

*На правах рукописи*

**КОВРУГИНА  
Светлана Васильевна**

**ОКИСЛИТЕЛЬНАЯ МОДИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ И  
АНТИОКСИДАНТНАЯ СИСТЕМА ПЛАЗМЫ  
КРОВИ У ПОЖИЛЫХ ЛЮДЕЙ С СОСУДИСТОЙ  
ДЕМЕНЦИЕЙ**

**03.00.04 – биохимия**

**А в т о р е ф е р а т**  
**диссертации на соискание ученой степени**  
**кандидата биологических наук**



**Санкт-Петербург  
2000**

Работа выполнена в Санкт-Петербургском научно-исследовательском психоневрологическом институте имени В.М. Бехтерева.

**Научный руководитель:**

доктор медицинских наук, профессор Дубинина Е.Е.

**Официальные оппоненты:**

кандидат биологических наук, доцент Шведова В.Н.,  
доктор биологических наук, профессор Арутюнян А.В.

**Ведущая организация:** Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени И.П Павлова

Защита диссертации состоится «27» июня 2000 года в 13 часов на заседании Диссертационного совета К 084.63.01 при Санкт-Петербургской государственной химико-фармацевтической академии по адресу: 197376, г. Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, 14.

Автореферат разослан «24» мая 2000 года.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Санкт-Петербургской Государственной химико-фармацевтической академии (197376, г. Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, 4/6).

Ученый секретарь  
Диссертационного совета  
кандидат биологических наук



Н.В. Кириллова

A2000  
7420

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Процессы метаболизма кислорода в организме связаны с образованием активных кислородных соединений, обладающих выраженной реакционной способностью, к которым относятся:  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH^\cdot$ . В нормально функционирующем организме количество генерируемых оксидантов, необходимое для жизненно важных биологических процессов в клетке, регулируется антиоксидантной системой (АОС).

Старение организма связывают с нарастанием молекулярных повреждений мембран и генетического аппарата клетки, вызванных свободными радикалами и снижением функций защитных механизмов. В настоящее время проведено большое количество экспериментальных исследований на животных, подтверждающих свободнорадикальную теорию старения, выдвинутую Д.Харманом (Harman D., 1956, 1981, 1996). В экспериментах на животных показано, что с возрастом увеличивается скорость перекисидации белков, липидов, нуклеиновых кислот, что является причиной необратимых повреждений тканей, в частности, нервной ткани.

В последнее время внимание исследователей привлекают механизмы окисления белков на модельных системах и в тканях, но в отечественной литературе работы, касающиеся окислительной модификации белков, представлены весьма скупо. Окисление белков является более надежным маркером окислительных повреждений, так как образование карбонильных производных происходит быстрее, и они являются более стабильными (Pantke U. и др., 1999). Установлена связь процессов старения и окислительной модификации белков в экспериментах на эритроцитах, фибробластах и гепатоцитах (Stadtman E.R., 1986, 1992; Cao G., Cutler R.G., 1995).

Известно, что старение организма и развитие нейродегенеративных изменений протекает на фоне окислительного стресса (ОС). Окислительный стресс характеризуется нарушением баланса анти- и прооксидантной систем в сторону повышения последней, что выражается в избыточном образовании свободных радикалов и отсутствии мобилизации АОС, а также нарушении сбалансированности защитных компонентов (J.M.McCord, 1996). В настоящее время в литературе активно обсуждается роль ОС в развитии различных нейродегенеративных заболеваний в старческом возрасте: при амиотрофическом латеральном

склерозе, параличе, болезни Паркинсона, болезни Альцгеймера (Evans P., 1993; Ерин А.Н, Гуляева Н.В, 1994, 1995; Buscigho J., 1998). Не исключено, что ОС может являться одним из патогенетических факторов, определяющих вероятность развития сосудистой деменции. Однако, до настоящего времени вопросы комплексного анализа про- и антиоксидантной систем человека в процессе старения остаются малоизученными, а роль ОС в развитии сосудистой деменции в литературе практически не освещена. Поэтому исследование интенсивности ОС по состоянию АОС и металл-зависимой окислительной деструкции белков плазмы крови при нейродегенеративных изменениях у больных старческого возраста, является одним из актуальных вопросов современной биологии и медицины.

**Цель и задачи исследования.** Целью данного исследования являлось изучение интенсивности ОС с использованием комплекса биохимических показателей крови, отражающих состояние АОС и степень окислительной модификации белков, у пожилых людей в процессе старения и при развитии сосудистой деменции.

**Выполнение поставленной цели достигалось решением следующих задач:**

1. Исследовать состояние прооксидантной системы на примере спонтанного и металл-катализируемого окисления (МКО) белков в нативной плазме, используя метод определения карбонильных производных аминокислотных остатков и по степени окисления триптофана и тирозина у людей среднего возраста и пожилых с и без психических расстройств.

2. Определить характер изменения структуры (агрегация, фрагментация) окисленных белков плазмы крови во всех исследуемых группах людей с помощью электрофореза и по уровню образования кислоторастворимых низкомолекулярных пептидов в надосадочной жидкости.

3. Исследовать состояние АОС по активности ее ферментативных и неферментативных компонентов, направленных на дисмутацию  $O_2^-$  и разрушение  $H_2O_2$ , включая глутатионовый цикл в эритроцитах и плазме крови у исследуемых групп людей.

4. Провести сравнительный анализ состояния анти- и прооксидантной систем с целью оценки ОС в процессе старения организма и при развитии сосудистой деменции. Показать значение комплексного исследования биохимических показателей крови человека, характеризующих интенсивность свободно-радикальных процессов, для более

полного установления диагноза и прогнозирования течения сосудистой деменции.

**Научная новизна исследования.** Впервые был проведен всесторонний анализ интенсивности окислительной деструкции белков плазмы крови, позволяющий судить об изменениях не только их первичной структуры, но и об их пространственной ориентации (по агрегации и фрагментации) у пожилых людей с и без психических расстройств.

