

УДК 577.334

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА МЕТОДОМ ЭПР-СПЕКТРОСКОПИИ У ПАЦИЕНТОВ С СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

*А.П. Ложкин, Т.Б. Биктагиров, П.В. Зеленихин,
В.А. Абдульянов, Р.Н. Хайруллин*

Атеросклероз лежит в основе широкого спектра сердечно-сосудистых заболеваний и занимает лидирующее место по смертности в западных странах. Окислительный стресс вносит значительный вклад в патофизиологию атеросклероза. Несмотря на то что молекулярные механизмы ферментативной генерации активных форм кислорода при атерогенезе до сих пор до конца не изучены и остаются объектом актуальных исследований, прогностические свойства окислительного стресса у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями не вызывают сомнений. В настоящей работе мы демонстрируем применение систематического подхода к определению окислительного стресса у пациентов сердечно-сосудистого профиля с использованием спектроскопии ЭПР и статистических методов анализа данных. Описанный подход позволяет производить не только качественную и количественную оценки уровня окислительного стресса, но и оценку активности антиоксидантной системы.

Ключевые слова: атеросклероз, окислительный стресс, супероксид анион, спиновый зонд, ЭПР.

Введение

Атеросклероз как основная причина ишемической болезни сердца и инфаркта миокарда, по заболеваемости и смертности занимает лидирующее место в развитых странах [1]. Это хроническое воспалительное заболевание, затрагивающее артерии средних и крупных размеров и характеризующееся образованием атеросклеротических бляшек. Бляшки состоят из некротического ядра, кальцифицированных регионов, скопления липидов, провоспалительных клеток, таких как лейкоциты, клетки гладкой мускулатуры и эндотелиальные клетки. Значительное количество исследований свидетельствует о том, что воспаление способствует атерогенезу на всех его стадиях, таких как 1) инициация, 2) прогрессия и 3) дестабилизация атеромы и развитие осложнений. Несмотря на то что воспалительная природа атеросклероза установлена более десятилетия назад, до сих пор отсутствуют подходы полноценной противовоспалительной и иммуномодулирующей терапии данного заболевания [2, 3].

Окислительный стресс также участвует в развитии сердечно-сосудистых патологий [4]. Под термином «окислительный стресс» чаще всего понимают состояние дисбаланса между продукцией и детоксикацией активных форм кислорода (АФК), что приводит к значительному усилению генерации АФК в клетках и межклеточном пространстве. Увеличение концентраций АФК, в частности

супероксид аниона и пероксида водорода, ведет к окислению липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) [5], инактивации оксида азота, производимого клетками эндотелия, и к эндотелиальной дисфункции. Кроме того, АФК являются внеклеточными сигнальными молекулами, увеличение их концентраций способствует стимуляции воспалительных сигнальных путей и образованию атеросклеротического повреждения в стенке сосуда [6]. Вероятно, повышенные концентрации АФК причастны к развитию различных стадий атерогенеза – начиная от эндотелиальной дисфункции, когда атеросклеротическое повреждение еще не диагностируемо, через рост повреждения к разрыву бляшки. В стенке сосуда присутствует несколько источников АФК. К примеру, в производстве АФК участвуют переходные металлы [7]. Так, показано, что участие ионов меди и железа в реакции Фентона способствует развитию атеросклероза [8]. Однако основными источниками АФК считаются ферментные системы, такие как NADPH-оксидазы и комплексы митохондриальной транспортной цепи [9]. В действительности существует множество ферментных систем, способных влиять на окислительный стресс, к их числу можно отнести ксантиноксидазы, циклооксигеназы, липооксигеназы, NO-синтазы и т. д. [10–12].

К наиболее важным ферментам, участвующим в детоксикации АФК, относятся супероксид дисмутаза и каталаза. Однако в интима артерий имеются участки со сниженной антиоксидантной защитой [13], кроме того, ослабление антиоксидантной активности способствует атерогенезу [14]. Как в клинических исследованиях, так и на модели атеросклероза мышей показано, что введение в питание антиоксидантов ведет к предотвращению развития атеросклероза [6]. Однако по ряду причин данный аспект до сих пор остается дискуссионным [15]. С другой стороны, диагностика окислительного стресса и состояния системы антиоксидантной защиты организма представляется весьма перспективной для прогнозирования сердечно-сосудистых событий. Несмотря на то что молекулярные механизмы ферментативной генерации АФК при атерогенезе до сих пор до конца не изучены и остаются объектом актуальных исследований, прогностические свойства окислительного стресса у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями не вызывают сомнений. Именно поэтому анализ взаимосвязи между образованием АФК и последующими острыми сосудистыми событиями имеет принципиальное значение. К примеру, тромбин-индуцированная неинтимальная гиперплазия и рестеноз. Эти процессы не обходятся без участия активных форм кислорода. Установлено, что миграция клеток гладкой мускулатуры и рестеноз – это NADPH-оксидазозависимые процессы [16], стимулируемые тромбином [17]. Ли с соавторами на модели крыс установили, что нокаут гена, кодирующего NADPH оксидазу 2, препятствует рестенозу [18].

