

Плазмалогенные фосфолипиды при гипоксии миокарда и экспериментальной гипоксии

А. Н. Осипенко

Могилевский государственный университет им. А. А. Кулешова, Могилев, Беларусь

Абстракт

Цель. Оценить изменение содержания плазмалогенных фосфолипидов в составе эритроцитов при экспериментальной гипоксии и гипоксии миокарда.

Материалы и методы. Объектом исследования являлись образцы крови пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС), стенокардией напряжения и атеросклерозом коронарных артерий. Контролем служили образцы крови практически здоровых добровольцев. Помимо этого, анализировались изолированные образцы цельной крови практически здоровых добровольцев после инкубации при 37°C в течение 180 минут. Контролем в этом случае являлись образцы цельной крови этих же добровольцев, но не подвергавшиеся инкубации. Определение содержания анализируемых веществ осуществлялось при помощи метода капиллярной газожидкостной хроматографии.

Результаты. В группе пациентов с ИБС, стенокардией напряжения и атеросклерозом коронарных артерий в сравнении со здоровыми добровольцами выявлено увеличение содержания плазмалогенных фосфолипидов в эритроцитах и снижение pH плазмы крови. В случае экспериментальной гипоксии во всех подвергнутых инкубации образцах отмечалось увеличение содержания плазмалогенных фосфолипидов в эритроцитах и снижение pH плазмы крови.

Заключение. Полученные в ходе исследования данные указывают на необходимость коррекции метаболического ацидоза как причины увеличения содержания плазмалогенных фосфолипидов в составе мембран эритроцитов. На основании полученных данных делается предположение, что одним из факторов увеличения содержания плазмалогенных фосфолипидов в составе клеточных мембран является более существенное увеличение активности кальцийзависимой фосфолипазы A_2 в сравнении с активностью кальцийнезависимой плазмалогенной фосфолипазы A_2 на фоне гипоксии.

Ключевые слова: плазмалогенные фосфолипиды, эритроциты, гипоксия, ацидоз, атеросклероз, ишемическая болезнь сердца, стенокардия напряжения.

Plasmalogens in myocardial hypoxia and experimental hypoxia

A. N. Osipenko

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

Abstract

Aim. To estimate the change in plasmalogen content of red blood cells in experimental hypoxia and myocardial hypoxia.

Materials and methods. In the first study the object was blood samples from patients with coronary heart disease, angina pectoris and coronary atherosclerosis. Control blood samples were from healthy volunteers. In the second study the isolated whole blood samples in healthy volunteers were analyzed after incubation at 37°C for 180 minutes. In this case the whole blood samples of the same volunteers, not subjected to incubation, were used as the control. Determination of analytes was carried out using the method of capillary gas-liquid chromatography.

Results. In the group of patients with coronary heart disease, angina pectoris and coronary atherosclerosis an increase in plasmalogen content of erythrocytes and reducing the pH of the blood plasma were detected compared with healthy volunteers. In case of experimental hypoxia there was an increase in plasmalogen content of erythrocytes and plasma pH decrease in all samples subjected to the incubation.

