированные МДА, поглощаются культивируемыми макрофагами человека более эффективно, чем нативные ЛПНП [18]. Окисленные ЛПНП, как было установлено, являются более атерогенными (более интенсивно захватываются макрофагами), чем неокисленные [39]. Степень окисленности частиц ЛПНП и, соответственно, соотношение первичных и вторичных продуктов свободнорадикального окисления в них могут определять различия в биологических эффектах ЛПНП, включая эффективность их поглощения макрофагами, способность вызывать апоптоз этих клеток, экспрессию молекул адгезии в эндотелиальных клетках и т. п. [15, 40]. В связи с этим отдельные авторы для обозначения степени окисленности ЛПНП предлагают такие термины, как «минимально окисленные» ЛПНП или «экстенсивно окисленные» ЛПНП [15, 40]. Тем не менее, в цитированных работах степень окисленности ЛПНП оценивали достаточно произвольно, без установления четких количественных критериев, что возможно лишь на основании исследования содержания первичных и вторичных продуктов свободнорадикального окисления. При индукции свободнорадикального окисления ЛПНП *in vitro* ионами металлов переменной валентности

(что имитирует процессы, происходящие *in vivo*) сначала образуются первичные продукты окисления – липогидроперокси-производные полиеновых ацилов фосфатидилхолинов наружного фосфолипидного слоя частиц ЛПНП [29]. Тем не менее, ионы металлов одновременно катализируют окислительную деструкцию органических гидропероксидов, сопровождающуюся образованием вторичных продуктов – различных  $\alpha$ ,  $\beta$ -ненасыщенных оксоальдегидов (таких как 4-гидроксиноненаль и 4,5-дигидрокси-деценаль) и в конечном итоге МДА [29]. Процессы сопряженного накопления первичных и вторичных продуктов неизбежно происходят и при любых других способах окисления ЛПНП в условиях *in vitro* и *ex vivo* – при индукции окисления азо-инициаторами, гипогалоидами, пероксидом водорода или органическими гидропероксидами (такими как гидропероксид трет-бутила), гемом- или гемопротеид-содержащими (гемоглобин, пероксидаза хрена, цитохром P-450) системами, а также при инкубации ЛПНП в присутствии различных типов клеток (полиморфноядерные нейтрофилы, эндотелиоциты и др.), генерирующих супероксидные анион-радикалы и другие активные формы кислорода. Очевидно, что аналогичные реакции протекают и *in vivo*, вследствие чего в кровотоке циркулируют ЛПНП различной степени окисленности с разным соотношением первичных и вторичных продуктов окисления, что сильно усложняет оценку роли отдельных продуктов окисления в увеличении атерогенности ЛПНП (т. е. увеличении захвата этих частиц клетками стенки сосудов).

Изменение конформации единственного белка ЛПНП – апопротеина В-100 (апоВ-100) – принципиально может происходить вследствие изменения вязкости его липидного окружения при накоплении полярных ацилгидропероксидов в процессе свободнорадикального перекисного окисления фосфатидилхолинов наружного слоя частиц ЛПНП, как это было продемонстрировано нами при окислении ЛПНП и липосом [1,5]. Кроме того, конформация апоВ-100 может изменяться при химическом взаимодействии альдегидных групп природных дикарбонилов (преимущественно МДА) с  $\epsilon$ -аминогруппами лизиновых остатков молекул этого апопротеина, что сопровождается образованием внутри- и межмолекулярных сшивок (cross links) типа шиффовых оснований [29]. Таким образом, как пространственная ориентация белковой молекулы апоВ, так и/или рецепторные и антигенные свойства белка в зависимости от преобладания первичных либо вторичных продуктов в частицах ЛПНП могут претерпевать значительные изменения. В соответствии с этим, с нашей точки зрения, следует различать собственно окисленные (ацилгидропероксид-содержащие) ЛПНП и ЛПНП, модифицированные природными дикарбонилами. Тем не менее, разделить «окисленные» и «модифицированные» ЛПНП при использовании имеющихся модельных систем свободнорадикального окисления ЛПНП невозможно, поскольку в процессе окисления ЛПНП в модельных системах накопление и первичных, и вторичных продуктов окисления липидов происходит практически одновременно [см. выше].

