© Коллектив авторов, 2008

Н.П. Котлукова[1], О.И. Артеменко[1], М.П. Давыдова[2], О.Н. Ильина[3], Л.А. Курбатова[4]

РОЛЬ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА И АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ В ПАТОГЕНЕЗЕ ВРОЖДЕННЫХ ПОРОКОВ СЕРДЦА

[1] ГОУ ВПО Российский государственный медицинский университет,
[2] Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
[3] ПКЦ ГКБ № 67, [4] ДКБ № 13 им. Н.Ф. Филатова, Москва

За последнее время появилось большое количество данных, подтверждающих участие свободных радикалов в развитии различных заболеваний. Маркеры окислительного стресса обнаружены в легких, крови, миокарде при усилении легочного кровотока и гипоксии. В нашей работе была изучена активность антиоксидантной системы у детей с врожденными пороками сердца (ВПС). Для характеристики антиоксидантной системы были измерены каталазная и общая антиоксидантная активность (АОА) сыворотки и уровень глутатиона в плазме. Обнаружено повышение каталазной активности у пациентов с высокой легочной гипертензией (ЛГ) и корреляция между систолическим давлением в правом желудочке и активностью каталазы. При ВПС с гиповолемией легких результаты были неоднозначными: у пациентов с гипоксемией наблюдали повышение каталазной активности, а у детей с нормальной сатурацией — ее снижение. У пациентов с синдромом Дауна были выявлены более высокая общая АОА и отсутствие нарастания активности каталазы при увеличении степени ЛГ. Таким образом, нарушение легочной гемодинамики и оксигенации крови у детей при ВПС приводит к дисбалансу про- и антиоксидантных факторов.

Many of recent publications presents a lot of data testify to participation of free radicals in development of different deceases. Markers of oxidiative stress were found in lungs, in blood, in myocardium in cases of increased pulmonary circulation and hypoxia. Authors of present study investigated activity of anti-oxidative system in children with congenital heart decease (CHD). Anti-oxidative system state was estimated according to catalase and total anti-oxidative activity (AOA) of serum and to determination of serum glutation level. The study showed increased catalase activity in patients with significant lung hypertension (LH) and correlation between right ventricle systolic pressure and catalase activity. Results were ambiguous of CHD with lung hypoperfusion: catalase activity was normal in patients with hypoxemia and decreased in patients with normal saturation. Patients with Down syndrome had more high total AOA and demonstrated absence of catalase activity raise according to increase of lung hypertension. Thus, disorders of lung circulation and blood oxygenation in cases of CHD leaded to imbalance of pro- and anti-oxidative factors.

Окислительный стресс рассматривают как важный механизм в патогенезе развития артериальной гипертензии, легочной гипертензии (ЛГ), атеросклероза, сахарного диабета и других заболеваний [1]. Семейство активных кислородных радикалов представлено биологически высоко активными, коротко живущими молекулами, которые образуются при окислении некоторых субстратов молекулярным кислородом. К ним относятся супероксид-анион, гидроксильный радикал, перекись водорода, пероксинитрит, гипохлорная кислота и липидные радикалы. В физиологических условиях в стенке сосудов формирование и деградация свободных радикалов четко сбалансированы. При врожденных пороках сердца (ВПС) происходит нарушение легочной гемодинамики (гипер- или гиповолемия) и ухудшение насыщения крови кислородом, что влечет за собой изменения в соотношении про- и антиоксидантных факторов [2, 3].

При первичной ЛГ (ПЛГ) и ЛГ у детей с ВПС показано увеличение концентрации малонового диальдегида в плазме, снижение активности глутатион-пероксидазы в плазме и увеличение ее активности в эритроцитах [4]. Наиболее выраженные изменения отмечались у пациентов с тяжелой сердечной недостаточностью и высокой ЛГ. Относительно недавно было предложено оценивать активность окислительных реакций по концентрации F_2-изопростанов — метаболитов периферического, индуцированного свободными радикалами, перекисного окисления арахидоновой кислоты — в плазме крови и моче [5]. При помощи этого метода Cracowski и соавт. [6] показали более чем двукратное увеличение F_2-изопростана в моче у пациентов с ЛГ. Более того, изменение среднего давления в легочной артерии (ЛА) и легочного сопротивления в ответ на ингаляцию NO обратно коррелировало с уровнем F_2-изопростана в моче.