ЭПР-спектроскопия в сочетании с методом спиновых ловушек и спиновых зондов позволяет с высокой точностью регистрировать активные формы кислорода и азота, образующиеся в системе. В последние годы для детектирования супероксид-радикала успешно используются циклические гидроксилламинны [19]. Эти соединения взаимодействуют со свободными радикалами с образованием стабильных парамагнитных продуктов, как правило, нитроксильных радикалов. Вследствие высокой скорости реакции с супероксидом и стабильности образующегося при этом нитроксильного радикала они хорошо подходят для решения

поставленной задачи. Целью настоящего исследования стала разработка математических основ определения окислительного стресса у пациентов сердечно-сосудистого профиля методом ЭПР и их интерпретации.

1. Материалы и методы

Забор образцов. Образцы стенок аорты, содержащих атеросклеротические повреждения, и образцы здоровых тканей были получены в результате патолого-анатомической экспертизы согласно требованиям Этического комитета Межрегионального клинико-диагностического центра (г. Казань). Образцы промывали физиологическим раствором и помещали в жидкий азот сразу после аутопсии, размораживали непосредственно перед проведением измерений.

Определение окислительного состояния тканей сосуда методом ЭПР. Для определения АФК использовали спиновый зонд – циклический гидроксилламин N-(1-гидрокси-2,2,6,6-тетраметилпиперидин-4-ил)-2-метилпропанамид (ТМТН) производства Новосибирского института органической химии им. Н.Н. Ворожцова, аналогичный широко применяющимся зондам для определения супероксида по генерации стабильного нитроксильного радикала [19]. В результате реакции с АФК спиновый зонд окисляется с образованием нитроксильного радикала ТМТ[•].

Образцы стенок аорты гомогенизировали на диспергаторе ULTRA-TURRAX® Tube Drive (IKA, Германия) с одноразовыми стерильными герметично закрывающимися пробирками с элементом «ротор – статор» (DT-20) в 5 мл фосфатного буфера 5 мин при 6000 об/мин. После этого в пробу гомогената образца вводили 3 мМ десфероксамина (Sigma, США) и раствор ТМТН (10 мМ). Рабочая концентрация ТМТН во всех экспериментах составляла 1 мМ. Десфероксамин использовался для предотвращения окисления ТМТН, катализируемого редокс-активными ионами железа (содержащимися в фосфатном буфере в следовых концентрациях).

В качестве контроля использовали реакцию окисления ксантина ксантиноксидазой. Реакцию начинали внесением ксантина – 100 мМ и ксантиноксидазы – 100 ед./мл (Sigma, США), за одну единицу активности принято количество фермента, превращающее 1 мкмоль субстрата в минуту.

Для регистрации спектров ЭПР использовали спектрометр Elexsys E680 (Bruker, Германия). Измерения проводили в X-диапазоне (9.8 ГГц) при комнатной температуре, амплитуде модуляции 0.5 Гс, постоянной времени 327 мс, времени сканирования 1.4 мин. Применялись стеклянные капилляры диаметром 0.6 мм (Sigma, США).

Уровень окислительного стресса в образцах оценивали на основании наблюдения динамики накопления радикала ТМТ[•] в гомогенизированном образце. При этом учитывалось, что концентрация свободного нитроксильного радикала в водном растворе при комнатной температуре пропорциональна интенсивности соответствующего сигнала ЭПР.

Алгоритм обработки спектров. Профиль концентрации нитроксида восстанавливался из временной зависимости спектров ЭПР в результате факторизации матрицы данных $A_{(m \times n)}$, которая строилась для каждой серии из m спектров ЭПР (столбцы), состоящих из n точек (строки) и для которой справедливо представление

$$A_{(n \times m)} = s_{(n \times 1)} c_{(m \times 1)}^T + E_{(n \times m)}, \quad (1)$$

где вектор s содержит «чистый» спектр ЭПР радикала ТМТ $^{\bullet}$, c^T – транспонированный вектор, содержащий профиль концентрации ТМТ $^{\bullet}$, E – матрица шума. Это представление справедливо, если спектроскопические параметры и форма линии сигналов ЭПР нитроксильных радикалов, образующихся в системе, не изменяются в пределах серии измерений.