Существует единственный корректный способ получения собственно «окисленных» (обогащенных ацилгидроперокси-производными фосфатидилхолинов) ЛПНП без существенной примеси вторичных продуктов, основанный на использовании С-15 животной липоксигеназы [29], который был разработан нами для контролируемого окисления биомембран *in vitro* [6]. С-15 животная липоксигеназа может непосредственно окислять полиеновые ацилы в молекулах фосфолипидов и эфиров холестерина без их предварительного гидролиза при физиологических значениях pH, в отличие от С-15 растительной липоксигеназы, способной окислять исключительно свободные полиеновые жирные кислоты в сильно щелочной среде [29]. При окислении свободной арахидоновой кислоты С-15 растительной липоксигеназой (липоксигеназа соевых бобов) образуется 15-гидропероксиарахидонат, а при окислении арахидонат-содержащего фосфатидилхолина или холестериларахидоната С-15 животной липоксигеназой (липоксигеназа ретикулоцитов кролика) образуются соответствующие 15-гидропероксиацил-производные арахидоната [13]. Нами и другими авторами показано, что ЛПНП плазмы крови человека являются хорошим субстратом для окисления С-15 животной липоксигеназой [12, 28], причем при ассоциации с частицами ЛПНП происходят конформационные изменения молекулы фермента, что сопровождается активацией липоксигеназы и увеличением эффективности ферментативного окисления ЛПНП [28]. Исходя из этого, мы использовали возможность корректного получения из одного и того же образца плазмы крови человека как «окисленных» (обогащенных гидроперокси-производными фосфолипидов) ЛПНП при помощи их мягкого ферментативного окисления С-15 животной липоксигеназой, так и «модифицированных» ЛПНП при помощи химической реакции с природным дикарбонилем МДА [31]. Такой подход позволил провести селективное исследование биологического действия ЛПНП, модифицированных либо первичными, либо вторичными продуктами свободнорадикального окисления липидов [31]. Результаты проведенных экспериментов однозначно показали, что «окисленные» (обогащенные липогидропероксидами) частицы ЛПНП поглощаются культивируемыми макрофагами человека с той же эффективностью, что и нативные (неокисленные) ЛПНП, тогда как ЛПНП, модифицированные МДА, весьма активно захватываются макрофагами [31]. Следовательно, атерогенными являются не «окисленные» ЛПНП, а карбонил-модифицированные ЛПНП.

Содержание МДА в крови больных атеросклерозом значительно увеличено [29, 30], причем при исследовании уровня МДА-модифицированных ЛПНП (иммунохимическим методом с помощью тест-наборов фирмы Mercodia, Швеция) в двух независимых репрезентативных выборках населения г. Москвы (Россия) и г. Таллина (Эстония) мы установили, что существует хорошая корреляция ( $r = 0,6$ ;  $p < 0,05$ ) между уровнем холестерина в ЛПНП и содержанием МДА-модифицированных частиц ЛПНП [42]. Исходя из этих данных, можно утверждать, что наиболее

атерогенные (содержащие наиболее высокие уровни холестерина) ЛПНП одновременно являются и наиболее подвергшимися свободнорадикальному окислению. Исходя из этого можно предположить, что именно карбонил-модифицированные ЛПНП способствуют быстрому накоплению холестерина в стенке сосудов, поскольку этот процесс осуществляется при помощи сквенджер-рецепторов. Следовательно, атерогенность ЛПНП может определяться не только (и, вероятно, не столько) уровнем холестерина в них, но и степенью окисленности частиц ЛПНП.

Действительно, содержание липогидропероксидов в ЛПНП больных атеросклерозом без гиперхолестеринемии более чем в 4 раза выше, чем у практически здоровых лиц того же возраста, а у больных с гиперхолестеринемией – более чем в 8 раз выше, чем в контроле [30]. Показательно, что содержание гидроперокси-фосфолипидов в ЛПНП больных сахарным диабетом 2-го типа с выраженными нарушениями углеводного обмена ( $HbA_{1c} = 8,1 \pm 0,03 \%$ ), как установлено нами [30], было эстремально высоким и превышало значения этого показателя, по сравнению с контролем, почти в 25 раз, а по сравнению с таковым у больных атеросклерозом с гиперхолестеринемией – более чем в 3 раза.