Усиление окислительного стресса в процессе формирования ЛГ также влияет и на состояние сердечной мышцы. При развитии cor pulmonale у крыс с монокроталиновой ЛГ выявлена двухступенчатая реакция антиоксидантной системы [7]. При слабой и умеренной гипертрофии миокарда и умеренном подъеме правожелудочкового давления наблюдается активация антиоксидантной системы. Когда же гипертрофия переходит в недостаточность, наблюдаются усиление окислительных процессов и снижение активности антиоксидантных ферментов, т.е. истощение антиоксидантной системы.

Гипоксия, сопровождающая многие пороки сердца, является прооксидантным фактором. Особенно это актуально для пациентов с ВПС «синего» типа, которые после хирургической коррекции испытывают синдром ишемии-реперфузии и нуждаются в дополнительной защите от окислительного стресса.

Наше исследование посвящено изучению работы антиоксидантной системы в зависимости от насыщения крови кислородом и типа легочной гемодинамики при ВПС у детей.

Материалы и методы исследования

Набор пациентов проводился на базе ПКЦ ГКБ № 67 и ДКБ № 13 им. Н.Ф. Филатова. Под нашим наблюдением находились 72 ребенка в возрасте от 1 до 24 месяцев, из них 25 — с ВПС и гиперволемией в легких («бледный» тип), 8 — с ВПС и гиповолемией в легких («синий» тип), 13 — с синдромом Дауна (СД) в сочетании с ВПС «бледного» типа, 8 — с СД без ВПС; 18 практически здоровых детей составили группу сравнения.

Таблица

Клиническая характеристика наблюдаемых детей

Группы обследованных детей	ВПС	Возраст, мес	Количество пациентов	Примечание
Гиперволемия	ДМЖП, ДМПП, ОАП, ДОС от ПЖ в сочетании с ДМЖП	4,6±3,0 (1–14)	25	Систолическое давление в ПЖ 15–130 мм Hg
Гиповолемия	СЛА, ТФ, ДОС от ПЖ в сочетании с ДМЖП и СЛА, СЛА в сочетании с множественными ДМЖП	5,7±5,0 (1–16)	8	Градиент давления на ЛА 45—82 мм Hg
СД + гиперволемия	АВК, ДМЖП, ДМПП	9,7±10,2 (1–36)	13	Систолическое давление в ПЖ 20–105 мм Hg
СД	МАРС, ООО	4,7±6,1 (1–18)	8	—
Контроль	МАРС, ООО	5,5±4,4 (1–14)	18	—

АВК — атриовентрикулярный канал, ДМЖП — дефект межжелудочковой перегородки, ДМПП — дефект межпредсердной перегородки, ДОС — двойное отхождение сосудов, МАРС — малая аномалия развития сердца, МКК — малый круг кровообращения, ОАП — открытый артериальный проток, ООО — открытое овальное окно, ПЖ — правый желудочек сердца, СЛА — стеноз легочной артерии, ТФ — тетрада Фалло.

Для уточнения диагноза всем детям было проведено общеклиническое (выяснение анамнеза, осмотр, общие анализы крови и мочи) и кардиологическое обследование, которое включало ЭКГ, ДЭХОКГ, рентгенографию грудной клетки, измерение сатурации. Клиническая характеристика групп представлена в таблице. Критериями исключения для всех групп являлись острые и хронические инфекционные заболевания, пороки развития легких, декомпенсированные соматические заболевания и аллергодерматозы в стадии обострения. В исследование не включали детей, перенесших кардиохирургическую коррекцию ВПС.

Лабораторную часть работы проводили на факультете фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова. Были измерены активность каталазы и антиоксидантная активность (АОА) низкомолекулярных водорастворимых соединений в сыворотке, концентрация глутатиона в плазме крови.

Измерение каталазной активности сыворотки крови проводили при помощи спектрофотометрии. При длине волны 240 нм регистрировали истощение H_2O_2 в пробе, содержащей 50 мкл сыворотки на 2 мл инкубационной смеси (50 мМ PBS, pH=7,4, H_2O_2 10 мМ) за 1 мин, из чего рассчитывали максимальную активность каталазы на 1 мл сыворотки.

