

## АКТУАЛЬНОСТЬ ИССЛЕДОВАНИЯ УРОВНЯ ЖИРНЫХ АЛЬДЕГИДОВ КРОВИ ПРИ ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ СЕРДЦА И АТЕРОСКЛЕРОЗЕ

Осипенко А. Н., Акулич Н. В.

**Цель.** Исследовать уровень жирных альдегидов и оксигенированных жирных радикалов в составе эритроцитов и липидов плазмы крови при атеросклерозе и ишемической болезни сердца.

**Материал и методы.** Объект исследования – пациенты с диагнозом ишемической болезни сердца, атеросклероза коронарных артерий. Контроль – практически здоровые добровольцы.

Оценка уровня различных жирных альдегидов и оксигенированных жирных радикалов осуществлялась методом капиллярной газожидкостной хроматографии.

**Результаты.** Выявлено увеличение уровня жирных альдегидов и оксигенированных жирных радикалов в эритроцитах. Показано возрастание относительного содержания жирных альдегидов в липидах плазмы крови.

**Заключение.** Делается предположение о важной роли ацидоза крови в увеличении уровня жирных альдегидов в составе эритроцитов при атеросклерозе и ишемии миокарда.

Российский кардиологический журнал 2012, 2 (94): 34–37

**Ключевые слова:** жирные альдегиды, жирные кислоты, плазмалогенные фосфолипиды, атеросклероз, ишемическая болезнь сердца.

В настоящее время все более актуальными становятся исследования, направленные на поиск способов восстановления гомеостаза в условиях неадекватной перфузии тканей [1]. При этом в аспекте исследования липидного обмена важным является изучение изменения спектра жирных радикалов (жирных кислот и жирных альдегидов) крови, что обусловлено их ролью как участников обмена веществ, тем, что они являются субстратом в процессах оксигенации липидов и предшественниками в синтезе простагландинов, а также их участием формировании клеточных мембран [2].

С другой стороны, в последние годы появилось значительное число фактов, свидетельствующих в пользу того, что при атеросклерозе и ишемии миокарда развиваются нарушения структуры клеточных мембран и изменяются их функциональные свойства; при этом в ишемизированных тканях отмечается накопление продуктов перекисного окисления липидов [3]. Кроме того, в плазме крови показано увеличение содержания окисленных липопротеинов [4]. Принято считать, что одним из пусковых механизмов, лежащих в основе этих процессов, является нарушение процессов восстановления кислорода с накоплением его промежуточных высокоактивных метаболитов [5]. При этом важными участниками окислительной модификации клеточных мембран являются чувствительные к реакциям окисления жирные альдегиды (ЖА), входящие в состав плазмалогенных фосфолипидов [6].

Тем не менее, несмотря на высокую активность ЖА в процессах оксигенации липидов, в настоящее время данных об изменении уровня этих соединений, а также окисленных активными формами кислорода

УО «Могилевский государственный университет им. А. А. Кулешова», Могилев, Беларусь.

Осипенко А. Н.\* – соискатель, специалист регионального центра коллективного пользования приборами и исследовательским оборудованием, главный специалист Могилевской областной лаборатории аналитического контроля; Акулич Н. В. – к. б. н, доцент, заведующий лабораторией экологической физиологии.

Автор, ответственный за переписку (Corresponding author): alosipenko@yandex.ru, Республика Беларусь, 212022 г. Могилев, ул. Космонавтов, д. 1.

ЖА – жирные альдегиды; ЖК – жирные кислоты; АФК – активные формы кислорода; ИБС – ишемическая болезнь сердца.

Рукопись получена 06.02.2012

Принята к публикации 12.03.2012

(АФК) жирных радикалов в составе мембранных липидов и липидов плазмы крови при ишемии миокарда и атеросклеротическом повреждении сосудов практически не встречается.

Цель работы – исследовать уровень ЖА и оксигенированных жирных радикалов в составе фосфолипидов эритроцитов и липидов плазмы крови при атеросклерозе и ишемической болезни сердца.

