

Ю. И. Рагино, И. Д. Сафронов, О. В. Мотина, М. В. Иванова, Ю. П. Никитин

СВЯЗЬ ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИИ С ОКИСЛИТЕЛЬНО-АНТИОКСИДАНТНЫМИ НАРУШЕНИЯМИ У МУЖЧИН НОВОСИБИРСКА

ГУ НИИ терапии СО РАМН, Новосибирск

ГУ Научный центр клинической и экспериментальной медицины СО РАМН, Новосибирск

Исследованы связи гипергомоцистеинемии с окислительно-антиоксидантными процессами в крови и в липопротеинах низкой плотности (ЛНП) в популяционной выборке мужчин г. Новосибирска. Показано, что при гомотеинемии больше 30 мкмоль/л уровень продуктов перекисного окисления липидов в крови и в ЛНП, а устойчивость ЛНП к окислению и содержание альфа-токоферола в крови и в ЛНП снижены по сравнению со случаями, когда уровень гомотеинемии меньше 15 мкмоль/л. Выявлены прямые корреляционные связи уровня гомотеинемии с содержанием продуктов перекисного окисления липидов в крови и в ЛНП и обратная связь – с содержанием альфа-токоферола в ЛНП. Обнаружены прямые независимые ассоциации уровня гомотеинемии с уровнями продуктов перекисного окисления липидов в крови и в ЛНП и обратная независимая ассоциация уровня гомотеинемии с содержанием альфа-токоферола в ЛНП.

Ключевые слова: популяционная выборка мужчин, гипергомоцистеинемия, перекисное окисление липидов, липопротеины низкой плотности, альфа-токоферол

Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) атеросклеротического генеза и их осложнения являются основной причиной смертности населения в мире [1, 2], поэтому продолжается поиск факторов риска, своевременное выявление которых позволило бы снизить уровень смертности от этих заболеваний. Повышенный уровень гомотеина (ГЦ) крови - гипергомоцистеинемия (ГГЦ) - представляет собой один из новых метаболических факторов риска ССЗ, в частности ИБС, который сегодня активно изучается [3-7]. При этом отмечается, что наряду с первичными молекулярно-генетическими причинами развитие ГГЦ может быть обусловлено вызывать некоторыми факторами питания и образа жизни. Например, дефицит фолиевой кислоты, витаминов В₆ и В₁₂, курение, чрезмерный прием алкоголя могут способствовать нарушению нормального метаболизма ГЦ и его превращению в метионин и (или) в цистеин, что, в итоге, приводит к развитию ГГЦ [8].

В патогенезе атеросклероза, вероятно, большое значение имеют несколько патофизиологических механизмов, обуславливающих взаимосвязь повышенного уровня ГЦ крови, эндотелиальной дисфункции и активности процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ). С одной стороны, ГГЦ способствует развитию эндотелиальной дисфункции за счет нарушения синтеза и (или) инактивации оксида азота (NO),

с другой - усиливает «окислительный стресс». Установлено, что процесс окисления ГЦ в крови сопровождается образованием активных кислородных метаболитов (O₂⁻, H₂O₂), которые не только индуцируют ПОЛ в мембранах клеток и ЛНП, но и инактивируют NO и запускают каскад провоспалительных цитокиновых реакций [7, 9-11]. Известно также, что продукты окисления ГЦ могут активировать пролиферацию гладкомышечных клеток сосудов, тромбоциты крови и гиперкоагуляцию [12, 13].

В отличие от связи уровня ГЦ крови с содержанием водорастворимых витаминов (фолиевой кислоты, В₆, В₁₂), взаимоотношения ГЦ с жирорастворимыми витаминами-антиоксидантами, играющими важную роль в процессах окисления липидов и ЛНП [14], практически не изучались. Поэтому целью настоящей работы является изучение возможных ассоциаций ГГЦ с окислительно-антиоксидантными процессами в крови и в ЛНП у мужчин популяционной выборки жителей г. Новосибирска.