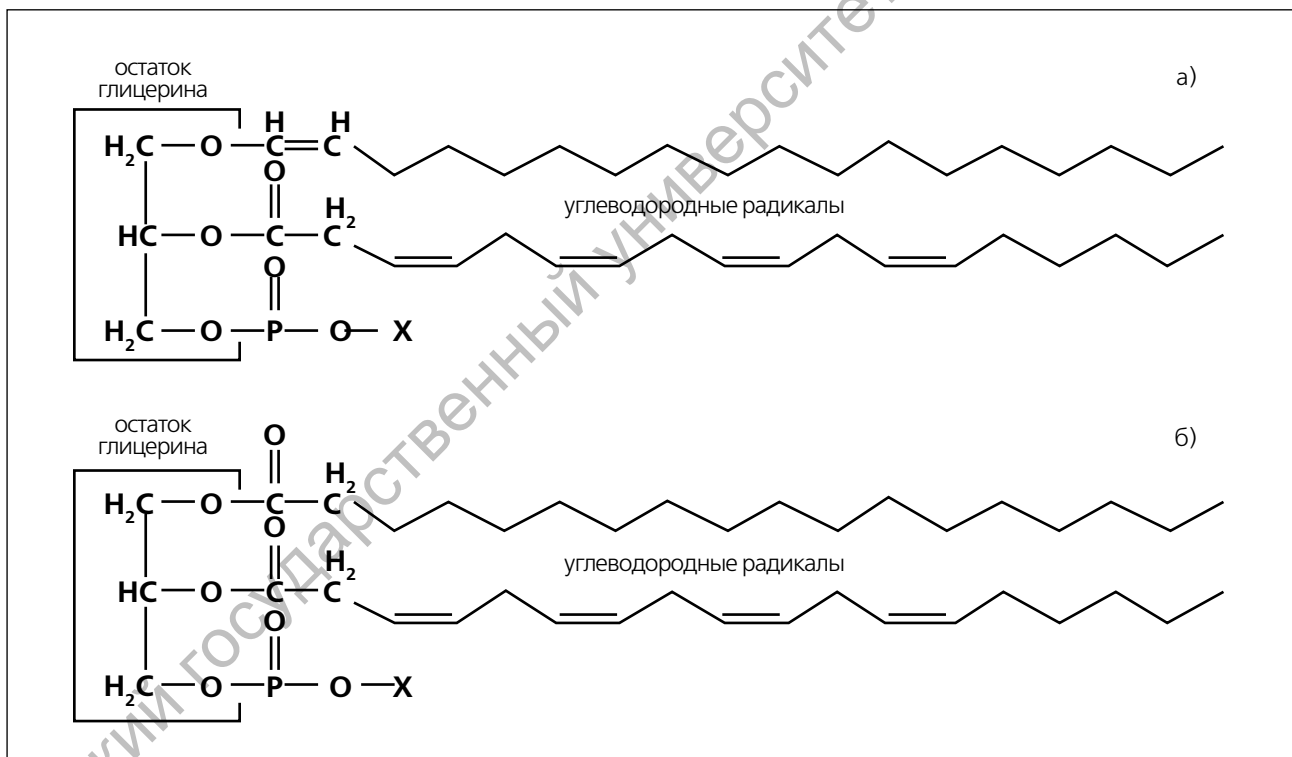
Conclusion. *The data obtained from this study indicates the need for correction of metabolic acidosis as a cause of increase in plasmalogen content of erythrocyte membranes. Based on these data, it is assumed that one of the factors increasing the plasmalogen content in cell membranes is a more significant increase in the activity of calcium-dependent phospholipase A_2 in comparison with the activity of calcium-independent phospholipase A_2 during hypoxia.*

Keywords: *plasmalogens, red blood cells, hypoxia, acidosis, atherosclerosis, coronary heart disease, angina pectoris.*

Активными участниками процессов окислительной модификации глициридов клеточных мембран и липопротеинов являются плазмалогенные фосфолипиды. Склонность плазмалогенных фосфолипидов к реакциям окисления определяется тем, что первичная –ОН группа в их глицероле замещена не ацильным радикалом (остатком жирной кислоты), как у диацилглицерофосфолипидов, а альдегидо-

генным алкенильным радикалом (остатком жирного альдегида в енольной форме). По имеющимся в литературе данным, окисление альдегидогенного алкенильного радикала в sn-1 положении остатка молекулы глицерола (рис. 1) снижает вероятность окисления радикала ненасыщенной жирной кислоты, находящейся в sn-2 положении глицерола [1–3].

Рисунок 1. Структурные формулы, отражающие отличия в химическом строении плазмалогенной формы глицерофосфолипида (а) и диацильной формы глицерофосфолипида (б). X – остатки холина, этаноламина, серина, инозита, водорода и др.