Впервые выявлена корреляционная зависимость между металл-катализируемой окислительной модификацией белков и степенью нейродегенеративных нарушений мозга при сосудистой деменции у больных старческого возраста. Низкий уровень карбонильных производных белков плазмы крови рассматривается в качестве «специфического маркера» степени сосудистой деменции.

Впервые проведено комплексное исследование основных показателей антиоксидантной системы (ферментативная и неферментативная дисмутация  $O_2^-$ , ферментативное и неферментативное расщепление  $H_2O_2$ ), включая глутатионовый цикл, с использованием биологического материала – плазмы и эритроцитов крови здоровых людей в возрасте 30-40 лет, здоровых пожилых людей и больных с разной степенью сосудистой деменции, позволяющее характеризовать состояние АОС в процессе старения организма и при развитии сосудистой деменции).

Впервые показано нарушение в соотношении активностей компонентов глутатионовой системы (глутатионпероксидаза и глутатионредуктаза) у пожилых людей. Установлена корреляционная зависимость между активностью глутатионредуктазы и степенью выраженности сосудистой деменции у пожилых людей.

#### **Основные положения, выносимые на защиту.**

1. Сравнительный анализ про- и антиоксидантной систем является основной характеристикой ОС, позволяющей оценить его интенсивность в процессе старения и при развитии нейродегенеративных изменений у пожилых людей.

2. Окислительная модификация белков отражает деструктивные изменения организма, связанные с окислительным стрессом, у пожилых людей с и без деменции. Интенсивность металл-зависимого окисления белков является «специфическим маркером» степени психических расстройств при сосудистой деменции.

**Научно-практическая значимость.** Разработан комплекс биохимических показателей крови, отражающих состояние про- и антиоксидантной систем, для оценки степени выраженности ОС у пожилых лю-

дей и пациентов с разной степенью сосудистой деменции. Показатели интенсивности металл-катализируемой окислительной модификации белков плазмы крови и отдельных компонентов антиоксидантной системы, в частности, активность глутатионредуктазы, могут быть использованы в клинической практике для прогнозирования течения сосудистой деменции, а также в качестве «специфических маркеров» выраженности этого заболевания у больных старческого возраста. Полученные результаты могут быть использованы в учебных целях и учтены при разработке критериев диагностики сосудистой деменции у людей пожилого возраста.

**Апробация работы.** Положения диссертации доложены и обсуждены на Всероссийских и международных конференциях: VIII Biennial Meeting International Society for Free Radical Research (Барселона, Испания, 1-5 октября 1996); на конференции, посвященной 150-летию клинического отдела ВМА «Актуальные вопросы клиники, диагностики и лечения» (7-8 апреля Санкт-Петербург, 1997); на II съезде биохимического общества РАН (19-23 мая Москва, 1997); 13<sup>th</sup> Congress of Pathological and Clinical Physiology (Брно, 1998); UNESCO Society for Free Radical Research (Europe) Regulation of Biological Processes by Free Radicals: Role of Antioxidants, Free Radical Scavengers and Chelators (Россия, Москва – Ярославль, 10-13 мая 1998); International Conference on «Superoxide Dismutases: Recent Advances and Clinical Applications» на международной конференции (Франция, Париж, Институт Пастера, 14-15 мая, 1998); Second Internat. Conference on Natural Antioxidants and Anticarcinogens in Nutrition, Health and Disease (Финляндия, Хельсинки, 24-27 июня 1998); на научной конференции, посвященной 100-летию кафедры биохимии СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова. «Фундаментальные и прикладные аспекты современной биохимии» (Россия, Санкт-Петербург, 15-17 октября, 1998); на международной конференции «Свободно-радикальные процессы: экологические, фармакологические и клинические аспекты» (Россия, Санкт-Петербург, 8-10 сентября 1999).

**Структура и объем диссертаций.** Диссертация изложена на 130 страницах машинописного текста и состоит из введения, главы 1 – обзор литературы, главы 2 – материалы и методы исследования, главы 3 – результаты собственных исследований, главы 4 – обсуждение результатов, выводы, практических рекомендаций и списка литературы, который включает в себя 38 отечественных и 145 работ зарубежных авторов. Диссертация иллюстрирована 14 рисунками и 9 таблицами.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследовали 116 человек в возрасте 58-78 лет. Диагностика сосудистой деменции проводилась согласно DSM-IV-критерий старшим научным сотрудником отделения геронтологии НИПИ им. В.М. Бехтерева Коноваловым П.В. Период болезни пациентов ко времени проведения исследования составлял 0,5-5 лет. 83 пациента имели начальную степень деменции. В 33 случаях была диагностирована глубокая деменция. Сравнение проводили с группой 38 практически здоровых людей в возрасте 30-40 лет и 20 пожилыми людьми 58-78 лет без признаков психических расстройств.

Забор крови из локтевой вены проводили утром натощак. В качестве антикоагулянта использовали раствор гепарина.

ПРООКСИДАНТНУЮ СИСТЕМУ организма рассматривали на примере спонтанного и металл-катализируемого окисления белков в нативной плазме по методу Левина (Levine R.L. и др., 1990) в модификации Дубининой Е.Е. (Дубинина Е.Е. и др., 1995). Метод основан на реакции взаимодействия окисленных аминокислотных остатков белков с 2,4-динитрофенилгидразином с образованием 2,4-динитрофенилгидразонов. Интенсивность МКО белков определяли по результатам степени окисления тирозиновых и триптофановых остатков (Davies K.J.A. и др., 1987). Характер изменения структуры окисленных белков (агрегация или фрагментация) определяли по степени образования низкомолекулярных кислоторастворимых пептидов в надосадочной жидкости и с помощью электрофореза по методу Лаемли (Laemmli U.K., 1970) в градиенте полиакриламидного геля с додецилсульфатом натрия.