Материалы и методы

В феврале – марте 2004 г. была обследована репрезентативная популяционная выборка мужчин г. Новосибирска. Скрининговое обследование проводилось на базе ГУ НИИ терапии СО РАМН в рамках международного проекта «Детерминанты сердечно-сосудистых заболеваний в Восточной Европе: много-

центровое когортное исследование» фонда Welcome Trust (Великобритания) с использованием стандартизованных эпидемиологических и биохимических методов. Исследование было одобрено Этическим Комитетом ГУ НИИ терапии СО РАМН (протокол № 1 от 13.02.2002 г). В популяционной выборке было 159 мужчин в возрасте 46-69 лет (средний возраст $59,5 \pm 0,5$ лет (здесь и далее все значения приведены как $M \pm m$). От всех обследуемых лиц было получено информированное согласие на участие в исследовании включая проведение биохимических анализов крови. В программу обследования входили комплекс валидизированных анкет и опросников в том числе кардиологический опросник Роуз, опросники по питанию, курению, а также антропометрия, трехкратное измерение АД, запись ЭКГ с последующим кодированием по Миннесотскому коду.

Забор венозной крови проводился из локтевой вены утром натощак через 12 ч после последнего приема пищи. Биохимические методы исследования включали оценку показателей липидного профиля крови, уровня ГЦ, окислительных (содержание малонового диальдегида (МДА) и SH-групп в крови, исходного и стимулированного катализаторами окисления *in vitro* уровней продуктов ПОЛ в ЛНП, продолжительности лаг-фазы окисления ЛНП) и антиоксидантных показателей (содержание альфа- и гамма-токоферола, ретинола и бета-каротина в крови, содержание альфа-токоферола и ретинола в ЛНП).

Показатели липидного профиля крови, в том числе уровни общего ХС и ЛНП-ХС измерялись энзиматическими методами с использованием стандартных реактивов «Bioscon» («Fluitest») на биохимическом анализаторе FP-901 «Labsystem» (Финляндия). Уровень гомотеинемии определялся методом иммуноферментного анализа с использованием ELISA kits (Axis наборы) на иммуноферментном анализаторе «Униплан» (Россия). Согласно критериям [15-17] в зависимости от уровня гомотеинемии выделяли нормогомотеинемию (<15 мкм/л), умеренную ГЦ (15-30 мкм/л) и среднюю ГЦ (30-100 мкм/л).

Определение динамики Cu^{2+} -зависимого окисления ЛНП *in vitro* и концентрации жирорастворимых антиоксидантов в ЛНП (альфа-токоферола и ретинола) проводилось способами, описанными в работе [18] на спектрофлуориметре «Versafluor» (Bio-Rad, США). Концентрация белка в ЛНП оценивалась по методу Лоури (1951). Анализ содержания МДА и сульфгидрильных (SH-) групп в крови осуществляли спектрофотометрическими методами [19, 20], а концентрация жирорастворимых витаминов-антиоксидантов (альфа-токоферола, гамма-токоферола, ретинола и бета-каротина) в крови - методом высо-

коэффициентной жидкостной хроматографии на микроколоночном хроматографе «Милихром» [21].

Статистический анализ результатов (дескриптивный межгрупповой, корреляционный, регрессионный) проводился с использованием пакета статистических программ SPSS для Windows. Критерием статистической достоверности являлся уровень $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Установлено, что из 159 обследованных мужчин у 91 (57 %) уровень гомотеинемии был меньше 15 мкм/л, а у 68 (43 %) – ГЦ, в том числе у 61 мужчины (38 %) – умеренная (15-30 мкм/л), у 7 мужчин (5 %) – средняя (30-100 мкм/л) ГЦ.