Давно известно, что сахарный диабет является фактором риска возникновения и развития атеросклероза, причем наличие сопутствующего диабета значительно ускоряет прогрессирование атеросклероза [23]. Более того, не менее 70 % больных сахарным диабетом погибают от осложнений сердечно-сосудистой системы [23]. В доступной литературе нам не удалось найти исчерпывающего объяснения этим хорошо известным фактам. Тем не менее, на определенные размышления наводит то, что при диабетической гипергликемии имеет место процесс автоокисления глюкозы, при котором усилено образование гомолога МДА – двууглеродного дикарбонила глиоксаля [34]. При фрагментации триозофосфатов, накапливающихся при диабете вследствие активации гликолиза, происходит увеличение содержания другого дикарбонила – метилглиоксаля [30, 34], который является изомером МДА. Поскольку МДА может вызывать атерогенную модификацию ЛПНП, и МДА-модифицированные ЛПНП способны интенсивно захватываться имеющими сквенджер-рецепторы макрофагами [18, 30], нам представлялось вполне оправданным исследовать атерогенные потенции глиоксаля, обладающего большим структурным сходством с МДА. В результате проведенных экспериментов двумя независимыми методами (по накоплению в клетках холестерина ЛПНП или флуоресцентно-меченых ЛПНП) было установлено, что глиоксаль-модифицированные ЛПНП поглощаются культивируемыми макрофагами даже более эффективно, чем МДА-модифицированные [30]. Кроме того, глиоксаль-модифицированные ЛПНП значительно быстрее, чем МДА-модифицированные, элиминировались из кровотока при их введении экспериментальным животным [30].

Глюкоза может подвергаться автоокислению, причем при соокислении с полиеновыми липидами



эта гексоза под действием липидных радикалов способна фрагментироваться с образованием глиоксаля [38]. Внесение глюкозы в среду инкубации при индуцированном окислении ЛПНП или фосфолипидных липосом вызывает интенсификацию свободнорадикального окисления липидов, причем нами установлено, что в процессе соокисления липидов и глюкозы происходит генерирование супероксидного анион-радикала, поскольку добавление СОД в систему окисления резко подавляет процесс липопероксидации [26]. Кроме того, как показано нами, взаимодействие образующегося при окислении глюкозы дикарбонила метилглиоксаля с концевой аминокислотой апопротеина ЛПНП (апоВ-100) – L-лизином – также сопровождается генерированием супероксидного радикала (подтверждено двумя независимыми методами (по восстановлению синего нитротетразолия и по интенсификации хемилюминесценции при контрольном добавлении СОД) [7, 30]. Таким образом, при диабетической гипергликемии создаются дополнительные возможности для образования активных форм кислорода и интенсификации свободнорадикального окисления ЛПНП с их последующей атерогенной карбонильной модификацией.

Проведенные нами исследования показали, что эффективная сахароснижающая терапия больных сахарным диабетом 2-го типа с выраженными нарушениями углеводного обмена, приводящая к нормализации уровня гликированного гемоглобина, сопровождается одновременным значительным снижением повышенных до терапии уровней МДА и гидроперокси-ЛПНП в плазме крови [26]. Таким образом, только подавление гипергликемии дает псевдоантиоксидантный эффект (ингибирование свободнорадикального окисления без использования каких-либо антиоксидантных препаратов). Широко применяемое при диабете лекарственное средство метформин, помимо сахароснижающего действия, должно обладать, как все вещества из класса гидразидов, способностью связывать природные дикарбонилы. Экспериментально доказано, что метформин при терапии больных диабетом активно реагирует с метилглиоксалем, образуя циклическое производное – триазепинон, – которое интенсивно экскретируется с мочой и может быть идентифицировано с помощью масс-спектрометрии [10]. Одновременно установлено, что терапия метформином действительно приводит к существенному снижению уровня метилглиоксаля в крови больных сахарным диабетом [10]. В соответствии с этими данными в нашем исследовании было показано, что метформин значительно более эффективно снижает уровни МДА и гидроперокси-ЛПНП в плазме крови больных сахарным диабетом (в 2,5 и 5 раз соответственно), чем другое сахароснижающее средство из класса производных сульфаниламидов, которое не обладает способностью утилизировать дикарбонилы [26]. Такие сильные различия в псевдоантиоксидантном действии метформина и производных сульфаниламидов не могут быть объяснены различиями в сахароснижающем действии этих препаратов, поскольку уровень гликированного гемоглобина в двух группах по окончании терапии