Измерение общего глутатиона в плазме крови проводили спектрофотометрически при длине волны 412 нм. К 1 мл 50 мМ калий-фосфатного буфера, pH=7,5, добавляли 150 мкл депротеинизированной плазмы. Реакцию начинали добавлением DTNB (до концентрации 200 мкМ). Для восстановления окисленного глутатиона использовали глутатион-редуктазу в концентрации 0,5 Ед/мл, что требовало внесения NADPH (до 100 мкМ). Концентрацию глутатиона определяли после 1 мин инкубации по калибровочной шкале.

Измерение АОА сыворотки крови осуществляли методом фотохемилюминесценции (ФХЛ). К раствору, содержащему 1500 мкл бидистиллята, 1000 мкл карбонатного буфера (0,1 М, pH=10,4) и 10 мкл люминола (1мМ, pH=7,83), добавляли по 10 мкл сыворотки. Число измерений каждого образца было равно трем. Результаты измерения АОА водорастворимых антиоксидантов представлялись в эквивалентных единицах концентрации аскорбиновой кислоты путем сравнения полученных данных АОА с экспериментальными данными градуировочной кривой для аскорбиновой кислоты в диапазоне концентраций от 10 до 400 мкМ.

Статистическую обработку данных проводили при помощи критерия Стьюдента. Все результаты представлены в виде среднего (M) ± стандартная ошибка среднего (SD).

Результаты

Возрастные особенности антиоксидантной системы у детей 1-го года жизни. Стандартных тестов и возрастных норм антиоксидантных показателей у детей 1-го года жизни и раннего возраста к настоящему времени не разработано. В группе контроля в нашем исследовании концентрация глутатиона в плазме обратно коррелировала (k=−0,69) с возрастом ребенка (рис. 1). Для каталазной и общей антиоксидантной активности сыворотки зависимости от возраста обнаружено не было.

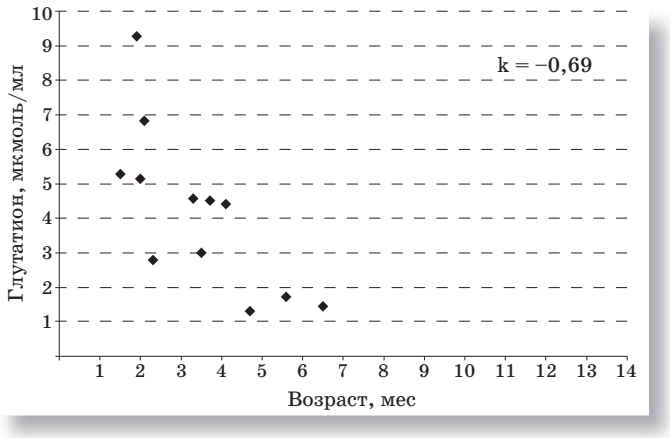

Рис. 1. Концентрация глутатиона в плазме крови здоровых детей в зависимости от возраста.

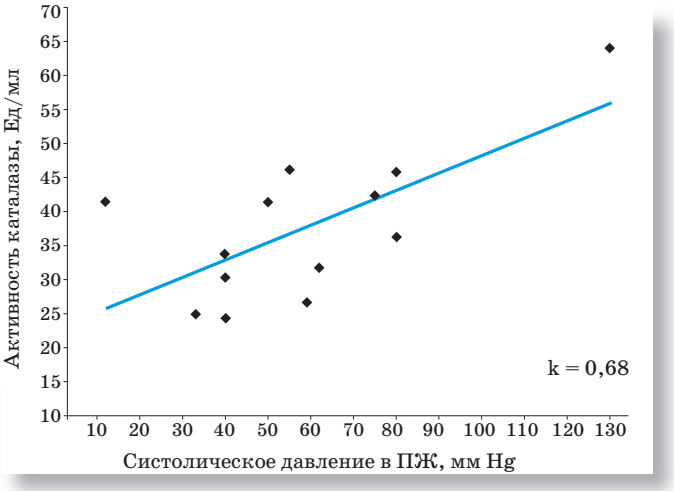

Рис. 2. Зависимость между систолическим давлением в правом желудочке у детей с ВПС «бледного» типа и каталазной активностью сыворотки.