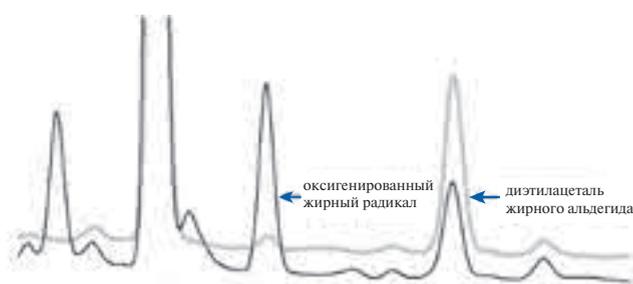
### Материал и методы

Работа выполнена на базе УО «Могилевский государственный университет им. А. А. Кулешова», УЗ «Могилевская областная больница».

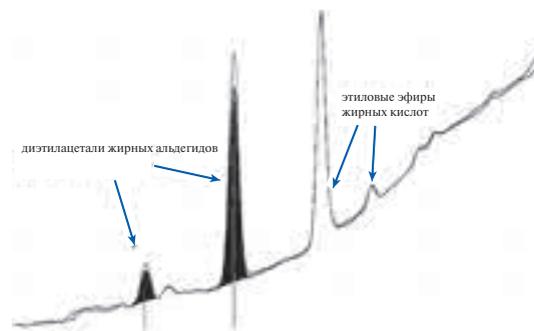
Объектом исследования явились 16 человек ( $57,1 \pm 1,4$  лет) с диагнозом: ишемическая болезнь сердца (ИБС), атеросклероз коронарных артерий, стенокардия напряжения II–III функционального класса, артериальная гипертензия. Контролем служила кровь 16 практически здоровых добровольцев в возрасте  $37,7 \pm 3,2$  лет.

В качестве модели тканевой гипоксии в наших исследованиях явились исследования с 3 – часовой инкубацией при  $37^\circ\text{C}$  изолированных образцов крови практически здоровых добровольцев ( $n=6$ ).

Учитывая, что изучение особенностей физиологии у видов животных с различной устойчивостью к тем или иным заболеваниям служит для более глубокого понимания возникновения и протекания различных патологических процессов в организме человека, мы изучили состав жирных кислот (ЖК) и ЖА в эритроцитах и плазме крови у 20 крыс. Установлено, что у этих животных не удается получить адекватную модель атеросклероза, включая в их рацион избыток холестерина [2].



**Рис. 1.** Снижение уровня диэтилацеталей и увеличение уровня окисленных АФК жирных радикалов при обработке концентрированной перекисью водорода смеси ЖК и диэтилацеталей (хроматограмма сверху получена до, а хроматограмма внизу – после обработки).



**Рис. 2.** Визуальное сравнение двух хроматограмм наложением, иллюстрирующее увеличение уровня ЖА эритроцитов после инкубации цельной крови 180 мин при 37 °С (закрашенные пики – диэтилацетали ЖА из эритроцитов, не подвергавшихся инкубации).

Преаналитический этап состоял в разделении клеточного компонента и плазмы крови путем центрифугирования. Далее эритроциты отмывались в рН сбалансированном изотоническом растворе. Из фиксированных объемов плазмы крови и эритроцитарной массы путем кислотного этанолиза с последующей экстракцией гексаном готовили растворы производных ЖА и ЖК. Затем проводился анализ состава и измерение содержания различных жирных альдегидов и жирных кислот, которые присутствовали в гексановом экстракте в виде соответствующих диэтилацеталей и этиловых эфиров [7]. Измерения проводились на газовых хроматографах «ГХ–1000», «ЦВЕТ–800» (РФ) с пламенно-ионизационными детекторами, с использованием капиллярной хроматографической колонки с фазой SE-30. Идентификация анализируемых соединений осуществлялась с помощью хромато-масс-спектрометра «Finnigan DSQ II» (США).