статистически значимо не отличался [26]. Таким образом, можно предположить, что метформин подавляет радикалообразование в крови больных сахарным диабетом (за счет снижения уровня активных форм кислорода, которые могут образоваться при взаимодействии метилглиоксаля с аминокислотными группами белков) и тем самым способен подавлять дальнейшее развитие окислительного стресса [7].

Одним из факторов, провоцирующих возникновение окислительного стресса при диабете, вероятно, является сниженный уровень активности антиоксидантных ферментов в крови больных [27, 35]. В нашем исследовании в крови у больных сахарным диабетом 2-го типа было выявлено резкое снижение активности СОД и глутатионпероксидазы [27], причем при выраженном нарушении углеводного обмена активность СОД уменьшалась в 2,6 раза, по сравнению с таковой у практически здоровых людей того же возраста [27]. Можно было предположить, что отмеченное многими авторами накопление  $\alpha$ -оксоальдегидов, в частности глиоксаля и метилглиоксаля, в крови больных при диабете [32] приводит к развитию так называемого карбонильного стресса [26, 30]. Низкомолекулярные альдегиды, способные модифицировать белковую часть ЛПНП, вероятно, могут легко проникать через эритроцитарную мембрану и многократно увеличивать уровни химически агрессивных дикарбониллов – глиоксаля и метилглиоксаля – в красных кровяных клетках больных сахарным диабетом, что должно приводить к химической модификации и других протеинов кровотока, таких как эритроцитарные антиоксидантные ферменты. Нами было установлено, что природные  $\alpha$ -оксоальдегиды действительно способны подавлять активность гомогенных препаратов антиоксидантных ферментов – СОД и глутатионпероксидазы, – причем ингибирующее действие глиоксаля и метилглиоксаля было более выражено, чем ингибирующее действие МДА [27]. На основании исследования изменения кинетических параметров ферментов, при действии исследованных дикарбониллов можно полагать, что подавление активности ферментов связано с конформационными изменениями в активном центре их молекул [27]. Инкубация эритроцитов человека в присутствии природных  $\alpha$ -оксоальдегидов также сопровождалась ингибированием активности внутриклеточных СОД и глутатионпероксидазы, которое было существенно большим при добавлении в среду инкубации глиоксаля и метилглиоксаля, нежели чем при добавлении МДА [27]. Эти результаты подтверждают способность быстрого проникновения низкомолекулярных дикарбониллов через достаточно ригидную мембрану эритроцитов, что свидетельствует о возможности реализации ингибирующего действия этих соединений в условиях карбонильного стресса при диабете *in vivo*.

Нормализация уровня гликированного гемоглобина у больных сахарным диабетом 2-го типа при терапии сахароснижающими препаратами в наших исследованиях сопровождалась существенным увеличением активности СОД, причем активность этого фермента возрастала в значительно большей степени при терапии метформином (в 2,6 раза), по сравне-

нию с терапией производными сульфанилмочевины (в 1,4 раза) [27]. Можно полагать, что увеличение активности эритроцитарной СОД в крови больных диабетом в процессе эффективной сахароснижающей терапии непосредственно связано с уменьшением проявлений карбонильного стресса при купировании нарушений углеводного обмена у пациентов, причем при большем увеличении активности СОД при терапии метформином, вероятно, объяснимо усиленной утилизацией метилглиоксала при использовании этого лекарственного препарата [27].