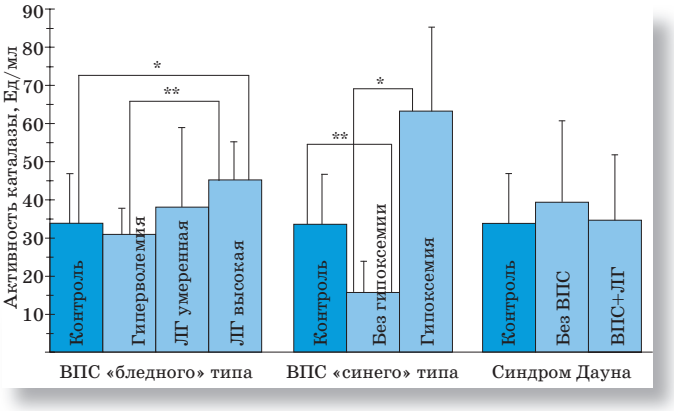

Рис. 3. Каталазная активность сыворотки при ВПС с различными типами гемодинамики и СД.
* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Каталазная активность сыворотки на первый взгляд не отличалась у здоровых детей и детей с ВПС.

Однако обращает внимание зависимость между величиной давления в правом желудочке при пороках с лево-правым сбросом крови (ДМЖП, ДМПП) и активностью каталазы (рис. 2). Разделив пациентов с ВПС «бледного» типа на клинические группы по выраженности недостаточности кровообращения (НК) и степени ЛГ, были получены достоверные отличия между группой сравнения и пациентами, страдающими НК IIА–Б ст. и высокой ЛГ, а также между группами с начальной и высокой ЛГ (рис. 3).

Пациенты с ВПС и гиповолемией в легких были распределены на 2 группы в зависимости от степени насыщения крови кислородом. В 1-ю группу вошли пациенты без признаков гипоксемии в покое, во 2-ю — пациенты со сниженной сатурацией (81±2% по сравнению с 96±2% в контроле), диффузным цианозом, повышенным уровнем гемоглобина (149±35 и 109±15 г/л соответственно) и эритроцитозом (4,7±0,7 и 3,6±0,5·10^{12}/л соответственно) в крови. Эти дети отличались высокой активностью каталазы, в то время как у пациентов с обедненным легочным потоком, но без существенных признаков гипоксемии, каталазная активность сыворотки, напротив, была ниже, чем в контроле (рис. 3).

Пациенты с СД вне зависимости от степени ЛГ по активности каталазы не отличались от группы сравнения.

Концентрация глутатиона в плазме. Учитывая выявленную зависимость (вероятно, нелинейную) уровня общего глутатиона в плазме крови от возраста у здоровых детей 1-го года жизни, дальнейшее сравнение групп по этому показателю представляло значительные сложности. Небольшая численность каждой группы не позволила разделить их на еще более мелкие возрастные отрезки. О достоверных отличиях можно говорить только между здоровыми детьми и пациентами с СД без ВПС, у которых наблюдалось снижение уровня глутатиона в плазме крови. Также в группе пациентов с СД без ВПС найдена обратная корреляция средней силы (k = −0,72) между активностью каталазы и концентрацией глутатиона в плазме.

Общая антиоксидантная активность сыворотки. АОА низкомолекулярных соединений сыворотки у пациентов с СД была выше, чем в группе сравнения (10,5±2,6 Ед и 6,9±2,9 Ед в образце соответственно, $p<0,05$). В других группах различий обнаружено не было.

Обсуждение

Сведения о возрастной динамике про- и антиоксидантных факторов почерпнуты нами из единичных публикаций зарубежных авторов. Kauffman et al. [8] в качестве характеристики окислительного стресса измеряли F_2-изопростаны в моче и обнаружили наиболее высокий их уровень в младенчестве и падение к 7-летнему возрасту. В другой работе [9] показано постепенное снижение различных маркеров окислительного стресса у детей с 1 года до 16 лет. Авторы связывают это с высоким уровнем метаболизма и митохондриального дыхания у детей. Соотношение восстановленного к окисленному глутатиону (тиосульфидный индекс) и аналогичное соотношение убиквинол/убиквинон у детей выше, чем у взрослых [9]. Наши данные по падению концентрации общего глутатиона в плазме в течение 1-го года жизни у здоровых детей согласуются с общей тенденцией, отмеченной в литературе.