Для оценки АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ организма анализировалась общая способность плазмы к дисмутации  $O_2^-$  и специфическая активность СОД плазмы и эритроцитов с помощью кверцетинового метода Костюка В.А. с соавторами. (Костюк В.А. и др., 1990). Специфическую активность СОД определяли после предварительной обработки плазмы и эритроцитов смесью этанола, хлороформа и кристаллического  $KH_2PO_4$  по методу Дубининой Е.Е. (Дубинина Е.Е., 1988). Параллельно активность СОД эритроцитов определяли, используя методику с нитросиним тетразолиевым (НСТ) Фрайда (Fried R., 1975). Ферментативное и неферментативное расщепление  $H_2O_2$  в плазме крови определяли по методу Лэфта (Left J.A. и др., 1992) в нашей модификации. Активность каталазы и глутатионредуктазы в эритроцитах крови определяли по методикам Бютлера (Beutler E., 1975). Активность глута-

тионпероксидазы определяли по методу Гавриловой А.Р. и Хмары Н.Ф. (Гаврилова А.Р., Хмара Н.Ф., 1986). Определение уровня окисленного и восстановленного глутатиона в эритроцитах проводили по методике В.П. Чернышева (Чернышев В.П., 1983)

Для трактовки полученных фактических данных вариационные ряды изученных биохимических показателей обрабатывали на персональном компьютере типа IBM, с применением пакета прикладных программ «STATGRAPHICS» версия 3. В зависимости от поставленных задач при обработке применяли методы параметрической и непараметрической статистики (характеристики вариационного ряда, корреляционный анализ по способу главных компонент).

## **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

### **1. ПРООКСИДАНТНАЯ СИСТЕМА ОРГАНИЗМА**

#### **1.1. Спонтанная окислительная модификация белков.**

При анализе спонтанного окисления белков при длине волны  $\lambda$  270 нм не выявлено достоверных различий, характеризующих процессы старения. Уровень карбонильных группировок достоверно возрастает у пожилых людей с начальной стадией деменции по сравнению с контрольной группой 30-40-летних. Данные, полученные при длине волны 363 нм, не обнаружили никаких различий в уровне образовавшихся 2,4-динитрофенилгидразонов плазмы крови во всех группах обследованных людей (табл. 1).

#### **1.2. Металл-катализируемое окисление белков.**

Статистически достоверные изменения при обеих длинах волн выявлены при анализе металл-катализируемого окисления белков плазмы крови. Показано достоверное повышение уровня образовавшихся 2,4-динитрофенилгидразонов в группах здоровых пожилых людей по отношению к контрольной группе людей среднего возраста. В группе больных с деменцией уровень карбонильных производных ниже, чем в группе здоровых пожилых людей. При переходе от начальной стадии заболевания к выраженной деменции уровень 2,4-динитрофенилгидразонов статистически достоверно снижается (табл. 1).

Показана четкая корреляционная зависимость между степенью психических нарушений и уровнем карбонильных производных, образующихся в результате МКО белков. (При анализе продуктов окисления белков, рассчитанных на 1 мл плазмы и 1 мг белка, коэффициент кор-



реляции составлял при длине волны  $\lambda$  270 нм:  $r=0,64$  и  $r=0,68$ , а при длине волны  $\lambda$  363 нм –  $r=0,70$  и  $r=0,70$  соответственно (рис. 1).

Таблица 1  
Окислительная модификация белков плазмы крови у пожилых людей с психическими расстройствами ( $M \pm m$ )

Группы людей	Спонтанная окислительная модификация белков				Металл-катализируемая окислит. Модификация белков			
	$\lambda$ 270 нм		$\lambda$ 363 нм		$\lambda$ 270 нм		$\lambda$ 363 нм	
	1 мл плазм	1 мг белка	1 мл плазм	1 мг белка	1 мл плазм	1 мг белка	1 мл плазм	1 мг белка
1 Здоровые люди 30-40 лет (n=16)	4,00* $\pm 0,22$	55,61* $\pm 3,48$	6,04 $\pm 0,22$	85,67 $\pm 2,75$	34,36* $\pm 1,53$	475,90* $\pm 22,90$	35,38* $\pm 0,59$	489,20* $\pm 10,20$
2 Пожилые люди без деменцией (n=14)	4,46 $\pm 0,57$	63,12 $\pm 8,10$	6,11 $\pm 0,14$	85,25 $\pm 2,09$	50,84* $\pm 3,85$	707,40* $\pm 50,66$	49,23* $\pm 3,23$	685,25* $\pm 41,79$
3 Пожилые люди с деменцией (n=26)	5,06* $\pm 0,34$	71,09* $\pm 4,53$	6,15 $\pm 0,19$	85,46 $\pm 2,60$	40,55* $\pm 0,81$	556,49* $\pm 12,15$	40,31* $\pm 1,23$	560,06* $\pm 14,91$
P <sub>2-1</sub> P <sub>1-1</sub> P <sub>3-2</sub>	<0,02	<0,01			<0,001 <0,001 <0,01	<0,001 <0,001 <0,01	<0,001 <0,001 <0,01	<0,001 <0,001 <0,01
4 Больные с нач п/о синдром (n=12)	5,37 $\pm 0,41$	72,82 $\pm 6,28$	6,22 $\pm 0,28$	83,62 $\pm 4,05$	41,29 $\pm 1,04$	554,10 $\pm 13,00$	43,80* $\pm 1,54$	588,43* $\pm 21,86$
5 Больные с выраженной деменцией (n=14)	4,78 $\pm 0,51$	69,35 $\pm 6,77$	6,10 $\pm 0,27$	87,31 $\pm 3,35$	39,91 $\pm 1,21$	558,87 $\pm 21,14$	37,31* $\pm 1,47$	531,69* $\pm 17,48$
P <sub>5-4</sub>							<0,001	<0,05

### 1.3. Спектрофлуориметрическая регистрация окисления триптофана и образования битирозина.

Окислению за счет АФК подвергаются и отдельные аминокислотные остатки, в частности, тирозиновые и триптофановые. В реакциях, протекающих по типу Фентона, образуются межмолекулярные ковалентные связи между двумя остатками тирозина – стабильные битирозиновые сшивки, которые могут способствовать агрегации окисленных белков. Окисление триптофана отражает процессы фрагментации. Было установлено, что у пожилых людей независимо от психического состояния железо-зависимое образование битирозина в плазме крови в течение 24 часов идет более интенсивно в отличие от группы людей среднего возраста. Железо-зависимое окисление триптофана имело однотипный характер у всех обследованных людей.