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что подавление гипергликемии у больных диабетом вызывает отчетливый псевдоантиоксидантный эффект и способствует уменьшению характерных для этой патологии проявлений окислительного стресса, заключающихся в ингибировании липопероксидации и увеличении активности антиоксидантных ферментов. Следовательно, дополнительное использование антиоксидантных препаратов при диабете, вероятно, может быть столь же малоэффективным, как и при атеросклерозе [3]. Учитывая тот факт, что значительно большая опасность при атеросклерозе и диабете исходит из последствий развивающегося карбонильного стресса, будущее в комплексной терапии этих заболеваний принадлежит, вероятно, препаратам, способствующим утилизации накапливающихся дикарбониллов. Имеющиеся данные о возможности утилизации высокотоксичных  $\alpha$ -оксоальдегидов с помощью лекарственных средств из класса производных гидразинов [11, 20] открывают перспективы для разработки высокоэффективных препаратов для профилактики и дополнительной терапии атеросклероза и сахарного диабета.

В заключение следует отметить, что результаты недавних исследований свидетельствуют о том, что окислительно модифицированные ЛПНП не только участвуют в первичном повреждении сосудистой стенки, но также провоцируют развитие дисфункции эндотелия [9, 33, 37], вследствие чего вновь поднимается вопрос о необходимости использования антиоксидантов для предотвращения повреждений стенки сосудов [33, 37].

Подводя итоги полувековых интенсивных исследований по механизмам свободнорадикальных процессов при атеросклерозе и сахарном диабете можно надеяться, что в ближайшие годы будут созданы подходы для разработки принципиально новых препаратов для комплексной терапии этих заболеваний, способных утилизировать не только активные формы кислорода и органические свободные радикалы, но и активные формы карбониллов, которые, как становится ясно, играют важную роль в развитии предатерогенных повреждений.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта № 14-15-00245 Российского научного фонда.

#### ЛИТЕРАТУРА REFERENCES

1. Деев А.И., Осис Ю.Г., Формазюк В.Е., Владимиров Ю.А., Ланкин В.З. Увеличение содержания воды в липидной фазе липопroteидов при перекисном

окислении // Биофизика. – 1983. – Т. 28, Вып. 4. – С. 629–631.

Deev AI, Osis YG, Formazyuk VE, Vladimirov YA, Lankin VZ (1983). Increase of the water content in the lipid phase of lipoproteins during peroxidation [Uvelichenie soderzhaniya vody v lipidnoy faze lipoproteidov pri perekisnom okislenii]. *Biofizika*, 28 (4), 629–631.

2. Ланкин В.З. Метаболизм липоперекисей в тканях млекопитающих // Биохимия липидов и их роль в обмене веществ. – М.: Наука, 1981. – С. 75–95.

Lankin VZ (1981). Metabolism of lipoperoxides in animal tissues [Metabolizm lipoperekisey v tkanyakh mlekopitayushchikh]. *Biokhimiya lipidov i ikh rol' v obmene veshchestv*, 75–95.

3. Ланкин В.З., Тихазе А.К., Беленков Ю.Н. Антиоксиданты в комплексной терапии атеросклероза: за и против // Кардиология. – 2004. – Т. 44, № 2. – С. 72–81.

Lankin VZ, Tikhaze AK, Belenkov YN (2004). Antioxidants in complex therapy of atherosclerosis: pro et contra [Antioxidanty v kompleksnoy terapii ateroskleroza: za i protiv]. *Kardiologiya*, 44 (2), 72–81.

4. Ланкин В.З., Тихазе А.К., Осис Ю.Г., Вихерт А.М., Шевер Т., Рапопорт С. Ферментативная регуляция перекисного окисления липидов в биомембранах: роль фосфолипазы A2 и глутатионтрансферазы // Доклады Академии наук СССР. – 1985. – Т. 28, № 1. – С. 204–207.

Lankin VZ, Tikhaze AK, Osis YG, Vikhert AM, Sheve T, Rapoport S (1985). Enzymatic regulation of lipid peroxidation in biomembranes: the role of phospholipase A<sub>2</sub> and glutathione-S-transferase [Fermentativnaya regulatsiya perekisnogo okisleniya lipidov v biomembranakh: rol' fosfolipazy A2 i glutationtransferazy]. *Doklady Akademii nauk SSSR*, 28 (1), 204–207.