Показано, что высокое содержание жирных альдегидов в нервной ткани предохраняет полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК) от ускоренного окисления, а уменьшение их количества в мозге больных синдромом Альцгеймера сопряжено с активизацией процессов перекисного окисления ПНЖК. Другими словами плазмалогенные фосфолипиды, как липиды, содержащие радикалы жирных альдегидов, являются молекулами, препятствующими повышенному окислению радикалов полиненасыщенных жирных кислот в клеточных мембранах [1, 2]. С другой стороны,

благодаря наличию альдегидогенных алкенильных радикалов плазмалогенные фосфолипиды сами могут оказаться причиной образования химически активных метаболитов [4, 5].

Несмотря на важность плазмалогенных фосфолипидов как активных участников в процессах окисления липидов, данные об изменении их содержания при сердечно-сосудистой патологии в современной литературе практически не встречаются. Также до конца не установлен вклад процессов, протекающих в условиях дефицита кислорода, в химический состав клеточных мембран.

Таким образом, целью работы являлась оценка содержания плазмалогенных фосфолипидов в составе мембран эритроцитов при ишемической болезни сердца (ИБС), стенокардии напряжения и атеросклерозе, а также при экспериментальной гипоксии.

Материалы и методы исследования

Объектом исследования явились 17 человек ($56,3 \pm 1,5$ лет) с диагнозом: ИБС, атеросклероз коронарных артерий, стенокардия напряжения II–III функционального класса, артериальная гипертензия (опытная группа 1). Контролем к опытной группе 1 (контрольная группа 1) служила кровь 17 практически здоровых добровольцев ($38,4 \pm 3,3$ лет).

В качестве модели экспериментальной тканевой гипоксии в наших исследованиях явились эксперименты с инкубацией при 37°C изолированных образцов крови. Образцы крови семи практически здоровых добровольцев ($34,7 \pm 4,8$ лет) анализировали до и после 30- и 180-минутной инкубации. При этом в качестве опытной группы выступали образцы после инкубации (опытная группа 2). Соответствующую контрольную группу составляли образцы цельной крови этих же здоровых добровольцев, не подвергавшиеся инкубации (контрольная группа 2).

Преаналитический этап состоял в разделении клеточного компонента и плазмы крови путем центрифугирования. Затем эритроциты дважды отмывали в сбалансированном по pH изотоническом растворе. Далее проводили дериватизацию анализируемых соединений плазмы и эритроцитов крови в 1,5 М растворе HCl в этаноле при температуре 60°C в течение 1 часа. Экстракцию полученных дериватов из реакционной смеси осуществляли с помощью гексана. Далее проводился анализ различных алкенильных (жирные альдегиды) и ацильных (жирные кислоты) радикалов молекул липидов, которые присутствовали в гексановых экстрактах в виде соответствующих диэтилацеталей и этиловых эфиров. Для этого использовался метод газожидкостной хроматографии [6] с регистрацией определяемых химических соединений пламенно-ионизационными детекторами.

Измерения проводились на газовых хроматографах ГХ–1000, ЦВЕТ–800 (Россия). Разделение анализируемых соединений проводили с использованием капиллярной колонки длиной 60 м и внутренним диаметром 0,56 мм, с силиконовой неподвижной фазой SE-30 (толщина пленки сорбента 0,25 мкм). В качестве газа-носителя использовался азот. Условия хроматографирования: температура испарителя – 280°C ; температура детектора – 290°C ; расход газа-носителя – $60\text{ см}^3/\text{мин}$. Ввод пробы осуществлялся с делением потока газа-носителя (коэффициент деления 1:12). Получение хроматограмм производилось при нелинейной