### 1.4. Анализ надосадочной жидкости окисленных белков.

Окисленные белки подвергаются структурным изменениям, связанным с фрагментацией, либо агрегацией белковых молекул. Проведенный анализ надосадочной жидкости позволил выявить повышение

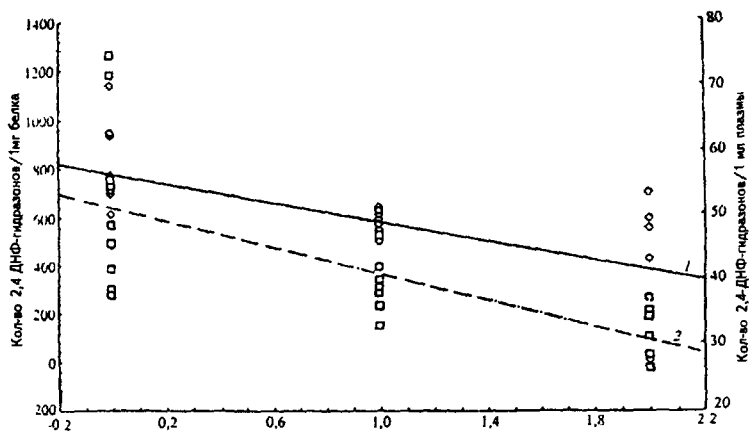


Рис 1 Корреляционная зависимость между уровнем МКО белков плазмы крови и степенью психических расстройств у пожилых людей с деменцией. По вертикали справа – содержание 2,4-ДНФ-гидразонов, рассчитанных на 1 мл плазмы (—) слева – рассчитанных на 1 мг белка (---) По горизонтали степень выраженности психических расстройств в баллах

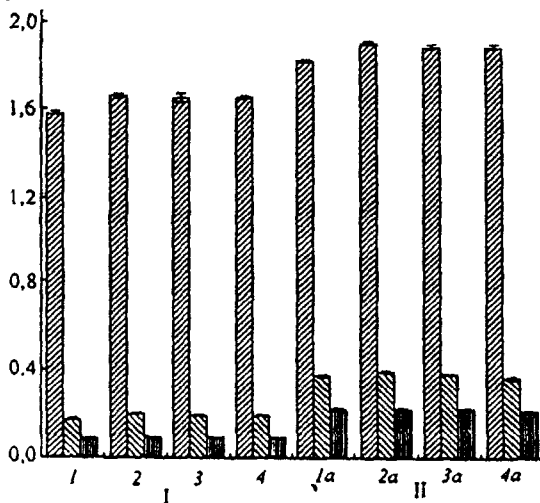


Рис 2 Степень фрагментации окисленных белков плазмы крови у психически здоровых людей и больных с деменцией старше 60 лет. По вертикали – содержание кислоторастворимых фрагментов окисленных белков в единицах оптической плотности на 1 мл плазмы, измеренных при длинах волн 254, 272 и 280 нм По горизонтали группы исследованных I Спонтанное окисление белков плазмы крови 1 – психически здоровых людей старше 60 лет, 2 – больных сосудистой деменцией, 3 – больных с начальным психоорганическим синдромом, 4 – больных с выраженной деменцией II – МКО белков плазмы крови 1а – психически здоровых людей старше 60 лет, 2а – больных с сосудистой деменцией, 3а – больных с начальным психоорганическим синдромом, 4а – больных с выраженной деменцией

уровня кислото-растворимых пептидов за счет МКО по сравнению со спонтанной окислительной деструкцией у всех обследованных пожилых людей. Не было выявлено каких-либо специфических изменений при исследовании надосаочной жидкости у больных с разной степенью деменции (рис. 2).

### **1.5. Электрофорез.**

На электрофореграммах МКО белков плазмы крови всех обследованных людей обнаружены изменения, отражающие наличие процессов фрагментации и агрегации. Но более ярко у пожилых людей проявляются процессы агрегации белковых молекул, особенно у больных с глубокой степенью деменции.

Исследования показали, что для здоровых пожилых людей характерно повышение интенсивности спонтанного и металл-катализируемого окисления белков. В процессе старения организма идут структурные изменения белков тканей за счет их окислительной модификации, связанные с фрагментацией и агрегацией. Структурно измененные белки являются компонентами липофусцинов, которые в виде пигментированных гранул накапливаются внутри клеток. Накопление липофусцинов, содержащих конечные продукты окислительной деструкции биополимеров тканей, является характерным признаком стареющего организма. Окисление белков сопровождается не только нарушением структурной организации белковой молекулы, но и приводит к уменьшению ее биологической роли (снижение каталитической и протеолитической активности, нарушение мембранных структур и рецепторного аппарата клетки).

У пациентов с сосудистой деменцией происходит снижение уровня МКО белков. Это снижение коррелирует со стадией заболевания. Низкий уровень карбонильных производных при глубокой деменции свидетельствует о том, что в результате длительного ОС, в организме происходят необратимые нарушения белковых молекул, приводящие к накоплению их модифицированных форм, не способных принимать участие в МКО, а также истощение запаса неповрежденных белков.

## **2. АНТИОКСИДАНТНАЯ СИСТЕМА ОРГАНИЗМА**

### **2.1. Определение способности плазмы (ферментативной и неферментативной) к дисмутации супероксидного анион-радикала.**

Анализ общей антиоксидантной активности плазмы предполагает, что в процесс дисмутации  $O_2^-$  могут включаться помимо самого фермента другие компоненты плазмы, реагирующие с ним (церулоплазмин, трансферрин, мочева кислота и т.д.). В плазме крови пожилых людей с

и без деменции обнаружено усиление активности неферментативных компонентов. Активность СОД пожилых людей и пациентов с начальной степенью деменции не отличается от ее активности у здоровых людей, но у пациентов с глубокой деменцией отмечается ее достоверное повышение (табл. 2).