Количественная оценка анализируемых соединений производилась в процентном отношении к сумме полученных в ходе пробоподготовки этиловых эфиров ЖК. Оценка содержания отдельных ЖК производилась в процентном отношении к их общей сумме.

Полученные данные представлены в виде значений средних арифметических показателей сравниваемых групп и соответствующих значений доверительного интервала при  $p=0,05$ . Оценка достоверности различий между выборками осуществлялась с использованием U-критерия Манна-Уитни, который позволяет оперировать выборками с небольшим количеством наблюдений [8]. Изменения считались значимыми при  $p<0,05$ .

Исследование было выполнено в соответствии со стандартами надлежащей клинической практики (Good Clinical Practice) и принципами Хельсинкской Декларации. Протокол исследования был одобрен Этическими комитетами всех участвующих клинических центров.

Настоящее исследование рационально спланировано с учётом минимизации дискомфорта и инвазивных процедур для испытуемых, так как необходимые

данные не могут быть получены без привлечения к исследованию людей. Исследование служит получению результатов, направленных на совершенствование диагностики и лечения, получению новых данных об изучаемой патологии.

Исследование базируется на результатах лабораторных данных и углублённом знании истории проблемы. Ожидаемая польза от исследования превышает потенциальный риск. Потенциальный риск является минимальным, так как не превышает риск, существующий при выполнении обычных диагностических процедур, связанных с биохимическим анализом крови.

Использование животных в качестве объекта исследования было необходимо, поскольку альтернативные модели не могут полностью имитировать организм человека.

### Результаты и обсуждение

При анализе эритроцитарной массы больных ИБС нами было обнаружено достоверное увеличение уровня диэтилацеталей ЖА, что отражает повышение содержания плазмалогенных фосфолипидов в составе эритроцитарных мембран в сравнении с контролем. Их уровень по отношению к этиловым эфирам ЖК увеличился с  $15,95\pm 2,60\%$  до  $24,99\pm 2,31$ . При этом уровень диэтилацетала гексадецилового альдегида возрос с  $6,25\pm 0,75\%$  до  $8,37\pm 0,60\%$ . Уровень производного октадецилового альдегида увеличился с  $8,38\pm 1,75\%$  до  $14,40\pm 1,60\%$ , а производного октадецен-9-оля – с  $1,32\pm 0,30\%$  до  $2,21\pm 0,28\%$ .

В современной литературе имеются данные, что молекулы плазмалогенных фосфолипидов легко могут быть окислены активными формами кислорода. Склонность к реакциям окисления этих соединений определяется тем, что первичная  $\text{OH}^\cdot$  группа глицерола замещена не радикалом ЖК, а радикалом ЖА. Принято считать, что окисление ЖА в *sn*-1 положении остатка молекулы глицерола снижает вероятность окисления полиненасыщенной ЖК, находящейся в *sn*-2 положении глицерола [6, 9].

По нашему мнению, высокий уровень плазмалогенных фосфолипидов значительно снижает вероятность окисления ЖК активным кислородом, но, тем не менее, сам становится причиной образования окисленных метаболитов, влияющих на процессы клеточного гомеостаза.

Наши эксперименты показали, что обработка смеси этиловых эфиров различных ЖК и диэтилацеталей ЖА 30–35% перекисью водорода, главным образом, приводит к резкому сокращению содержания диэтилацеталей ЖА и образованию значительного количества органических соединений, содержащих активный кислород (кето-, эпокси- и гидропероксипроизводных), и, следовательно, способных оказывать повреждающее действие на клетки (рис. 1).

Кроме того, в группе больных ИБС в составе фосфолипидов мембран эритроцитов, помимо увеличения уровня ЖА, также в сравнении с контролем было повышено содержание оксигенированных жирных радикалов ( $0,72 \pm 0,14\%$  до  $0,90 \pm 0,06\%$ ).