5. Ланкин В.З., Тихазе А.К., Осис Ю.Г. Моделирование каскада ферментных реакций в липосомах, включающих последовательное свободнорадикальное окисление, восстановление и гидролиз полиеновых ацилов фосфолипидов для исследования влияния этих процессов на структурно-динамические параметры мембраны // Биохимия. – 2002. – Т. 67, № 5. – С. 679–689.

Lankin VZ, Tikhaze AK, Osis YG (2002). Modeling the cascade of enzymatic reactions in liposomes including successive free-radical peroxidation, reduction and hydrolysis of phospholipid polyenoic acyls for studying the effect of these processes on the structural-dynamic parameters of the membranes [Modelirovanie kaskada fermentnykh reaktsiy v liposomakh, vkluchayushchikh posledovatel'noe svobodnoradikal'noe okislenie, vosstanovlenie i gidroliz polienovykh atsilov fosfolipidov dlya issledovaniya vliyaniya etikh protsessov na strukturno-dinamicheskie parametry membrany]. *Biokhimiya*, 67 (5), 679–689.

6. Осис Ю.Г., Ланкин В.З., Вихерт А.М. Липоксигеназы животных как инструмент для перекисидации фосфолипидов мембран // Доклады Академии наук СССР. – 1984. – Т. 276, № 4. – С. 989–992.

Osis YG, Lankin VZ, Vikhert AM (1984). Animal lipoxygenases as an instrument for the peroxidation of membrane phospholipids [Lipoksigenazy zhivotnykh kak instrument dlya peroksidatsii fosfolipidov membran]. *Doklady Akademii nauk SSSR*, 276 (4), 989–992.

7. Шумаев К.Б., Губкина С.А., Кумскова Е.М., Шепелькова Г.С., Рууге Е.К., Ланкин В.З. Механизм образования супероксидного радикала при взаимодействии L-лизина с дикарбонильными соединениями // Биохимия. – 2009. – Т.74, № 4. – С. 461–466.

Shumaev KB, Gubkina SA, Kumsikova EM, Shepelkova GS, Ruuge EK, Lankin VZ (2009). Superoxide formation as a result of interaction of L-lysine with dicarbonyl [Mekhanizm obrazovaniya superoksidnogo radikala pri vzaimodeystvii L-lizina s dikarbonil'nymi soedineniyami]. *Biokhimiya*, 74 (4), 461-466.

8. Эмануэль Н.М., Липчина Л.П. Лейкоз у мышей и особенности его развития при воздействии ингибиторов цепных окислительных процессов // Доклады Академии наук СССР. – 1958. – Т. 121. № 1. – С. 141–144.

Emanuel NM, Lipchina LP (1958). Leukemia in mice, and especially its development under the influence of inhibitors of chain oxidation processes [Leykoz u myshey i osobennosti ego razvitiya pri vozdeystvii ingibitorov tspeynykh okislitel'nykh protsessov]. *Doklady Akademii nauk SSSR*, 121 (1), 141-144.

9. Apostolov EO, Basnakian AG, Yin X, Ok E, Shah SV (2007). Modified LDLs induce proliferation-mediated death of human vascular endothelial cells through MAPK pathway. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.*, 292 (4), 1836-1846.

10. Beisswenger PJ, Howell SK, Touchette AD, Lal S, Szwergold BS (1999). Metformin reduces systemic methylglyoxal levels in type 2 diabetes. *Diabetes*, 48 (1), 198-202.

11. Belkheiri N, Bouguerne B, Bedos-Belval F, Duran H, Bernis C, Salvayre R, Nègre-Salvayre A, Baltas M. (2010). Synthesis and antioxidant activity evaluation of a syringic hydrazones family. *Eur. J. Med. Chem.*, 45 (7), 3019-3026.

12. Belkner J, Stender H, Kühn H (1997). 15-Lipoxygenase preferentially oxygenates a subfraction of human low density lipoprotein. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 407, 465-469.