Таблица 2

Общая ферментативная и неферментативная способность плазмы крови к дисмутации  $O_2^-$  у пациентов с различной степенью сосудистой деменции

Группы исследуемых людей	Общая ферментная и неферментная $O_2^-$ дисмутац плазмы крови в усл ед на		Активность супероксиддисмутазы плазмы крови в усл ед на	
	1 мл плазмы	1 мг белка	1 мл плазмы	1 мг белка
1 Здоровые люди 30-40 лет	21,83±0,78* n=16	0,28±0,01* n=15	42,93±3,25 n=16	0,60±0,05 n=15
2 Пожилые люди без псих. расстр	26,49±2,37* n=20	0,34±0,03* n=20	39,75±3,28 n=18	0,53±0,05 n=17
3 Пациенты с деменцией	26,55±0,94* n=116	0,35±0,01* n=116	42,74±1,71 n=47	0,63±0,03 n=47
4 Пациенты с начальн. ст деменции	26,53±1,18 n=83	0,35±0,02 n=83	40,79±1,99* n=26	0,59±0,03* n=26
5 Пациенты с глубокой деменцией	26,59±1,50 n=33	0,34±0,02 n=33	48,62±2,02* n=21	0,77±0,03* n=21
$P_{2-1}$	< 0,001	< 0,05		
$P_{3-1}$	< 0,001	< 0,001		
$P_{5-4}$			< 0,01	< 0,001

## 2.2. Определение способности плазмы к расщеплению $H_2O_2$ .

Продуктом супероксиддисмутазной реакции является  $H_2O_2$ , которая расщепляется каталазой. Было обнаружено статистически достоверное повышение неферментативного расщепления  $H_2O_2$  в плазме пожилых людей независимо от психического состояния по сравнению с людьми среднего возраста. В группе пожилых людей с деменцией неферментативное расщепление  $H_2O_2$  выше, чем в группе здоровых пожилых. В зависимости от степени выраженности заболевания никаких различий в активности неферментативного расщепления  $H_2O_2$  выявлено не было. Ферментативное расщепление  $H_2O_2$  в плазме пожилых людей без признаков заболевания снижается по сравнению со здоровыми людьми среднего возраста (при расчете на 1 мг белка). В группе больных с деменцией обнаружено компенсаторное повышение активности каталазы на начальных стадиях заболевания и снижение ее на стадии глубокой деменции (табл. 3).

Таблица 3

**Ферментативное и неферментативное расщепление  $H_2O_2$  в плазме крови больных с разной степенью сосудистой деменции**

Группы людей	Ферментативное расщепление $H_2O_2$ в плазме крови в $mM H_2O_2 \times 10^4$		Неферментативное расщепление $H_2O_2$ в плазме крови в $mM H_2O_2 \times 10^4$	
	1мл плазмы	1 мг белка	1мл плазмы	1 мг белка
1 Здоровые люди 30-40 лет	$13,70 \pm 0,47$ (n = 29)	$0,19 \pm 0,006^*$ (n = 27)	$2,70 \pm 0,19^*$ (n = 25)	$0,035 \pm 0,002^*$ (n = 20)
2 Пожилые люди без деменции	$12,50 \pm 0,51$ (n = 10)	$0,16 \pm 0,007^*$ (n = 10)	$4,84 \pm 0,29^*$ (n = 9)	$0,07 \pm 0,005^*$ (n = 10)
3 Пожилые люди с деменцией	$12,17 \pm 1,19$ (n = 16)	$0,17 \pm 0,02$ (n = 14)	$6,38 \pm 0,55^*$ (n = 16)	$0,08 \pm 0,01^*$ (n = 14)
4 Пожилые люди с начальн ст деменции	$14,39 \pm 1,49$ (n = 10)	$0,20 \pm 0,02^*$ (n = 10)	$6,44 \pm 0,85$ (n = 10)	$0,08 \pm 0,01$ (n = 10)
5 Пожилые люди с глубокой деменцией	$11,24 \pm 0,90$ (n = 13)	$0,15 \pm 0,01^*$ (n = 11)	$6,66 \pm 0,51$ (n = 13)	$0,09 \pm 0,01$ (n = 11)
$P_{2-1}$		< 0,001	< 0,001	< 0,001
$P_{3-1}$			< 0,001	< 0,001
$P_{4-5}$		< 0,05		

Общая способность плазмы к расщеплению  $H_2O_2$  (ферментативная и неферментативная) с возрастом не меняется, как это видно из сравнения полученных данных здоровых людей среднего возраста и пожилых людей без психических расстройств. Но в плазме пожилых людей с деменцией отмечается повышение активности всех компонентов, способных реагировать с  $H_2O_2$ , особенно на начальных стадиях психоорганического синдрома. Это усиление активности происходит, в основном, за счет неферментативного расщепления перекиси водорода, что сопровождается дополнительной генерацией кислородных радикалов, в том числе гидроксильного. У больных с выраженной деменцией снижается общая способность плазмы к расщеплению перекиси водорода вследствие значительного падения ферментативной активности каталазы.

Мы обнаружили, что в процессе старения в плазме происходит компенсаторное повышение активности неферментативных компонентов, что создает угрозу дополнительной генерации свободных радикалов и радикальных продуктов, в том числе особенно опасного гидроксильного радикала. Супероксиддисмутаза, по сравнению с КАТ, оказывается более устойчивым ферментом, и с возрастом ее ферментативная активность в плазме фактически не меняется. Неравномерное угасание активности защитных ферментов в процессе старения приводит к активизации неферментативных компонентов и, как следствие, к дополнительной генерации и накоплению АФК. При развитии деменции

активность СОД возрастает, КАТ по-прежнему остается низкой, это приводит к накоплению избыточной перекиси водорода, которая может легко мигрировать от места образования и принимать участие в реакции по типу Фентона, инициировать апоптоз.

### 2.3. Определение активности супероксиддисмутазы эритроцитов крови.

При исследовании активности эритроцитарной СОД кверцетиновым методом получено достоверное ее снижение в группе здоровых пожилых людей по сравнению с людьми среднего возраста. Было отмечено, что активность СОД несколько повышается в группах больных с начальным психоорганическим синдромом и достоверно повышается у больных с глубокой деменцией по сравнению с пожилыми людьми без психических расстройств (рис. 3).