Факторизация матрицы данных проводилась по процедуре сингулярного разложения, которая позволяет представить ее в виде (для $m < n$)

$$A = U \Sigma V^T,$$

где $U_{(m \times n)}$ и $V_{(n \times m)}$ – матрицы, для которых справедливы условия ортогональности $U^T U = I$ и $V^T V = V V^T = I$; Σ – диагональная матрица, содержащая сингулярные значения σ_i ($i = 1, 2, \dots, m$) матрицы A , размещенные в убывающем порядке. Информацию о сигнале содержат лишь столбцы u_1 и v_1 матриц U и V , соответствующие первому сингулярному значению, поэтому в качестве оценки вектора концентраций принимается соотношение

$$\hat{c} = \sigma_1 v_1 \quad (2)$$

при этом вектор \hat{c} спектра ЭПР по определению оказывается нормирован в соответствии с условием $\hat{c}^T \hat{c} = u_1^T u_1 = 1$.

Аппроксимация восстановленного профиля концентрации аналитической функцией проводилась с помощью метода наименьших квадратов.

2. Результаты и их обсуждение

На основании данных патологоанатомической экспертизы образцы были распределены в три группы: интактные образцы, образцы атеросклеротических бляшек с уплотнением комплекса интима-медия, не содержащих значительных минеральных отложений, и кальцифицированные образцы со значительным уплотнением стенки сосуда.

В ходе работы для серии образцов стенок аорты были получены временные зависимости спектра ЭПР нитроксильного радикала ТМТ $^{\bullet}$. Прежде всего было отмечено, что образование ТМТ $^{\bullet}$ наблюдается во всех образцах, в том числе в образце интактной аорты (рис. 1). При этом введение избыточной концентрации десфероксамина не приводило к подавлению генерации радикала (данные не представлены). Подобное спонтанное образование нитроксильного радикала уже отмечалось в некоторых работах, оно может быть не связано с АФК [19] либо связано с конститутивно активными оксидазами, например с NOX4 [9]. В каждом эксперименте производился также контроль окисления ТМТН в базовом растворе (10 мМ). Было установлено, что начальная концентрация радикала при введении в гомогенат образца пренебрежимо мала.

Для анализа экспериментальных данных в работе принималась модель химической системы, включающей реакцию образования свободного радикала, конкурирующие реакции взаимодействия, производящегося в системе свободного радикала со спиновым зондом (в избыточной концентрации) и антиоксидантами, а также реакцию восстановления нитроксильного радикала до соответствующего гидроксиламина.

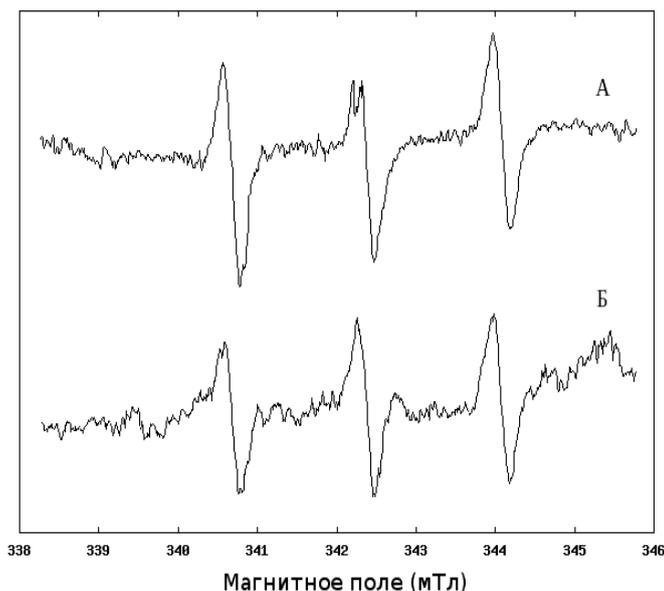


Рис. 1. Спектры ЭПР спинового зонда ТМТН (1 мМ) в фосфатном буфере (А), в гомогенате образца стенки аорты, содержащей умеренные атеросклеротические повреждения, без добавления десфероксамина (Б). Спектры записаны в X-диапазоне при комнатной температуре через 20 мин после введения ТМТН в гомогенат

Для такой системы решение соответствующих кинетических уравнений приводит к следующему выражению:

$$[\text{ТМТ}^{\bullet}] = a - b \exp(-rt), \quad (3)$$

где введены обозначения

$$a = k_R k_{\text{ТМТН}} [\text{ТМТН}] / (k_{\text{ТМТН}} [\text{ТМТН}] + k_{\text{АОХ}}) / r,$$

$$b = k_{\text{ТМТН}} [\text{ТМТН}] / (k_{\text{ТМТН}} [\text{ТМТН}] + k_{\text{АОХ}}) (k_0 / r - [\text{R}^{\bullet}]_0).$$