Важно отметить, что увеличение ЖА ( $16,75 \pm 1,51\%$  до  $21,46 \pm 1,96\%$ ) в эритроцитах отмечалось и при 3-часовой инкубации цельной крови при  $37^\circ\text{C}$  (рис. 2). Наряду с этим, отмечалось снижение рН плазмы крови с  $7,38 \pm 0,01$  до  $7,32 \pm 0,03$ . Следует также отметить, что ацидоз венозной крови (рН  $7,31 \pm 0,04$ ) присутствовал и у больных с ишемией миокарда.

С учетом полученных результатов можно предположить, что одним из факторов увеличения содержания плазмалогенных фосфолипидов в составе клеточных мембран является тканевая гипоксия. Показано [10, 11], что активность фосфолипазы  $A_2$  в отношении мембранных фосфолипидов повышается в условиях дефицита кислорода (приводя к их удалению из липидного бислоя), и зависит от концентрации внутриклеточного кальция, при этом плазмалогенные фосфолипиды являются субстратом специфической кальций – независимой плазмалогенной фосфолипазы. Данный механизм, параллельно с интенсификацией процесса перекисного окисления липидов в условиях дефицита кислорода, может приводить к изменению состава мембран.

Известно, что насыщенные ЖК увеличивают вязкость мембран [5]. Следовательно, наряду с показанным нами ранее увеличением содержания насыщенной пальмитиновой кислоты в составе мембран эритроцитов [12], увеличение уровня ЖА также должно приводить к уплотнению клеточных мембран, так как по структуре углеводородной цепи они более чем на 90% являются насыщенными, и на 10% – мононенасыщенными. Таким образом, этот факт может быть одной из причин ингибирования рецептора гладкомышечных клеток к апопротеину В при атеросклерозе, вследствие чего наступает их перегрузка холестерином [3, 5].

Кроме того, полученные нами данные об увеличении уровня оксигенированных жирных радикалов в мембранах эритроцитов однозначно свидетельствуют о снижении гидрофобности мембран и увеличении их пассивной проницаемости для ионов, что требует интенсификации работы ионных насосов. Однако, в силу ограничения молекулярной подвижности содержащих пальмитиновую кислоту и насыщенные альдегиды фосфолипидов, должны затрудняться конформационные изменения мембранных ферментов, что снижает их каталитическую активность, усугубляя патологию. В целом, это вызывает нарушение электрического потенциала клеточной мембраны, активацию пролиферативных процессов и смещает водно-электролитный баланс [5].

Таким образом, увеличение содержания пальмитиновой кислоты и ЖА в составе мембран эритроцитов может представлять важный механизм мембранной патологии при атеросклерозе.

Следует отметить, что в эритроцитарной массе крыс уровень ЖА выше, чем в эритроцитах здорового человека (уровень диэтилацеталей ЖА составляет  $22,82 \pm 1,13\%$ ), однако уровень окисленных АФК жирных радикалов ниже ( $0,58 \pm 0,09\%$ ). Это, по-видимому, обусловлено более высокой эффективностью их антиоксидантной системы. Кроме того, в составе эритроцитов крыс обнаружен высокий, в сравнении со здоровыми людьми, уровень арахидоновой полиненасыщенной кислоты ( $22,24 \pm 0,57\%$  и  $14,52 \pm 0,50\%$  соответственно), что, несмотря на высокий уровень ЖА, должно приводить к более значительной текучести клеточных мембран.

Некоторое увеличение уровня плазмалогенных фосфолипидов отмечалось нами по результатам измерения уровня диэтилацеталей ЖА и в плазме крови больных ИБС. Так, в плазме крови людей из группы контроля относительный уровень диэтилацеталей жирных альдегидов составлял  $2,13 \pm 0,42\%$ , в то время как в плазме крови лиц с ИБС этот показатель был равен  $2,89 \pm 0,40\%$ .