13. Belkner J, Wiesner R, Kühn H, Lankin VZ (1991). The oxygenation of cholesterol esters by the reticulocyte lipoxygenase. *FEBS Lett.*, 279 (1), 110-114.

14. Bernheim F (1963). Biochemical implications of pro-oxidants and antioxidants. *Radiation Res.*, 3 (Suppl.), 17-32.

15. Boullier A, Li Y, Quehenberger O, Palinski W, Tabas I, Witztum JL, Miller YI (2006). Minimally oxidized LDL offsets the apoptotic effects of extensively oxidized LDL and free cholesterol in macrophages. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 26 (5), 1169-1176.

16. Brown M, Goldstein J (1990). Atherosclerosis scavenging for receptors. *Nature*, 343 (6258), 508-509.

17. Christophersen BO (1968). Formation of mono-hydroxy-polyenic fatty acids from lipid peroxides by glutathione peroxidase. *Biochim. Biophys. Acta*, 164 (1), 35-46.

18. Fogelman AM, Shechter I, Seager J, Hokom M, Child JS, Edwards PA (1980). Malondialdehyde alteration of low density lipoproteins leads to the cholesteryl ester accumulation in human monocyte macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77 (4), 2214-2218.

19. Fridovich I (1978). The biology of oxygen radicals. *Science*, 201 (4359), 875-903.

20. Galvani S, Coatrieux C, Elbaz M, Grazide MH, Thiers JC, Parini A, Uchida K, Kamar N, Rostaing L, Bal-

tas M, Salvayre R, Nègre-Salvayre A (2008). Carbonyl scavenger and antiatherogenic effects of hydrazine derivatives. *Free Radic. Biol. Med.*, 45 (10), 1457-1467.

21. Glavind J, Hartmann S, Clemmensen J, Jessen KE, Dam H (1952). Studies on the role of lipid peroxides in human pathology. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, 30 (1), 1-6.

22. Harman D (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol*, 11 (3), 298-300.

23. Laakso M (2010). Cardiovascular disease in type 2 diabetes from population to man to mechanisms: the Kelly West Award Lecture 2008. *Diabetes Care*, 33 (2), 442-449.

24. Lankin V (1992). Atherosclerosis as free radical pathology. *Excerpta Med., Int. Congr. Ser.*, (G98), 385-388.

25. Lankin VZ (2003). The enzymatic systems in the regulation of free radical lipid peroxidation. In: *Tomasi A. et al. (eds.) Free Radicals, Nitric Oxide, and Inflammation: Molecular, Biochemical, and Clinical Aspects.*, (344), 8-23.

26. Lankin V, Konovalova G, Tikhaze A, Shumaev K, Kumsikova E, Viigimaa M (2014). The initiation of free radical peroxidation of low-density lipoproteins by glucose and its metabolite methylglyoxal: a common molecular mechanism of vascular wall injury in atherosclerosis and diabetes. *Mol. Cell. Biochem.*, 395 (1-2), 241-252.

27. Lankin VZ, Konovalova GG, Tikhaze AK, Shumaev KB, Belova-Kumsikova EM, Grechnikova MA, Viigimaa M (2015). Aldehyde inhibition of antioxidant enzymes in blood of diabetic patients. *J. Diabetes*, doi: 10.1111/1753-0407.12309 [Epub ahead of print].

28. Lankin VZ, Kühn H, Hiebsch C, Schewe T, Rapoport S, Tikhaze AK, Gordeeva NT (1985). On the nature of the stimulation of the lipoxygenase from rabbit reticulocytes by biological membranes. *Biomed. Biocim. Acta*, 44 (5), 655-664.

29. Lankin VZ, Tikhaze AK (2003). Free radical lipoperoxidation during atherosclerosis and antioxidative therapy of this disease. In: *Tomasi A. et al. (eds.) Free Radicals, Nitric Oxide and Inflammation: Molecular, Biochemical and Clinical Aspects.*, (344), 218-231.

30. Lankin VZ, Tikhaze AK, Konovalova GG, Kumsikova EM, Shumaev KB (2010). Aldehyde-dependent modification of low density lipoproteins. In: *Handbook of Lipoprotein Research*, 85-107.