Здесь k_R – скорость образования свободного радикала, $[\text{ТМТН}]$, $[\text{ТМТ}^{\bullet}]$, $[\text{R}^{\bullet}]$ – концентрации спинового зонда, нитроксильного радикала и свободного радикала соответственно, $[\text{R}^{\bullet}]_0$ – начальная концентрация свободного радикала (в момент введения зонда). Начальная концентрация нитроксильного радикала принималась равной нулю. Тогда полуэмпирический параметр скорости образования свободного радикала задается выражением

$$V = ra = k_R k_{\text{ТМТН}} [\text{ТМТН}] / (k_{\text{ТМТН}} [\text{ТМТН}] + k_{\text{АОХ}}). \quad (4)$$

Аппроксимация профиля концентрации, определенного в соответствии с формулой (2), экспоненциальной функцией (3) позволяет использовать для количественного сравнения экспериментальных данных скорость V образования радикала ТМТ[•] (которая фактически характеризует наклон начального линейного участка экспоненциальной кривой). Как видно из формулы (4), величина V зависит от скорости генерации АФК в системе и скорости восстановления АФК (в том числе под действием антиоксидантов).

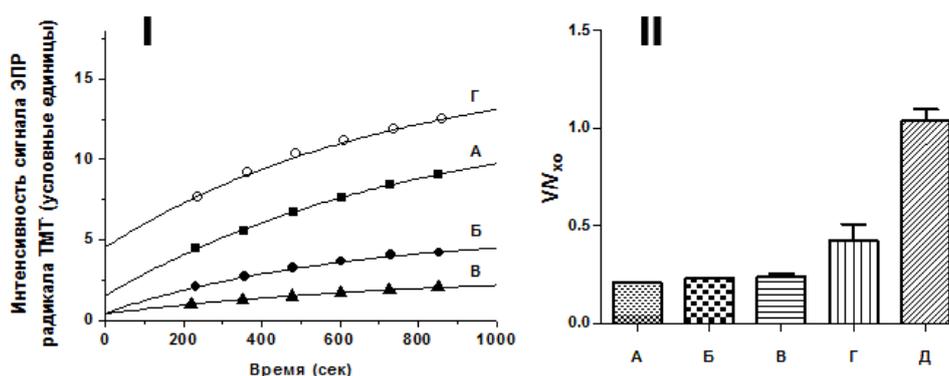


Рис. 2. Анализ временной зависимости спектров ЭПР нитроксильного радикала. (I) динамика накопления нитроксильного радикала ТМТ^{*}: А – реакция ксантин/ксантиноксидаза в фосфатном буфере, Б – реакция ксантин/ксантиноксидаза в гомогенате образца стенки аорты, содержащей умеренные атеросклеротические повреждения, В – гомогенат стенки аорты, содержащей умеренные атеросклеротические повреждения, без запуска реакции, Г – гомогенат кальцифицированной бляшки без запуска реакции. Кривые, изображенные сплошными линиями, построены с помощью параметров, полученных в результате аппроксимации. (II) скорости окисления спинного зонда ТМТН в образцах стенок аорты: А, В – образцы интактной аорты ($n = 1$) и атеросклеротических бляшек ($n = 4$), Б, Г – ксантиноксидазная реакция в образцах интактной аорты ($n = 1$) и атеросклеротических бляшек ($n = 4$), Д – образцы кальцифицированных атеросклеротических бляшек ($n = 3$). V и V_{Ox} – скорости образования радикала ТМТ^{*} в пробе образца и контрольной ксантиноксидазной реакции соответственно (см. формулу (4))

Результаты анализа динамики накопления нитроксида ТМТ^{*} в гомогенизированных образцах приведены на рис. 2. В образце интактной аорты и образцах стенок аорты с умеренными атеросклеротическими повреждениями образование нитроксильного радикала происходило с существенно меньшей скоростью, чем в системе ксантин/ксантиноксидаза. Кроме того, в этих образцах при запущенной реакции окисления ксантина ксантиноксидазой наблюдалось значительное подавление образования нитроксида по сравнению с контрольной реакцией в фосфатном буфере.

Однако в образцах с поздней стадией атеросклеротических повреждений наблюдалась существенно более высокая скорость образования радикала ТМТ^{*}, близкая по величине к соответствующему показателю для контрольной реакции ксантин/ксантиноксидаза.