Рис 3 Активность каталазы (КАТ) и супероксиддисмутазы (СОД) эритроцитов крови.

Данные, аналогичные вышеизложенным, получены при определении активности СОД эритроцитов по методу Фрайда с использованием системы – нитросиний тетразолиевый – феназинметасульфат – НАДН. Активность СОД в группе пожилых людей без психических расстройств достоверно снижалась по сравнению со здоровыми среднего возраста, а у больных с деменцией отмечалось статистически достоверное ее повышение в зависимости от стадии болезни по сравнению со здоровыми пожилыми людьми.

#### **2.4. Определение активности каталазы эритроцитов крови.**

Активность каталазы эритроцитов статистически достоверно ниже в группе пожилых людей по сравнению со здоровыми людьми среднего возраста. Достоверное снижение активности каталазы наблюдалось у пожилых людей с начальной степенью деменции по сравнению со здоровыми пожилыми. В зависимости от степени выраженности заболевания обнаружено повышение активности каталазы у больных с глубокой деменцией по сравнению с начальным психоорганическим синдромом (рис. 3).

Таким образом, нами были обнаружены разноплановые изменения в скорости процесса дисмутации  $O_2$  в эритроцитах и плазме крови пожилых людей и больных с деменцией. Низкая ферментативная активность эритроцитов (КАТ, СОД) связана с истощением АОС в условиях длительного ОС в процессе старения организма. Анализируя показатели активности АО ферментов эритроцитов крови больных с разной степенью деменции, мы видим не только ослабление АОЗ, но и нарушение в соотношении активностей СОД и КАТ. Активность КАТ снижается уже на ранних стадиях заболевания. На фоне практически неизменной активности СОД это приводит к дополнительному увеличению  $H_2O_2$  и других АФК, что в свою очередь сопровождается ускорением процесса мет-Нв-образования, нарушением структурно-функционального состояния клеточных мембран, хрупкостью эритроцитов и усилением гипоксии тканей.

#### **2.5. Определение активности компонентов глутатионового цикла в крови.**

Глутатионовый цикл – основное звено АОС. В наших исследованиях при анализе глутатионпероксидазы обнаружены сезонные колебания, не влияющие на ее активность в процессе старения. Фактически активность глутатионпероксидазы у пожилых людей не отличалась от таковой здоровых 30-40-летних. Не было выявлено изменения уровня окисленного глутатиона в процессе старения. Активность ГР в плазме и эритроцитах крови у пожилых людей достоверно повышалась, но повышения уровня восстановленного глутатиона в эритроцитах отмечено не было.

В группе больных с деменцией отмечено снижение уровня окисленного глутатиона (изменение не достоверно), и повышение активности ГР в плазме и эритроцитах, по сравнению со здоровыми пожилыми людьми. В зависимости от стадии заболевания активность ГР повышалась. Установлена корреляционная зависимость между активностью

глутатионредуктазы и степенью сосудистой деменции. Повышения уровня восстановленного глутатиона у больных с деменцией зарегистрировано не было (рис. 4). Низкий уровень восстановленного глутатиона на фоне высокой активности ГР в эритроцитах может свидетельствовать о его использовании в качестве «ловушки» для радикалов (при этом образуется весьма реакционные тиоловые радикалы), либо о выходе его в плазму, а значит – о нарушении проницаемости эритроцитарной мембраны.

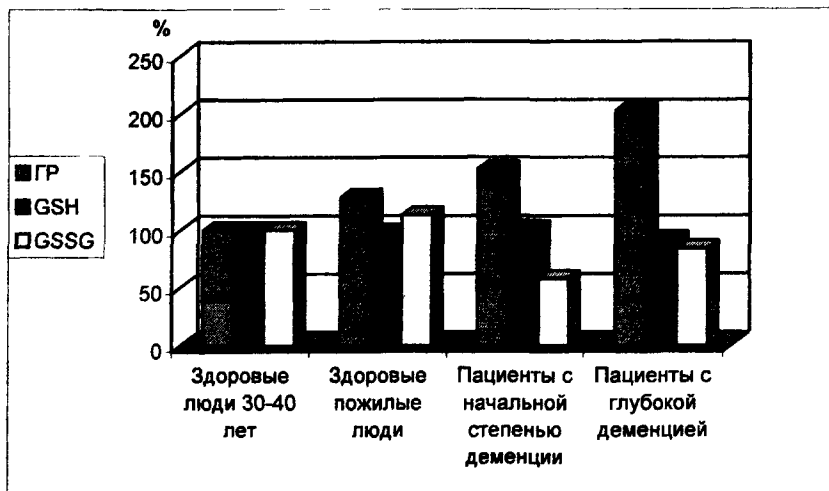


Рис 4 Глутатионредуктаза (ГР, глутатион восстановленный (GSH) и глутатион окисленный (GSSG) в эритроцитах крови.

Итак, в процессе старения организма на фоне ОС отмечается нарастание свободнорадикальных процессов, что отражает сдвиг равновесия анти- и прооксидантной систем в сторону последней. Нарушение баланса про- и антиоксидантной систем при глубокой деменции имеет более выраженный характер. Усиление прооксидантных процессов приводит к ослаблению АОС, ее ферментативных компонентов. Повреждающее действие свободнорадикальных процессов является потенциальным механизмом нейродегенеративных изменений, сопровождающихся поражением тех или иных участков центральной нервной системы. Окислительная деструкция белков, обусловленная развитием гипоксии тканей (в первую очередь в мозговой ткани) в результате нарушения кровообращения, может являться одной из причин структурно-функциональных нарушений мозга при старении организма.