31. Lankin VZ, Tikhaze AK, Kumsikova EM (2012). Macrophages actively accumulate malonyldialdehyde-modified but not enzymatically oxidized low density lipoprotein. *Mol. Cell. Biochem.*, 365 (1-2), 93-98.

32. Lapolla A, Flamini R, Dalla Vedova A, Senesi A, Reitano R, Fedele D, Basso E, Seraglia R, Traldi P (2003). Glyoxal and methylglyoxal levels in diabetic patients: quantitative determination by a new GC/MS method. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 41 (9), 1166-1173.

33. Li D, Saldeen T, Romeo F, Mehta JL (2000). Oxidized LDL upregulates angiotensin II type 1 receptor expression in cultured human coronary artery endothelial cells: the potential role of transcription factor NF-kappaB. *Circulation*, 102 (16), 1970-1976.

34. Niedowicz DM, Daleke DL (2005). The role of oxidative stress in diabetic complications. *Cell Biochem. Biophys.*, 43 (2), 289-330.

35. Oberley LW (1988). Free radicals and diabetes. *Free Radic. Biol. Med.*, 5 (2), 113-124.

36. Rhee SG, Kang SW, Netto LE, Seo MS, Stadtman ER (1999). A family of novel peroxidases, peroxiredoxins. *Biofactors*, 10 (2-3), 207-209.
37. Shen XC, Tao L, Li WK, Zhang YY, Luo H, Xia YY (2012). Evidence-based antioxidant activity of the essential oil from *Fructus A. zerumbet* on cultured human umbilical vein endothelial cells' injury induced by ox-LDL. *BMC Complement. Altern. Med.*, doi: 10.1186/1472-6882-12-174.
38. Spiteller G. (2008). Peroxyl radicals are essential reagents in the oxidation steps of the Maillard reaction leading to generation of advanced glycation end products. *Ann. NY Acad. Sci.*, (1126), 128-133.
39. Steinberg D, Witztum JL (2010). Oxidized low-density lipoprotein and atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 30 (12), 2311-2316.
40. Takei A, Huang Y, Lopes-Virella MF (2001). Expression of adhesion molecules by human endothelial cells exposed to oxidized low density lipoprotein. Influences of degree of oxidation and location of oxidized LDL. *Atherosclerosis*, 154 (1), 79-86.
41. Tikhaze AK, Lankin VZ (2001). Exogenous oxysterols as an atherogenic factor. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, (33), A123.
42. Viigimaa M, Abina J, Zemtsovskaya G, Tikhaze A, Kononova G, Kumsikova E, Lankin V (2010). Malondialdehyde-modified low-density lipoproteins as biomarker for atherosclerosis. *Blood Press.*, 19 (3), 164-168.
43. Woodford FP, Bottcher CJ, Oette K, Anrens EH (1965). The artificial nature of lipid peroxides detected in extracts of human aorta. *J. Atheroscler. Res.*, 5 (3), 311-316.

**Сведения об авторах**  
**Information about the authors**

**Ланкин Вадим Зиновьевич** – доктор биологических наук, профессор, руководитель лаборатории биохимии свободнорадикальных процессов Института клинической кардиологии ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Минздрава России (121552, г. Москва, ул. 30-я Черепковская, 15/а; тел.: 8 (495) 414-69-75; e-mail: lankin@cardio.ru)

**Lankin Vadim Zinovievich** – Doctor of Biological Sciences, Professor, Head of the Laboratory of Biochemistry of Free-Radical Processes of Institute of Clinical Cardiology of Russian Cardiology Research and Production Complex (121552, Moscow, 3ya Cherepkovskaya str., 15A; tel.: +7 (495) 414-69-75; e-mail: lankin@cardio.ru)

**Тихазе Алла Карловна** – доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории биохимии свободнорадикальных процессов Института клинической кардиологии ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» (e-mail: tikhaze@cardio.ru)

**Tikhaze Alla Karlovna** – Doctor of Medical Sciences, Professor, Leading Research Officer of the Laboratory of Biochemistry of Free-Radical Processes of Institute of Clinical Cardiology of Russian Cardiology Research and Production Complex (e-mail: tikhaze@cardio.ru)