Можно предположить, что образование нитроксильного радикала в указанных образцах связано с функционированием в них ферментативных систем, генерирующих АФК. Среди всего разнообразия АФК продуцирующих систем NADPH-оксидазы рассматриваются как наиболее важные в связи с их участием в формировании сосудистых патологий [9]. Синтез активных форм кислорода данным типом ферментов впервые был обнаружен у фагоцитирующих клеток в 1999 г. [20]. Оказалось, существует множество гомологов субъединиц NADPH-оксидаз в различных типах клеток и тканей [21, 22]. К настоящему времени идентифицировано 7 гомологов NOX вместе с гомологами регуляторных субъединиц NADPH-оксидаз. Две из них уже протестированы в модели атеросклероза мышей. NOX1 экспрессируется в первую очередь в клетках гладкой мускулатуры, белок

не активен в обычных условиях [9]. Супрессия активатора NOX1 снижала, в то время как повышение уровня экспрессии усиливало генерацию АФК, индуцированную тромбообразованием. Локальное усиление экспрессии Nox1A способствовало неоинтимальной гиперплазии сонных артерий у мышей [23]. NOX2 обнаружен у эндотелиальных клеток, фибробластов адвентиции, циркулирующих макрофагов [9]. Сравнительно недавно Юджинс с соавторами опубликовали неопровержимое доказательство того, что NOX2 участвует в продукции супероксида, причастен к снижению биодоступности оксида азота и формированию ранних стадий атеросклеротического повреждения у ApoE^{-/-} мышей [24]. NOX4 экспрессируется различными клетками стенки сосуда: клетками эндотелия, адвентиции, ГМК [23]. NOX1 и NOX2 инактивированы в обычных условиях, в то время как NOX4 конститутивно активен [9].

Таким образом, мы полагаем, что представленная методика в общем случае позволяет получить не только качественную информацию об образовании в образцах тканей АФК, но и количественные оценки уровня окислительного стресса и активности антиоксидантной системы.

Использованный в работе циклический гидроксилламин ТМТН обладает рядом преимуществ перед «традиционными» спиновыми ловушками, такими как диметил-пирролин-N-оксид (DMPO) и его структурными аналогами. В первую очередь это касается относительно высокой стабильности соответствующего нитроксильного радикала ТМТ[•]. Однако стабильность радикала в общем случае зависит от состава системы (в частности, от содержания химических восстановителей). По этой причине не всегда надежно измерение спектра по достижении химического равновесия (горизонтальный участок экспоненциальной кривой), поскольку его положение, очевидно, зависит от скорости восстановления нитроксильного радикала до соответствующего гидроксилламина. В свою очередь, стабильность нитроксильного радикала определяется составом исследуемой системы (в частности, содержанием химических восстановителей) и часто оказывается неодинаковой для разных биологических образцов.

Установлено, что более предпочтительным является измерение временной зависимости спектра ЭПР нитроксильного радикала с последующим кинетическим анализом. Время записи каждого спектра следует при этом задавать минимально возможным, поскольку в противном случае концентрация радикала может сильно возрасть за время сканирования, что будет приводить к искажению спектра и тем самым затруднит интерпретацию результатов.

С другой стороны, малое время сканирования спектра приводит к относительно высокому отношению сигнал/шум. Использованный в работе алгоритм выделения временной зависимости концентрации ТМТ[•] из серии спектров, основанный на методах многомерного анализа данных, позволяет преодолеть эту проблему. Однако применение алгоритма ограничивается случаем наблюдения одного парамагнитного соединения, и при одновременном образовании в системе нескольких ЭПР-детектируемых радикалов потребуется его модификация.

Другим аспектом работы со сложными биологическими системами является то обстоятельство, что ее состав и схема протекающих в ней реакций, как правило, неизвестны. Это затрудняет детальный анализ химической кинетики, предполагает ряд допущений и определяет актуальность дальнейших исследований.

В настоящее время спектроскопия ЭПР в сочетании с техникой спиновых ловушек и спиновых зондов является одним из наиболее точных методов количественного определения активных форм кислорода и азота в сложных биологических системах. Мы ожидаем, что разработанный в работе подход может оказаться перспективным с точки зрения анализа уровня окислительного стресса и активности антиоксидантной системы в образцах ткани либо крови при проведении медицинских исследований.

Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной в рамках государственной поддержки Казанского (Приволжского) федерального университета в целях повышения его конкурентоспособности среди ведущих мировых научно-образовательных центров и при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 12-04-31022 мол_а).