# Окислительный стресс



Поэтому окислительную деструкцию белков можно рассматривать как один из ранних индикаторов поражения тканей при свободно-радикальной патологии. Длительный ОС усугубляет негативные процессы, протекающие при старении, приводя к функциональным нарушениям в нервной ткани и массовой гибели нейронов. Представленная схема окислительного стресса отражает внутриклеточные процессы, которые сопровождают развитие сосудистой деменции (переход от ее начальной стадии к глубокой) (рис. 5). В процессе старения организма и развития нейродегенеративных заболеваний идут структурные изменения белков тканей за счет их окислительной модификации. Низкий уровень карбонильных производных при глубокой деменции говорит об истощении запаса неповрежденных белков в организме, свидетельствует об их необратимых нарушениях и о накоплении модифицированных форм белков, не способных принимать участие в МКО. Анализ полученных показателей про- и антиоксидантной систем позволяет сделать вывод о том, что развитие деменции сопровождается более глубоким состоянием ОС, следствием которого являются структурные нарушения мозговой ткани и переход организма на другой метаболический уровень существования.

Такие глубокие структурные изменения мозговой ткани у пожилых людей с сосудистой деменцией, вызванные длительным окислительным стрессом, можно рассматривать как своего рода «защитную реакцию» организма. В этих условиях нарушается функциональная активность мозга, что сводит до минимума контакт с окружающей средой с целью сохранения организма как биологической системы на самом примитивном уровне существования.

## **ВЫВОДЫ**

1. Выявлены нарушение равновесия анти- и прооксидантной систем в сторону повышения последней и дисбаланс ферментативных и неферментативных компонентов антиоксидантной системы плазмы и эритроцитов крови пожилых людей.

2. У больных с сосудистой деменцией обнаружено снижение уровня металл-катализируемого окисления белков плазмы крови. Наиболее низкие значения металл-катализируемого окисления белков и выраженная агрегация окисленных белковых молекул показаны у больных с глубокой стадией заболевания.

Установлена четкая корреляционная зависимость между степенью психических нарушений и снижением уровня карбонильных производных окисленных белков.

3. У пациентов с сосудистой деменцией более резко выражен дисбаланс ферментативных и неферментативных компонентов антиоксидантной системы крови.

Выявлена корреляционная зависимость активности глутатионредуктазы от степени интеллектуально-мнестических расстройств.

4. Показатели интенсивности металл-катализируемого окисления белков плазмы крови и активность глутатионредуктазы плазмы и эритроцитов могут быть использованы в качестве «специфических маркеров» в клинической практике для прогнозирования течения сосудистой деменции у пожилых людей.

5. Разработан комплекс биохимических методик, позволяющих оценить интенсивность окислительного стресса и его роль в развитии нейродегенеративных изменений мозга. Биохимические показатели про- и антиоксидантной систем крови могут быть учтены при разработке критериев ранней диагностики сосудистой деменции и использованы для более полного установления диагноза и назначения антиоксидантной терапии.

## **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Lipid peroxydation and antioxydant defence of patients with Vascular Dementia // VIII Biennial Meeting International Society for Free Radical Research, 1-5 October, Barcelona, Spain. p. 267. 1996 (соавт.: Е.Е. Дубинина, P.V. Kononov, T.I. Tolstuhina et al.).

2. Роль процессов липопероксидации в развитии деменции в позднем возрасте // Конф. «Актуальные вопросы клиники, диагностики и лечения». Тезисы докл. научн. конф., посвящ. 150-летию клинич. отдела ВМА. Под ред. проф. Ю.А. Шевченко. 7-8 апреля СПб., 1997. – С. 127-128 (соавт.: Е.Е. Дубинина, П.В. Коновалов, Т.И. Толстухина и др.).

3. Антиоксидантная защита крови у больных с сосудистой деменцией // Тезисы II съезда биохимического общества РАН, 19-23 мая Москва. –М., 1997. – Ч. II, – С. 421 (соавт.: Е.Е. Дубинина, П.В. Коновалов, М.Г. Морозова, Т.И. Толстухина).

4. Антиоксидантная активность и процессы пероксидации липидов крови больных с сосудистой деменцией // *Нейрохимия*. – 1998. – Т. 15, № 2. – С. 173-182 (соавт.: Е.Е. Дубинина, П.В. Коновалов, Т.И. Толстухина, М.Г. Морозова).

5. Oxidative stress in patients with neuropsychiatric disorders // 13<sup>th</sup> Congress of Pathological and Clinical Physiology. – Brno, 1998. – P. 20-21 (соавт.: Е.Е. Dubinina, P.V. Konovalov, Y.L. Nuller et al.).

6. Pro- and Antioxidative Systems and Corticosteroids in Aging People with Dementia // *J.Neurochemistry*, supplement 1. – 1998. – V. 71, S13-A, (соавт.: Е.Е. Dubinina, P.V. Konovalov, I.B. Soliternova et al.).

7. Oxidative Damage of proteins and lipid peroxidation in blood plasma of aging people with and without psychoorganic disorders // UNESCO Society for Free Radical Research (Europe) Regulation of Biological Processes by Free Radicals: Role of Antioxidants, Free Radical Scavengers and Chelators. May 10-13. – Moscow-Yaroslavl, 1998. – P. 14 (соавт.: Е.Е. Dubinina, P.V. Konovalov, I.B. Soliternova).

8. Superoxide Dismutase of the blood in aged patients with Dementia // International Conference on «Superoxide Dismutases: Recent Advances and Clinical Applications» Institute Pasteur-Paris. May 14-15. – 1998. – P. 90 (соавт.: Е.Е. Dubinina, A.J. Melenevskii, M.G. Morozova et al.).

9. Antioxidant Defense of Blood in Aged patients with Dementia and Antioxidant effect of the Carotene-essenciale // Second Internat.Conference on Natural Antioxidants and Anticarcinogens in Nutrition, Health and Disease. June 24-27, Helsinki. – 1998. – P. W1/5 (соавт.: Е.Е. Dubinina, P.V. Konovalov, O.A. Kudrjashova, M.G. Morozova).

10. Окислительная деструкция белков, особенности окислительной модификации белков с использованием модельных систем и плазмы крови пожилых людей с деменцией // «Фундаментальные и прикладные аспекты современной биохимии». Труды научн. конф., посвящ. 100-летию каф. биохимии СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова. 15-17 октября. – СПб, 1998. – С. 425-429 (соавт.: Е.Е. Дубинина, Н.В. Леонова, Н.Н. Зыбина и др.).