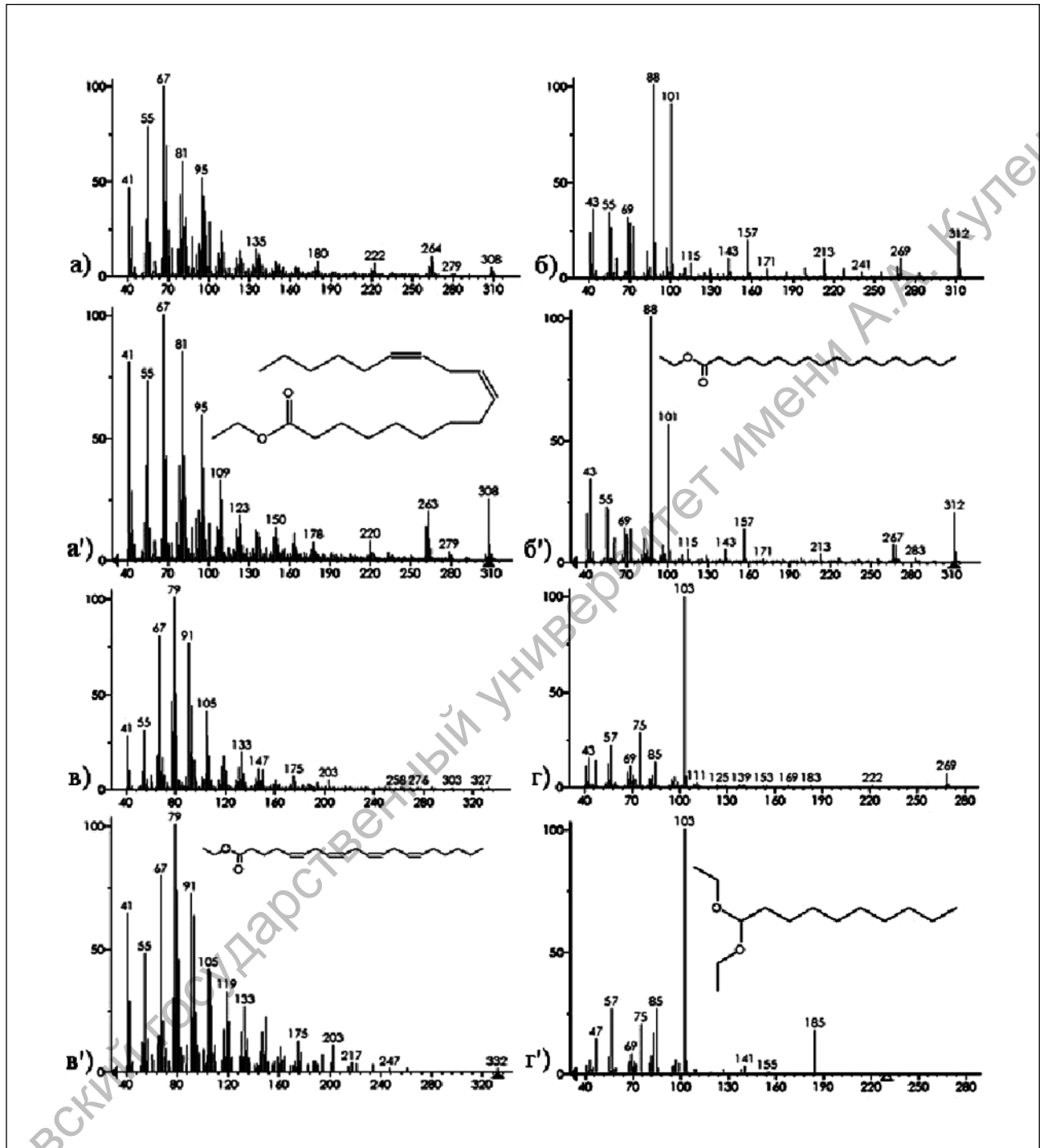
программе нагрева термостата колонок. На первом этапе разделение осуществлялось в течение 30 минут при 150°C , далее температура термостата колонок в несколько ступеней (со скоростью нагрева 2 и $4^\circ\text{C}/\text{мин}$) поднималась до 260°C .

Для идентификации окисгенированных углеводородных радикалов фосфолипидов использовался метод вычитания. Для этого к некоторым из полученных экстрактов добавляли с избытком борогидрид натрия [7]. После обработки борогидридом натрия пики, соответствующие кето-, эпокси- и гидропероксипроизводным фосфолипидных радикалов, на хроматограммах не регистрировались. Отсутствие на хроматограммах полученных после обработки пиков, соответствующих окисгенированным углеводородным радикалам фосфолипидов, позволило идентифицировать пики этих соединений на хроматограммах, полученных без добавления борогидрида натрия.