На первом этапе статистического анализа связи ГЦ с окислительно-антиоксидантными изменениями все мужчины были разделены на 3 группы в зависимости от выявленного уровня гомотеинемии (*табл. 1*). Значимых различий в показателях липидного профиля крови (включая уровни общего ХС и ЛНП-ХС), между группами мужчин выявлено не было. Тогда как уровни МДА и SH-групп в крови у лиц со средней ГЦ были соответственно в 1,7 и 1,35 раза выше чем у лиц с нормогомотеинемией. При анализе показателей окислительной резистентности ЛНП *in vitro* не было отмечено различий в исходном уровне продуктов ПОЛ в ЛНП. Однако у лиц со средней ГЦ продолжительность лаг-фазы (индукционного периода) окисления ЛНП в 1,9 раза короче, а уровень продуктов ПОЛ в ЛНП после 2 ч их инкубации с катализатором окисления был в 1,2 раза выше, чем у мужчин с нормогомотеинемией. При изучении уровней жирорастворимых антиоксидантов в крови и в ЛНП значимые различия между группами выявлены только по альфа-токоферолу. Так, при средней ГЦ содержание этого антиоксиданта в крови и в ЛНП в 1,7 и в 2 раза ниже по сравнению со случаями нормогомотеинемии. Аналогичная тенденция отмечена при сравнении уровней ретинола и бета-каротина крови при средней ГЦ, однако эта тенденция не является статистически значимой, что, возможно, обусловлено малочисленностью лиц в этой группе ($n = 7$).

Таким образом, результаты дескриптивного межгруппового анализа окислительно-антиоксидантных показателей мужчин с различными уровнями гомотеинемии свидетельствуют о повышенном уровне продуктов ПОЛ и сниженном содержании альфа-токоферола в крови и в ЛНП при уровне гомотеинемии более 30 мкмоль/л. Полученные данные указывают на сниженную устойчивость ЛНП к окислению *in vitro* при среднем уровне ГЦ. Показатель устойчивости ЛНП к окислению оценивает «предрасположенность» ЛНП к окислительной модификации *in vivo* и интегративно отражает как прооксидантный

потенциал ЛНП (содержание в них потенциальных субстратов ПОЛ - полиненасыщенных жирных кислот, гидроперекисей липидов и др.), так и их антиоксидантный потенциал (содержание токоферолов, ретинола, каротиноидов и др.) [14, 22], что согласуется с данными о сниженном содержании альфа-токоферола в ЛНП при ГГЦ.

На втором этапе статистической оценки связи ГГЦ с окислительно-антиоксидантными изменениями был применен корреляционный анализ (*табл. 2*), который при условиях параметрического и непараметрического распределения признаков выявил прямую связь уровня гомоцистеинемии с содержанием МДА и SH-групп в крови ($p < 0,01$), а также продуктов ПОЛ в ЛНП после инкубации с ионами меди ($p < 0,05$) и обратную связь между уровнями ГЦ крови и альфа-токоферола в ЛНП ($p < 0,01$). Кроме того, значимые коэффициенты корреляции Спирмена определены между уровнем гомоцистеинемии и исходным уровнем продуктов ПОЛ в ЛНП (прямая связь) и продолжительностью лаг-фазы (обратная связь), что отражает связь этих показателей при наличии непараметрического распределения признаков. Таким образом, результаты корреляционного анализа также свидетельствуют о связи показателей окислительно-антиоксидантных нарушений (повышенных уровней ПОЛ в крови и в ЛНП и сниженного содержания альфа-токоферола в

ЛНП) с уровнем гомоцистеинемии.

На третьем этапе статистической оценки связи ГГЦ с окислительно-антиоксидантными изменениями применялся метод линейного регрессионного анализа, при котором уровень ГЦ крови наряду с другими показателями был включен в модель, в качестве независимой переменной, а окислительно-антиоксидантные показатели - поочередно в качестве зависимых переменных. Были выявлены статистически значимые независимые ассоциации уровня гомоцистеинемии с содержанием МДА в крови, уровнями продуктов ПОЛ в ЛНП до и после их инкубации с катализаторами окисления (стандартизованные коэффициенты $B = 0,247, 0,277$ и $0,311$ соответственно, $p < 0,01$), а также концентрацией альфа-токоферола в ЛНП (стандартизованный коэффициент $B = -0,275$, $p < 0,01$). Полученные результаты свидетельствуют о том, что повышение уровней продуктов ПОЛ в крови и в ЛНП и снижение концентрации альфа-токоферола в ЛНП независимо от других показателей ассоциируется с повышением уровня гомоцистеинемии. Следует отметить, что из эндогенных антиоксидантов в ЛНП при индукции окисления первым расходуется альфа-токоферол и играет ключевую роль в механизмах защиты ЛНП от окислительной модификации [14, 22]. В силу этого, обратную независимую ассоциацию между уровнем гомоцистеинемии и концен-