В ряде работ [2, 4] показано увеличение содержания окисленных липопротеинов в плазме крови больных ИБС. Следовательно, учитывая, что ЖА могут быть причиной образования метаболитов, содержащих активный кислород, кажется вероятным, что повышенная восприимчивость липопротеинов низкой плотности к окислительной модификации при ишемии миокарда и атеросклерозе является, в том числе, следствием более высокого, по сравнению с контролем, содержания в плазме крови плазмалогенных фосфолипидов. Кроме того, полученные нами ранее результаты свидетельствуют о том, что уровень склонных к перекисному окислению арахидоновой и докозагексаеновой кислот в группе больных ИБС достоверно не отличается от контроля (хотя и имел некоторую тенденцию к росту) [12]. У крыс

содержание ЖА в составе липопротеинов незначительно (уровень диэтилацеталей ЖА составляет всего  $0,50 \pm 0,07\%$ ).

Следует отметить, что уровень ЖА в плазме крови в основном определяется активностью клеточных пероксисом печени, также участвующих в метаболизме холестерина [10, 13]. Таким образом, повышенный уровень ЖА плазмы крови также может быть маркером увеличения общего холестерина крови при ИБС и атеросклерозе.

### Заключение

Проведенное исследование показало:

1. Обработка смеси этиловых эфиров различных ЖК и диэтилацеталей ЖА 30–35% перекисью водорода приводит, главным образом, к резкому сокращению содержания диэтилацеталей и образованию значительного количества органических соединений, содержащих активный кислород, и, следовательно, способных оказывать повреждающее действие на клетки.

2. При атеросклерозе и ишемии миокарда выявляется увеличение уровня ЖА и оксигенированных жирных радикалов эритроцитов, что отражает уплотнение клеточных мембран, снижение их гидрофобности и увеличение пассивной проницаемости для ионов.

### Литература

- Kurashvili, L.V. Vasil'kov V.G. Lipid metabolism on emergency conditions. Penza; 2003. Russian (Курашвили Л.В., Васильков В.Г. Липидный обмен при неотложных состояниях. Пенза; 2003).
- Titov V.N., Lisicyn D.M. Fatty acids. Physical chemistry, biology and medicine. M.: – Tver': Triada; 2006. Russian (Титов В.Н., Лисицын Д.М. Жирные кислоты. Физическая химия, биология и медицина. М.: – Тверь: Триада; 2006).
- Zajchik A.Sh., Churilov L.P. Common pathophysiology (with the fundamentals of immunopathology). SPb.: JeLBI-SPb; 2005. Russian (Зайчик А.Ш., Чурилов Л.П. Общая патофизиология (с основами иммунопатологии). СПб.: ЭЛБИ-СПб; 2005).
- Klimov A.N., Nikul'cheva N.G. Lipids, lipoproteins and atherosclerosis. SPb.: Piter Press; 1995. Russian (Климов А.Н., Никольчева Н.Г. Липиды, липопротеиды и атеросклероз. СПб.: Питер Пресс; 1995).
- Boldyrev A.A., Kjaivjarjajnen E.I., Iljuha V.A. Biomembranology. Petrozavodsk: Izdvo Kar NC RAN; 2006. Russian (Болдырев А.А., Кяйвяряйнен Е.И., Илюха В.А. Биомембранология. Петрозаводск: Изд-во Кар НЦ РАН; 2006).
- Khan M., Singh J., Singh I. Plasmalogen deficiency in cerebral adrenoleukodystrophy and its modulation by lovastatin. Neurochem 2008; 106 (4): 1766–1779.
- Kejts M. Technique of lipidology. Introduction, analysis and identification of lipids. M.: Mir; 1975. Russian (Кейтс М. Техника липидологии. Выделение, анализ и идентификация липидов. М.: Мир; 1975).
- Medik V.A., Tokmachev M.S., Fishman B.B. Statistics in medicine and biology: manual in two volumes. M.: Medicina, 2000: 1. Theoretical statistics. Russian (Медик В.А., Токмачев М.С., Фишман Б.Б. Статистика в медицине и биологии: руководство в 2 т. М.: Медицина; 2000; 1. Теоретическая статистика).
- Farooqui A.A., Rapoport S.I., Horrocks L.A. Membrane phospholipid alterations in Alzheimer's disease: deficiency of ethanolamine plasmalogens. J. Neurochem. Res. 1997; 22 (4): 523–527.
- Kovacs W.J., Shackelford J.E., Tape K.N. et al. Disturbed cholesterol homeostasis in a peroxisome-deficient PEX2 knockout mouse model. J. Mol. Cell. Biol. 2004; 24 (1): 1–13.
- Farooqui A.A., Yang H.C., Horrocks L.A. Plasmalogens, phospholipases A2 and signal transduction. Brain Res. Rev. 1995; 21 (2):152–161.
- Osipenko A.N., Akulich N.V., Marochkov A.V. and other. Imbalance of fatty acids at angiopathic states of various genesis. Molodezh' v nauke – 2009: pril. k zhurn. «Vesci Nacyjanal'naj akademii navuk Belarusi» 2010; V 5 ch. Ch. 4: 414-419. Russian (Осипенко А.Н., Акулич Н.В., Марочков А.В. и др. Нарушение баланса жирных кислот при ангиопатических состояниях различного генеза. Молодежь в науке 2009: прил. к журн. «Весті Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі» 2010; В 5 ч. Ч. 4: 414-419).
- Mandel H., Getsis M., Rosenblat M. et al. Reduced cellular cholesterol content in peroxisome-deficient fibroblasts is associated with impaired uptake of the patient's low density lipoprotein and with reduced cholesterol synthesis. J. Lipid Res. 1995; 36 (6): 1385–1391.