Идентификация каждой отдельной жирной кислоты осуществлялась по времени ее удерживания в хроматографической колонке. Характерные для разных жирных кислот времена удерживания определялись с помощью смесей жирных кислот с известным процентным содержанием каждой кислоты. Кроме того, идентификация (в случае жирных кислот) и классификация (в случае жирных альдегидов) анализируемых соединений осуществлялась с помощью метода хромато-масс-спектрометрии. Показано, что с опорой на закономерности фрагментации органических соединений при их электронной ионизации существует возможность определять классы анализируемых органических соединений при неполном совпадении масс-спектров. При этом масс-спектры сложных эфиров жирных кислот и ацеталей альдегидов обладают характерными особенностями, позволяющими их четко классифицировать [8]. В работе использовался квадрупольный хромато-масс-спектрометр Finnigan DSQ II (США), оснащенный аналогичной хроматографической колонкой. Режим ионизации – 70 эВ. Сравнение полученных масс-спектров с масс-спектрами в базе данных NIST 08 проводилось в автоматическом режиме (рис. 2). Окончательная идентификация отдельных диэтилацеталей жирных альдегидов осуществлялась на основе различий во временах удерживания этих соединений в хроматографической колонке, возникающих благодаря разнице в длине углеводородной цепи и наличию двойной связи [6].

Количественная оценка изменения уровня плазмалогенных фосфолипидов выражалась как изменение доли жирных альдегидов в общей сумме жирных альдегидов и жирных кислот. Для этого после преобразования жирных альдегидов и жирных кислот в соответствующие диэтилацетали и этиловые эфиры осуществлялось их измерение методом нормализации. Площадь пика на хроматограмме, соответствующего определенному диэтилацеталу жирного альдегида или этиловому эфиру жирной

Рисунок 2. Масс-спектры дериватов некоторых углеводородных радикалов фосфолипидов, полученные при анализе эритроцитарной массы (а, б, в, г), и наиболее соответствующие им масс-спектры из базы данных прибора, принадлежащие молекулам этиловых эфиров линолевой (а'), стеариновой (б'), арахидоновой (в') кислот и молекулам диэтилацетала жирного альдегида (г')



кислоты, определялась в процентном отношении от общей площади пиков этиловых эфиров жирных кислот и диэтилацеталей жирных альдегидов. При этом площади пиков анализируемых соединений примерно соответствовали их массовому процентному содержанию в общей сумме жирных кислот и жирных альдегидов. Общая сумма диэтилацеталей выражалась как сумма диэтилацетала гексадецилового альдегида ($C_{16:0}$), диэтилацетала

октадецилового альдегида ($C_{18:0}$) и диэтилацетала октадеценового альдегида ($C_{18:1}$).

Количественная оценка содержания отдельных жирных кислот также производилась методом нормализации. Площадь пика, соответствующего определенной жирной кислоте, определялась в процентном отношении от общей площади пиков жирных кислот (без учета жирных альдегидов). При этом доля пика отдельной жирной кислоты

от общей площади пиков жирных кислот соответствовала ее массовому процентному содержанию в общей сумме жирных кислот ($C_{14:0} - C_{22:6}$).