11. Состояние анти- и прооксидантной систем крови у пожилых больных с психическими расстройствами // «Фундаментальные и прикладные аспекты современной биохимии». Труды научн. конф., посвящ. 100-летию каф. биохимии СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова. 15-17 октября. – СПб, 1998. – С. 476-480 (соавт.: Е.Е. Дубинина, П.В. Коновалов, О.А. Кудряшова, М.Г. Морозова).

12. Oxygen radical mediated modification of a proteins and neurodegenerative disorders in aged patients // *Free Radic. Biol. & Med.* – 1998. – V. 25, Supplement 1. – P. 111 (соавт.: E.E. Dubinina, N.V. Leonova, P.V. Konovalov et al.).

13. Окислительная модификация белков плазмы крови у больных с сосудистой деменцией // *Укр. Биохим. Журнал.* – 1999. – Т. 71, № 6. – С. 41-47 (соавт.: Е.Е. Дубинина, И.Б. Солитернова, Н.Н. Зыбина и др.).

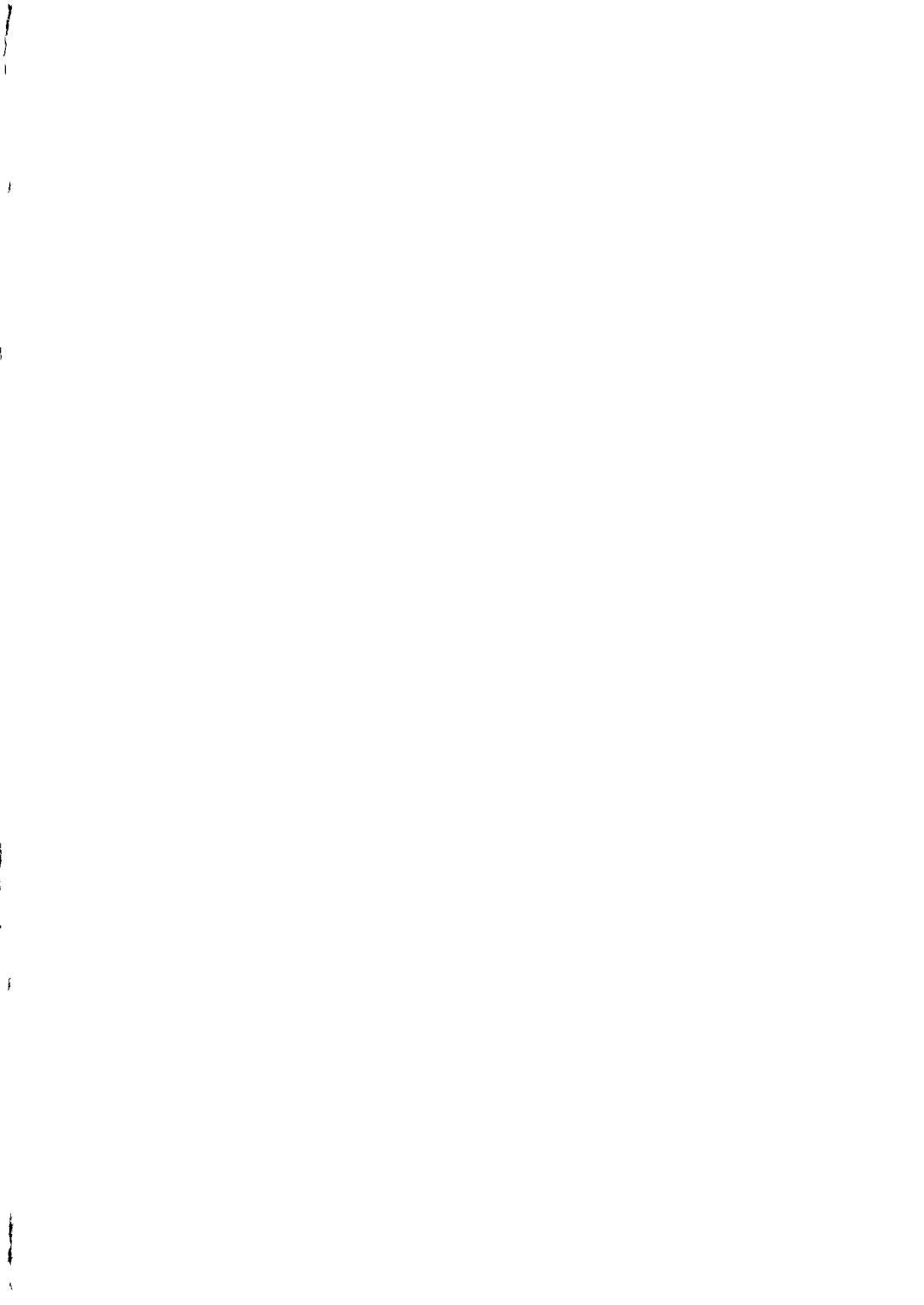
14. Окислительная модификация очищенных белков и белков плазмы крови у пожилых людей с сосудистой деменцией // *Свободно-радикальные процессы: экологические, фармакологические и клинические аспекты. Междунар. конф. СПб, 8-10 сент. Цитология.* – 1999. – Т. 41, № 9. – С. 785 (соавт.: Е.Е. Дубинина, П.В. Коновалов, Н.В. Леонова и др.).

КОВРУГИНА С.В. Окислительная модификация белков и антиоксидантная система плазмы крови у пожилых людей с сосудистой деменцией // Автореф. дисс. ... канд. биол. наук.: 03.00.04. – СПб.: Изд-во НИИХ СПбГУ, 2000. – 21 с.

---

Лицензия ЛР № 040815 от 22 05 97

Подписано в печать с оригинал-макета 18 05 2000 Объем 1 усл п л  
Гарнитура таймс Бумага офсетная Печать ризогр Тираж 100 экз Заказ 1394  
Отпечатано в отделе оперативной полиграфии НИИХ СПбГУ  
СПб, Университетский пр, 2



A2000

7420.

7120