Литература

1. *Lloyd-Jones D.M.* Cardiovascular risk prediction: basic concepts, current status, and future directions // *Circulation*. – 2010. – V. 121, No 15. – P. 1768–1777. – doi: 10.1161/circulationaha.109.849166.
2. *Libby P.* Inflammation in atherosclerosis // *Nature*. – 2002. – V. 420. – P. 868–874.
3. *Hansson G.K.* Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease // *N. Engl. J. Med.* – 2005. – V. 352, No 16. – P. 1685–1695.
4. *Papaharalambus C.A., Griendling K.K.* Basic mechanisms of oxidative stress and reactive oxygen species in cardiovascular injury // *Trends Cardiovasc. Med.* – 2007. – V. 17, No 2. – P. 48–54. – doi: 10.1016/j.tcm.2006.11.005.
5. *Berliner J.A., Heinecke J.W.* The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis // *Free Radic. Biol. Med.* – 1996. – V. 20. – P. 707–727.
6. *Jialal I.* Evolving lipoprotein risk factors: lipoprotein(a) and oxidized low-density lipoprotein // *Clin. Chem.* – 1998. – V. 44, Pt. 2. – P. 1827–1832.
7. *Rajendran R., Ren M., Ning P., Tan Kwong Huat B., Halliwell B., Watt F.* Promotion of atherogenesis by copper or iron – which is more likely? // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2007. – P. 353, No 1. – P. 6–10.
8. *Brewer G.J.* Iron and copper toxicity in diseases of aging, particularly atherosclerosis and Alzheimer's disease // *Exp. Biol. Med.* (Maywood). – 2007. – V. 232, No 2. – P. 323–335.
9. *Madamanchi N.R., Runge M.S.* NADPH oxidases and atherosclerosis: unraveling the details // *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* – 2010. – V. 298, No 1. – P. H1–H2. – doi: 10.1152/ajpheart.01020.2009.
10. *Madamanchi N.R., Runge M.S.* Mitochondrial dysfunction in atherosclerosis // *Circ. Res.* – 2007. – V. 100. – P. 460–473. – doi: 10.1161/01.res.0000258450.44413.96.
11. *Li J.M., Shah A.M.* Endothelial cell superoxide generation: regulation and relevance for cardiovascular pathophysiology // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* – 2004. – V. 287, No 5. – P. 1014–1030.
12. *Ballinger S.W.* Mitochondrial dysfunction in cardiovascular disease // *Free. Radic. Biol. Med.* – 2005. – V. 38, No 10. – P. 1278–1295.
13. *Steinberg D.* Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance // *J. Biol. Chem.* – 1997. – V. 272, No 34. – P. 20963–20966.
14. *Faraci F.M., Didion S.P.* Vascular protection: superoxide dismutase isoforms in the vessel wall // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2004. – V. 24, No 8. – P. 1367–1373.

15. *Yucel D., Senes M., Topkaya B.C., Zengi O.* Oxidative / nitrosative stress in chronic heart failure: A critical review // *Turk. J. Biochem.* – 2006. – V. 31, No 2. – P. 86–95.
16. *Qin H.D., Huang D., Weng X.D., Xu F.* Upregulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and NADPH oxidases are involved in restenosis after balloon injury // *J. Cell. Physiol.* – 2009. – V. 221, No 3. – P. 387–393. – doi: 10.1002/jcp.21865.
17. *Vendrov A.E., Madamanchi N.R., Hakim Z.S., Rojas M., Runge M.S.* Thrombin and NAD(P)H oxidase-mediated regulation of CD44 and BMP4-Id pathway in VSMC, restenosis, and atherosclerosis // *Circ. Res.* – 2006. – V. 98, No 10. – P. 1254–1263.
18. *Li J.M., Newburger P.E., Gounis M.J., Dargon P., Zhang X., Messina L.M.* Local arterial nanoparticle delivery of siRNA for NOX2 knockdown to prevent restenosis in an atherosclerotic rat model // *Gene Ther.* – 2010. – V. 17, No 10. – P. 1279–1287. – doi: 10.1038/gt.2010.69.
19. *Fink B., Dikalov S., Bassenge E.* A new approach for extracellular spin trapping of nitroglycerin-induced superoxide radicals both in vitro and in vivo // *Free Radic. Biol. Med.* – 2000. – V. 28, No 1. – P. 121–128.
20. *Suh Y.A., Arnold R.S., Lassegue B., Shi J., Xu X., Sorescu D., Chung A.B., Griendling K.K., Lambeth J.D.* Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1 // *Nature.* – 1999. – V. 401. – P. 79–82.
21. *Runge M.S., Molnar K., Madamanchi N.R.* “Old” hearts and arteries: the role of oxidative stress // *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.* – 2010. – V. 121. – P. 52–58.
22. *Benov L.* How superoxide radical damages the cell // *Protoplasma.* – 2001. – V. 217, No 1–3. – P. 33–36.
23. *Niu X.L., Madamanchi N.R., Vendrov A.E., Tchivilev I., Rojas M., Madamanchi C., Brandes R.P., Krause K.H., Humphries J., Smith A., Burnand K.G., Runge M.S.* Nox activator 1: a potential target for modulation of vascular reactive oxygen species in atherosclerotic arteries // *Circulation.* – 2010. – V. 121, No 4. – P. 549–559. – doi: 10.1161/circulationaha.109.908319.
24. *Judkins C.P., Diep H., Broughton B.R., Mast A.E., Hooker E.U., Miller A.A., Selemidis S., Dusting G.J., Sobey C.G., Drummond G.R.* Direct evidence of a role for Nox2 in superoxide production, reduced nitric oxide bioavailability, and early atherosclerotic plaque formation in ApoE^{-/-} mice // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2010. – V. 298, No 1. – P. H24–H32. – doi: 10.1152/ajpheart.00799.2009.