Таблица 1

Средние значения показателей окислительно-антиоксидантных нарушений ($M \pm m$) в зависимости от уровня гомоцистеина крови

Показатель	Уровни гомоцистеинемии (мкмоль/л) **		
	<15,0, (n=91)	15,0-30,0, (n=61)	30,0-100,0, (n=7)
Общий ХС, ммоль/л	6,4±0,09	6,3±0,1	6,7±0,4
ЛНП-ХС, ммоль/л	4,2±0,09	4,2±0,1	4,5±0,3
Уровень МДА крови, нмоль/мл	3,5±0,3	4,0±0,4	5,9±0,5*
Содержание SH-групп в крови, мкмоль/л	1,7±0,1	2,1±0,2	2,3±0,2*
Исходный уровень продуктов ПОЛ в ЛНП, нмоль МДА/мг белка ЛНП	5,2±0,2	5,6±0,2	6,1±0,5
Продолжительность лаг-фазы, мин.	4,9±0,6	4,3±0,5	2,6±0,4*
Уровень продуктов ПОЛ в ЛНП через 2 ч окисления, нмоль МДА/мг белка ЛНП	23,8±0,9	26,5±0,8	27,9±1,1*
Альфа-токоферол крови, мг%	1,2±0,05	1,07±0,07	0,72±0,12*
Гамма-токоферол крови, мг%	0,17±0,02	0,17±0,02	0,16±0,05
Ретинол крови, мкг%	40,7±1,5	40,4±2,4	34,9±7,4
Бета-каротин крови, мкг%	26,0±2,1	23,9±2,7	22,1±8,0
Альфа-токоферол ЛНП, мг/мг белка ЛНП	0,6±0,02	0,5±0,03	0,3±0,05*
Ретинол ЛНП, мг/мг белка ЛНП	0,02±0,001	0,02±0,001	0,02±0,002

** рассчитано согласно методам [15-17]; *отличие от нормогомоцистеинемии при $p < 0,05$; n- количество обследованных мужчин г. Новосибирска

Таблица 2

Корреляционный анализ связи уровня гомоцистеинемии с окислительно-антиоксидантными показателями

Показатель	Уровень гомоцистеинемии	
	Коэффициент корреляции Пирсона	Коэффициент корреляции Спирмена
Общий ХС	0,067, p>0,05	0,041, p>0,05
ЛНП-ХС	0,081, p>0,05	0,112, p>0,05
Уровень МДА крови	0,348*, p<0,01	0,355*, p<0,01
Содержание SH-групп в крови	0,411*, p<0,01	0,377*, p<0,01
Исходный уровень продуктов ПОЛ в ЛНП	0,153, p>0,05	0,244*, p<0,01
Продолжительность лаг-фазы	-0,231, p>0,05	-0,272*, p<0,05
Уровень продуктов ПОЛ в ЛНП через 2 ч окисления	0,192*, p<0,05	0,252*, p<0,05
Альфа-токоферол крови	0,087, p>0,05	0,060, p>0,05
Гамма-токоферол крови	-0,129, p>0,05	-0,078, p>0,05
Ретинол крови	-0,169, p>0,05	-0,113, p>0,05
Бета-каротин крови	0,122, p>0,05	0,041, p>0,05
Альфа-токоферол ЛНП	-0,403*, p<0,01	-0,487*, p<0,01
Ретинол ЛНП	-0,129, p>0,05	-0,139, p>0,05

трацией альфа-токоферола в ЛНП можно объяснить тем, что повышенный уровень ГЦ приводит к его окислению в крови с образованием свободных радикалов [7, 9], индуцирующих процессы ПОЛ в ЛНП и истощающих в них запасы эндогенного альфа-токоферола. Кроме того, выявленная ассоциация уровня гомоцистеинемии с концентрацией альфа-токоферола в ЛНП, отражает общность патофизиологических механизмов метаболических нарушений, обусловленных гипергомоцистеинемией и недостатком или истощением эндогенных запасов альфа-токоферола в крови и в ЛНП, приводящих к активации процесса перекисного окисления липидов.