Клиническая картина и течение ВПС в первую очередь зависят от особенностей легочной гемодинамики. Такие ВПС, как ДМЖП, ДМПП, АВК, характеризуются избыточным потоком крови через легкие, повышением давления и перестройкой ЛА, что в конечном итоге приводит к развитию артериальной ЛГ и преимущественно правожелудочковой недостаточности. Усиление окислительного стресса показано при разных видах ЛГ у взрослых и детей [3, 4, 6]. В моделях на животных описаны молекулярные механизмы этого процесса, как то — гиперпродукция O^{2-}, увеличение экспрессии субъединиц NAD(P)H-оксидазы [2]. Также продемонстрировано, что источником супероксиданиона является не только NAD(P)H-оксидаза, но и eNO-синтаза [10]. Данные о работе антиоксидантной системы немногочисленны и порой противоречивы.

Мы предположили, что в ответ на усиление окислительного стресса при ЛГ происходит активация антиоксидантной системы. Для проверки этой гипотезы были измерены уровень глутатиона в плазме, каталазная и общая антиоксидантная способность сыворотки. Оказалось, что у детей, страдающих высокой ЛГ (давление в ЛА > 60 mm Hg), активность каталазы была выше таковой в контроле. Однако при умеренном повышении давления в ЛА различий между группой ВПС и группой сравнения найдено не было. Вероятно, только значительное усиление легочного потока влияет на активность каталазы в отличие от прооксидантных ферментов, экспрессия и активность которых зависят от изменения напряжения сдвига. Также могут быть задействованы и другие механизмы. Нарастание внутрилегочного сопротивления обусловлено перестройкой сосудистого русла и вовлечением в процесс провоспалительных и тромбогенных факторов. При различных формах ЛГ в крови и легочной ткани описано нарастание IL1, IL6, TNFα, TxA_2, серотонина [11, 12], которые помимо вредоносного действия в развитии ЛГ, возможно, компенсаторно вызывают активацию антиоксидантной системы.

Среди 8 пациентов с гиповолемией в легких у 4 мы наблюдали снижение сатурации (81±2% по сравнению с 96±2% в контроле) и клинические признаки гипоксемии — цианоз кожных покровов, нарастающий при нагрузке, повышение уровня гемоглобина (149±35 г/л и 109±15 г/л соответственно) и эритроцитоз (4,7±0,7 и 3,6±0,5·10^{12}/л соответственно) в крови. Эти дети отличались высокой

активностью каталазы, в то время как у пациентов с обедненным легочным потоком, но без существенных признаков гипоксемии, каталазная активность сыворотки, напротив, была ниже, чем в контроле (рис. 3). Такое разделение пациентов с ВПС «синего» типа с клинической точки зрения не выглядит удивительным и обусловлено, во-первых, разной степенью стеноза ЛА и, во-вторых, разной степенью смешения артериальной и венозной крови, т. е. величиной право-левого шунта. Недаром клинически выделяют «бледную» форму тетрады Фалло.

АОА сыворотки, измеренная при помощи ФХЛ, характеризует суммарный антиоксидантный потенциал неферментативных водорастворимых соединений, содержащихся в крови. К ним относятся аскорбиновая кислота, глутатион, билирубин, мочевая кислота. У пациентов с СД АОА была выше, чем в группе сравнения (10,5±2,6 Ед и 6,9±2,9 Ед в образце соответственно, $p<0,05$), а уровень глутатиона в плазме ниже по сравнению со здоровыми детьми (1,8±1,0 и 4,0±2,3 мкмоль/мл, $p<0,05$). Разнонаправленность этих изменений свидетельствует, что повышение АОА при СД не связано с тиосульфидной системой, а зависит от количества других низкомолекулярных антиоксидантов, содержащихся в крови. По литературным данным [13, 14] известно, что у пациентов с СД повышена концентрация мочевой кислоты в плазме вследствие высокой интенсивности пуринового обмена (несколько генов ферментов, участвующих в метаболизме пуринов, локализованы в хромосоме 21. Также отмечен более высокий уровень аскорбиновой кислоты у детей с СД по сравнению с возрастным контролем [14]. Вероятно, эти особенности отвечают за относительно более высокую АОА сыворотки при СД.

Ранее мы отметили, что у детей с ЛГ при несиндромальной форме ВПС каталазная активность сыворотки зависит от степени ЛГ, в частности, была выявлена прямая корреляция между активностью каталазы и давлением в правом желудочке. Тем не менее, у детей с СД подобной закономерности ни по одному из исследуемых параметров не обнаружено.