Поступила в редакцию
25.02.14

Ложкин Андрей Петрович – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории «Белково-клеточные взаимодействия» Института фундаментальной медицины и биологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия.

E-mail: lozhkinandrey@gmail.com

Биктагиров Тимур Булатович – младший научный сотрудник Института геологии и нефтегазовых технологий, Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия.

E-mail: tbiktagirov@gmail.com

Зеленихин Павел Валерьевич – кандидат биологических наук, доцент кафедры микробиологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия.

E-mail: pasha_mic@mail.ru

Абдульянов Васыл Алиевич – кандидат медицинских наук, заведующий отделением патологической анатомии, ГАУЗ «Межрегиональный клинико-диагностический центр», г. Казань, Россия.

E-mail: icdc@icdc.ru

Хайруллин Руستم Наилевич – доктор медицинских наук, генеральный директор, ГАУЗ «Межрегиональный клинико-диагностический центр», г. Казань, Россия.

E-mail: icdc@icdc.ru

* * *

EVALUATION OF OXIDATIVE STRESS USING EPR SPECTROSCOPY IN PATIENTS WITH CARDIOVASCULAR DISEASE

A.P. Lozhkin, T.B. Biktagirov, P.V. Zelenikhin,
V.A. Abdulyanov, R.N. Khairullin

Abstract

Atherosclerosis underlies a wide range of cardiovascular diseases and is one of the leading causes of mortality in western countries. Oxidative stress and increased concentrations of reactive oxygen species are important contributors to the pathophysiology of atherosclerosis. Increased concentrations of ROS lead to enhanced oxidation of low-density lipoprotein, inactivation of endothelium-derived nitric oxide and endothelial dysfunction. Despite the molecular mechanisms of reactive oxygen species generation by enzymatic systems in atherogenesis are not well understood, several lines of evidences support the prognostic value of oxidative stress assessment in patients with cardiovascular disease. Here we demonstrate a systemic approach to the evaluation of oxidative stress in patients with cardiovascular disease using EPR spectroscopy and statistical methods of data analysis. This approach involves not only qualitative and quantitative assessment of the oxidative stress level, but also assessment of antioxidant system activity.

Keywords: atherosclerosis, oxidative stress, superoxide anion, spin probe, EPR.

References

1. Lloyd-Jones D.M. Cardiovascular risk prediction: basic concepts, current status, and future directions. *Circulation*, 2010, vol. 121, no. 15, pp. 1768–1777. doi: 10.1161/circulationaha.109.849166.
2. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*, 2002, vol. 420, pp. 868–874.
3. Hansson G.K. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N. Engl. J. Med.*, 2005, vol. 352, no. 16, pp.1685–1695.
4. Papaharalambus C.A., Griendling K.K. Basic mechanisms of oxidative stress and reactive oxygen species in cardiovascular injury. *Trends Cardiovasc. Med.*, 2007, vol. 17, no. 2, pp. 48–54. doi: 10.1016/j.tcm.2006.11.005.
5. Berliner J.A., Heinecke J.W. The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. *Free Radic. Biol. Med.*, 1996, vol. 20, pp. 707–727.
6. Jialal I. Evolving lipoprotein risk factors: lipoprotein(a) and oxidized low-density lipoprotein. *Clin. Chem.*, 1998, vol. 44, Pt. 2, pp. 1827–1832.
7. Rajendran R., Ren M., Ning P., Tan Kwong Huat B., Halliwell B., Watt F. Promotion of atherogenesis by copper or iron – which is more likely? *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2007, P. 353, no. 1, pp. 6–10.
8. Brewer G.J. Iron and copper toxicity in diseases of aging, particularly atherosclerosis and Alzheimer's disease. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*, 2007, vol. 232, no. 2, pp. 323–335.
9. Madamanchi N.R., Runge M.S. NADPH oxidases and atherosclerosis: unraveling the details. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.*, 2010, vol. 298, no. 1, pp. H1–H2. doi: 10.1152/ajpheart.01020.2009.