Выводы

На основе сказанного выше можно сделать следующие выводы:

1. У мужчин г. Новосибирска с уровнем гомоцистеинемии более 30 мкмоль/л по сравнению с мужчинами с уровнем гомоцистеинемии менее 15 мкмоль/л повышен уровень продуктов ПОЛ в крови и ЛНП, а также снижены устойчивость ЛНП к окислению и содержание альфа-токоферола в крови и ЛНП.
2. Выявлены прямые корреляционные связи уровня гомоцистеинемии с содержанием продуктов ПОЛ в крови и ЛНП и обратная связь – с содержанием альфа-токоферола в ЛНП.
3. Обнаружены прямые, независимые от других признаков, ассоциации уровня гомоцистеинемии с уровнями продуктов ПОЛ в крови и ЛНП и обратная независимая ассоциация уровня гомоцистеинемии с содержанием альфа-токоферола в ЛНП.

RELATIONSHIP OF HYPERHOMOCYSTEINEMIA WITH OXIDATIVE/ANTIOXIDATIVE DISTURBANCES IN MEN POPULATION OF NOVOSIBIRSK

Yu. I. Ragino, I. D. Safronov, O. V. Motina, M. V. Ivanova, Yu. P. Nikitin

The aim of study was to evaluate the relationships of hyperhomocysteinemia (HHC) with parameters of oxidative/antioxidative disturbances in blood and in low density lipoproteins (LDL) in population men sampling of Novosibirsk. A screening examination of representative sampling of 159 men 46-69 years old was carried out in the framework of the international project "Determinants of cardio-vascular diseases in the Eastern Europe" with the using of standardized epidemiological and biochemical methods, included evaluation of blood lipid profile parameters, homocysteinemia level, oxidative (blood levels of lipid peroxidation (LPO) products and SH-groups, initial level of LPO products in LDL, resistance of LDL to oxidation in vitro, duration of lag-phase of oxidation) and antioxidative parameters (blood levels of alpha-, gamma-tocopherol, beta-carotene, retinol, LDL contents of alpha-tocopherol and retinol). Homocysteinemia level <15 mkM/l was revealed in 91 men, HHC – in 68 men, included moderate HHC (15-30 mkM/l) - in 61 men and middle HHC (30-100 mkM/l) – in 7 men. Increased levels of LPO products in blood and in LDL and decreased resistance of LDL to oxidation in vitro and alpha-tocopherol contents in blood and in LDL were revealed in men with middle HHC in comparison with men with homocysteinemia level <15 mkM/l. Positive correlations of

homocysteinemia level with levels of LPO products in blood and in LDL and negative correlations of homocysteinemia level with alpha-tocopherol content in LDL were founded. Independent direct associations of homocysteinemia level with levels of LPO products in blood and in LDL and reverse - with alpha-tocopherol content in LDL were also founded.