В группе пациентов с СД без ВПС найдена обратная корреляция средней силы ($k = -0,72$) между активностью каталазы и концентрацией глутатиона в плазме. И каталаза, и глутатионпероксидаза отвечают за детоксикацию перекиси водорода, концентрация которой в крови при СД повышена. Эта зависимость, вероятно, обусловлена отрицательной обратной связью между двумя антиоксидантными ферментными системами, контроль которых может осуществляться как на уровне экспрессии генов ферментов, так и регуляцией синтеза глутатиона.

Заключение

Анализ наших данных показывает, что на работу антиоксидантной системы у детей влияет множество параметров. Существуют генетические и возрастные особенности, например, падение концентрации глутатиона в плазме крови в течение 1-го года жизни у здоровых детей и изначально низкий его уровень при СД. Нарушение гемодинамики при ВПС влияет на другой компонент антиоксидантной защиты — каталазную активность сыворотки, при этом прослеживается тенденция от минимальных значений при снижении легочного потока до повышения активности фермента при гиперволемии и ЛГ. Гипоксия известна как один из прооксидантных факторов и выраженная гипоксемия, возникающая вследствие право-левого шунта крови при «синих» пороках, очевидно, вызывает компенсаторное повышение каталазной активности крови. Поэтому оценка оксидативного статуса при ВПС должна быть комплексной и учитывать как минимум все выше указанные особенности.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Wassmann S, Wassmann K, Nickenig G.* Modulation of Oxidant and Antioxidant Enzyme Expression and Function in Vascular Cells Hypertension, 2004; 44: 381–386.

2. *Grobe AC, Wells SM, Benavidez E et al.* Increased oxidative stress in lambs with increased pulmonary blood flow and pulmonary hypertension: role of NADPH oxidase and endothelial NO synthase. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2006; 290: L1069–L1077.

3. *Bowers R, Cool C, Murphy RS et al.* Oxidative Stress in Severe Pulmonary Hypertension. Am. J. Respir. Crit. Care Med., 2004; 169: 764–769.

4. *Иродова Н.Л, Ланкин В.З., Коновалова Г.Г. и др.* Окислительный стресс у больных первичной легочной гипертензией. Бюлл. эксп. биол. мед. 2002; 133 (6): 580–382.

5. *Roberts LJ, Morrow JD.* Measurement of F2-isoprostanes as an index of oxidative stress in vivo. Free Radic Biol Med, 2000; 28(4):505–513.

6. *Cracowski JL, Cracowski C, Bessard G et al.* Increased Lipid Peroxidation in Patients with Pulmonary Hypertension. Am. J. Respir. Crit. Care Med., 2001; 164: 1038.

7. *Farahmand F, Hill MF, Singal PK.* Antioxidant and oxidative stress changes in experimental cor pulmonale. Mol Cell Biochem. 2004; 260 (1–2): 21–29.

8. *Kauffman LD, Sokol RJ, Jones RH et al.* Urinary F2-isoprostanes in young healthy children at risk for type 1 diabetes mellitus. Free Radic Biol Med, 2003; 35 (6): 551–557.

9. *Tsukahara H.* Biomarkers for Oxidative Stress: Clinical Application in Pediatric Medicine. Current Medicinal Chemistry, 2007; 14: 339–351.

10. *Давыдова М.П., Постников А.Б., Дьяконов К.Б. и др.* Участие тетрагидробиоптерина в локальном изменении эндотелийзависимого расслабления сосудов при легочной гипертензии. Рос. физиологический журнал им. И.М. Сеченова, 2003; 89 (12): 1516–1522.

11. *Dorfmüller P, Perros F, Balabanian K, Humbert M.* Inflammation in pulmonary arterial hypertension. Eur Respir J. 2003; 22: 358–363.

12. *Humbert M, Morell NW, Archer SL et al.* Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. J Am Coll Cardiol. 2004; 43 (12) (Suppl S): 13–24.

13. *Brodsky G, Barnes T, Bleskan J, et al.* The human GARS-AIRS-GART gene encodes two proteins which are differentially expressed during human brain development and temporally overexpressed in cerebellum of individuals with Down syndrome. Hum. Mol. Genet., 1997; 6: 2043–2050.

14. *Pallardo FV, Degan P, d'Ischia M, et al.* Multiple evidence for an early age pro-oxidant state in Down Syndrome patients. Biogerontology, 2006; 7 (4): 211–220.