### Blood levels of fatty aldehydes in coronary heart disease and atherosclerosis

Osipenko A. N., Akulich N. V.

**Aim.** To investigate the levels of fatty aldehydes and oxidised fatty acid radicals in erythrocytes and plasma lipids among patients with atherosclerosis and coronary heart disease (CHD).

**Material and methods.** The study included patients with diagnosed CHD and coronary artery atherosclerosis, as well as healthy volunteers (controls).

The levels of fatty aldehydes and oxidised fatty acid radicals were assessed using the capillary gas-liquid chromatography method.

**Results.** CHD patients demonstrated elevated erythrocyte levels of fatty aldehydes and oxidised fatty radicals, as well as an increased relative content of fatty aldehydes in plasma lipids.

3. Увеличение уровня ЖА в эритроцитах, наряду со снижением рН плазмы крови, отмечается после 3 – часовой инкубации цельной крови при 37 °С. Ацидоз венозной крови также наблюдается у больных с ишемией миокарда. Это позволяет предположить, что одним из факторов увеличения содержания плазмалогенных фосфолипидов в составе клеточных мембран является тканевая гипоксия.

4. Увеличение уровня ЖА отмечается в плазме крови пациентов с ИБС и атеросклерозом, что может быть одной из причин повышенной восприимчивости липопротеинов плазмы крови к окислительной модификации.

5. Полученные данные указывают на необходимость коррекции системного метаболического ацидоза как важной причины изменения физико-химических параметров клеточных мембран у пациентов с ИБС и атеросклерозом. Результаты исследования также могут послужить основой для разработки новых критериев оценки дисфункции клеточных мембран при ишемии миокарда и атеросклерозе, в том числе и с целью мониторинга эффективности проводимого лечения. Кроме того, установленные факты могут использоваться при поиске способов проведения физиологически обоснованной терапии с более широким применением антигипоксантов, антиоксидантов, мембранотропных соединений.

**Conclusion.** Blood acidosis could play an important role in the elevation of fatty aldehyde levels in erythrocytes among patients with atherosclerosis and myocardial ischemia.

Russ J Cardiol 2012, 2(94): 34–37

**Key words:** Fatty aldehydes, fatty acids, plasmalogen phospholipids, atherosclerosis, coronary heart disease.

A. A. Kuleshov Mogilev State University. Mogilev, Belarus.