Литература

1. Оганов Р.Г., Масленникова Г.Я. Проблемы профилактики сердечно-сосудистых заболеваний в России // Кардиология СНГ. 2003. 1. 12-15.
2. Oganov R.G., Maslennikova G.Ya. Problems of prophylaxis of cardiovascular diseases in Russia // Cardiology CIS countries. 2003. 1. 12-15.
3. Stander O., Herrmann W., Pietrzik K. et al. DACH-LIGA Homocystein (German, Austrian and Swiss Homocysteine Society): Consensus Paper on the Rational Clinical Use of Homocysteine, Folic Acid and B-Vitamins in cardiovascular and Thrombotic Diseases: Guidelines and Recommendations // Clin. Chem. Lab. Med. 2003. 41. 10. 1392-1403.
4. Костюченко Г.И., Баркаган З.С. Гипергомоцистеинемия и коронарная болезнь сердца как проблема пожилого возраста // Клиническая геронтология. 2003. 9. 5. 9-12.
5. Kostyuchenko G.I., Barkagan Z.S. Hyperhomocysteinemia and coronary heart disease as an elderly age problem. // Clinical gerontology. 2003. 9. 5. 9-12.
6. Баранова Е.И., Большакова О.О. Клиническое значение гомоцистеинемии // Артериальная гипертензия. 2004. 10. 1. 12-15.
7. Baranova E.I., Bol'shakova O.O. Clinical significance of homocysteinemia // Arterial hypertension. 2004. 10. 1. 12-15.
8. Lewis S.J., Ebrahim S., Smith G.D. Meta-analysis of MTHFR 677→Y polymorphism and coronary heart disease: does totality of evidence support causal role for homocystein and preventive potential of folate? // BMJ. 2005. 88. 1-6.
9. Wald D.S., Law M.R., Wald N.J. and Morris J.K. Serum homocystein and coronary heart disease. Coronary heart epidemiology // Oxford: University press. 2005. 16. 239-250.
10. Welch G., Loscalo J. Homocysteine and atherosclerosis // New Engl. J. Med. 1998. 338. 15. 1042-1050.
11. Bolander-Gouaille C. Focus on homocysteine and the vitamins involved in its metabolism // Springer Verlag, France. 2002. 263 p.
12. Kanani P., Sinkey C., Browning R. et al. Role of oxidant stress in endothelial dysfunction produced by experimental hyperhomocysteinemia in humans // Circulation. 1999. 100. 1161-1168.
13. Tawakol A., Frgione M., Stueblinger M. et al. Homocysteine impairs coronary micro vascular dilator function in humans // Circulation. 2002. 40. 6. 1051-1058.
14. Никитин Ю.П., Рагино Ю.И. Повышенная чувствительность липопротеинов низкой плотности к окислению как фактор риска атеросклероза // Российский кардиологический журнал. 2002. 1. 61-70.
15. Nikitin Yu.P., Ragino Yu.I. Heightened sensibility of lipoproteins of low density to oxidation as an atherosclerosis risk factor // Russian cardiology journal. 2002. 1. 61-70.
16. Mayer E., Jacobsen D., Robinson K. Homocysteine and coronary atherosclerosis // J. Am. Coll. Cardiol. 1996. 27. 517-527.
17. Booth G., Wang E. Preventive health care, 2000 update: screening and management of hyperhomocysteinemia for the prevention of coronary artery disease events // CMA J. 2000. 163. 1. 21-9.
18. Esterbauer H., Gebicki J., Puhl H., Jurgens G. The role lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL // Free Radical Biol. Med. 1992. 13. 341-390.
19. Kang S. Intermediate hyperhomocysteinemia resulting from compound heterozygosity of MTHFR mutation // Am. J. Human Genetic. 1991. 48. 546-552.
20. Warren C. Emergent cardiovascular risk factor: Homocysteine // Prog. Cardiovasc. Nurs. 2002. 17. 35-41.
21. Refsum H., Smith A.D., Ueland P.M. et al. Facts and recommendations about total homocysteine determinations: an expert opinion // Clinical Chemistry. 2004. 1. 1-32.
22. Рагино Ю.И., Воевода М.И., Душкин М.И. и др. Применение новых биохимических способов для оценки окислительно-антиоксидантного потенциала липопротеинов низкой плотности // Клиническая лабораторная диагностика. 2005. 1. 5-9.
23. Ragino Yu.I., Voevoda M.I., Dushkin M.I. etc. Using of new biochemical ways for evaluation of oxidation-antioxidant potential of low density lipoproteins // Clinical laboratory diagnostics. 2005. 1. 5-9.
24. Wayner D.M. Radical-trapping antioxidants in vitro and vivo // Bioelectrochem. and Bioenerg. 1987. 18. 1-3. 219-229.
25. Yagi Y., Matsuda M., Yagi K. Formation of lipoperoxide in isolated sciatic nerve by chionoform-ferric chelate // Experientia. 1976. 32. 7. 905-910.
26. Микичур Н.И., Сафронов И.Д. Микрометод определения различных форм токоферола для оценки компенсаторных и патологических состояний организма // Проблемы оценки и прогнозирования функциональных состояний организма в прикладной физиологии. Фрунзе. 1988. 238-240.
27. Mikichur N.I., Safronov I.D. Micro method of definition of tocopherol different forms for evaluation of organism compensatory and pathologic conditions // Problems of evaluation and prognosis of organism functional status in applied physiology. Frunse. 1988. 238-240.
28. Stocker R., Keaney J.F. Role of oxidative modifications in atherosclerosis // Physiol. Rev. 2004. 84. 1381-1478.