10. Madamanchi N.R., Runge M.S. Mitochondrial dysfunction in atherosclerosis. *Circ. Res.*, 2007, vol. 100, pp. 460–473. doi: 10.1161/01.res.0000258450.44413.96.
11. Li J.M., Shah A.M. Endothelial cell superoxide generation: regulation and relevance for cardiovascular pathophysiology. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 2004, vol. 287, no. 5, pp. 1014–1030.
12. Ballinger S.W. Mitochondrial dysfunction in cardiovascular disease. *Free. Radic. Biol. Med.*, 2005, vol. 38, no. 10, pp. 1278–1295.
13. Steinberg D. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J. Biol. Chem.*, 1997, vol. 272, no. 34, pp. 20963–20966.
14. Faraci F.M., Didion S.P. Vascular protection: superoxide dismutase isoforms in the vessel wall. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2004, vol. 24, no. 8, pp. 1367–1373.
15. Yucel D., Senes M., Topkaya B.C., Zengi O. Oxidative / nitrosative stress in chronic heart failure: A critical review. *Turk. J. Biochem.*, 2006, vol. 31, no. 2, pp. 86–95.
16. Qin H.D., Huang D., Weng X.D., Xu F. Upregulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and NADPH oxidases are involved in restenosis after balloon injury. *J. Cell. Physiol.*, 2009, vol. 221, no. 3, pp. 387–393. doi: 10.1002/jcp.21865.
17. Vendrov A.E., Madamanchi N.R., Hakim Z.S., Rojas M., Runge M.S. Thrombin and NAD(P)H oxidase-mediated regulation of CD44 and BMP4-Id pathway in VSMC, restenosis, and atherosclerosis. *Circ. Res.*, 2006, vol. 98, no. 10, pp. 1254–1263.
18. Li J.M., Newburger P.E., Gounis M.J., Dargon P., Zhang X., Messina L.M. Local arterial nanoparticle delivery of siRNA for NOX2 knockdown to prevent restenosis in an atherosclerotic rat model. *Gene Ther.*, 2010, vol. 17, no. 10, pp. 1279–1287. doi: 10.1038/gt.2010.69.
19. Fink B., Dikalov S., Bassenge E. A new approach for extracellular spin trapping of nitroglycerin-induced superoxide radicals both in vitro and in vivo. *Free Radic. Biol. Med.*, 2000, vol. 28, no. 1, pp. 121–128.
20. Suh Y.A., Arnold R.S., Lassegue B., Shi J., Xu X., Sorescu D., Chung A.B., Griendling K.K., Lambeth J.D. Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature*, 1999, vol. 401, pp. 79–82.
21. Runge M.S., Molnar K., Madamanchi N.R. “Old” hearts and arteries: the role of oxidative stress. *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.*, 2010, vol. 121, pp. 52–58.
22. Benov L. How superoxide radical damages the cell. *Protoplasma*, 2001, vol. 217, no. 1–3, pp. 33–36.
23. Niu X.L., Madamanchi N.R., Vendrov A.E., Tchivilev I., Rojas M., Madamanchi C., Brandes R.P., Krause K.H., Humphries J., Smith A., Burnand K.G., Runge M.S. Nox activator 1: a potential target for modulation of vascular reactive oxygen species in atherosclerotic arteries. *Circulation*, 2010, vol. 121, no. 4, pp. 549–559. doi: 10.1161/circulationaha.109.908319.
24. Judkins C.P., Diep H., Broughton B.R., Mast A.E., Hooker E.U., Miller A.A., Selemidis S., Dusting G.J., Sobey C.G., Drummond G.R. Direct evidence of a role for Nox2 in superoxide production, reduced nitric oxide bioavailability, and early atherosclerotic plaque formation in ApoE^{-/-} mice. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2010, vol. 298, no. 1, pp. H24–H32. doi: 10.1152/ajpheart.00799.2009.

Received
February 25, 2014

Lozhkin Andrei Petrovich – PhD in Biology, Senior Research Fellow, Laboratory for Protein-Cell Interaction, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University, Kazan, Russia.

E-mail: lozhkinandrey@gmail.com

Biktagirov Timur Bulatovich – Junior Research Fellow, Institute of Geology and Petroleum Technologies, Kazan Federal University, Kazan, Russia.

E-mail: tbiktagirov@gmail.com

Zelenikhin Pavel Valerevich – PhD in Biology, Associated Professor, Department of Microbiology, Kazan Federal University, Kazan, Russia.

E-mail: *pasha_mic@mail.ru*

Abdulyanov Vasyi Alievich – PhD in Medicine, Head of the Department of Pathological Anatomy, Inter-Regional Diagnostic and Treatment Center, Kazan, Russia.

E-mail: *icdc@icdc.ru*

Khairullin Rustem Nailevich – Doctor of Medicine, Director General, Inter-Regional Diagnostic and Treatment Center, Kazan, Russia.

E-mail: *icdc@icdc.ru*