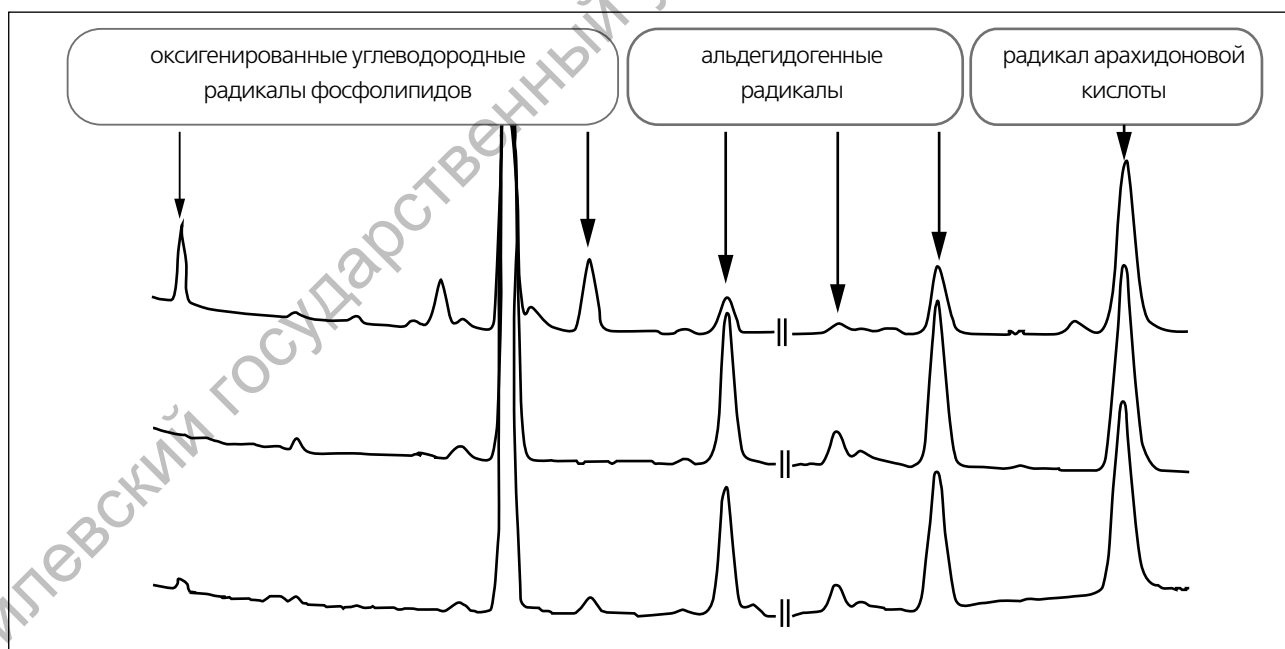
Измерения pH проводили с помощью pH-метра HANNA HI 8314 (Германия) с точностью определения pH, равной $\pm 0,01$ ед.

Полученные данные представлены в виде средних для сравниваемых групп и соответствующих значений доверительного интервала ($\bar{X} \pm \Delta x$) с доверительной вероятностью 95% (нормальность распределения подтверждалась по критерию Колмогорова-Смирнова), а также путем использования медианы (Me) и интерквартильного размаха в формате Me [LQ;UQ], где LQ – нижний квартиль, UQ – верхний квартиль медианы. Оценка достоверности различий между независимыми выборками осуществлялась с использованием U-критерия Манна-Уитни, который позволяет оперировать выборками с небольшим количеством наблюдений. Для оценки значимости различий двух связанных совокупностей (эксперименты с инкубацией цельной крови) количественных признаков применялся критерий Уилкоксона [9]. Изменения считались значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования и обсуждение

В результате обработки смеси этиловых эфиров различных жирных кислот и диэтилацеталей жирных альдегидов, полученных из эритроцитарных фосфолипидов, 30–35 %-й перекисью водорода, на хроматограммах отмечается значительное сокращение площадей пиков, соответствующих диэтилацеталам жирных альдегидов. При этом происходит существенное увеличение площадей пиков углеводородных соединений, подвергшихся окислению. Это подтверждается тем, что после обработки борогидридом натрия пики этих соединений на хроматограммах не регистрируются (рис. 3). Площади пиков, соответствующих этиловым эфирам полиненасыщенных жирных кислот, в сравнении с пиками диэтилацеталей жирных альдегидов сокращаются незначительно. Масс-спектрометрический анализ отдельных соединений, подвергающихся химическому превращению в результате обработки борогидридом натрия, указывает на наличие у них, помимо атомов кислорода, входящих в состав эфирных связей ацеталей, кислорода, связанного с углеводородным радикалом.

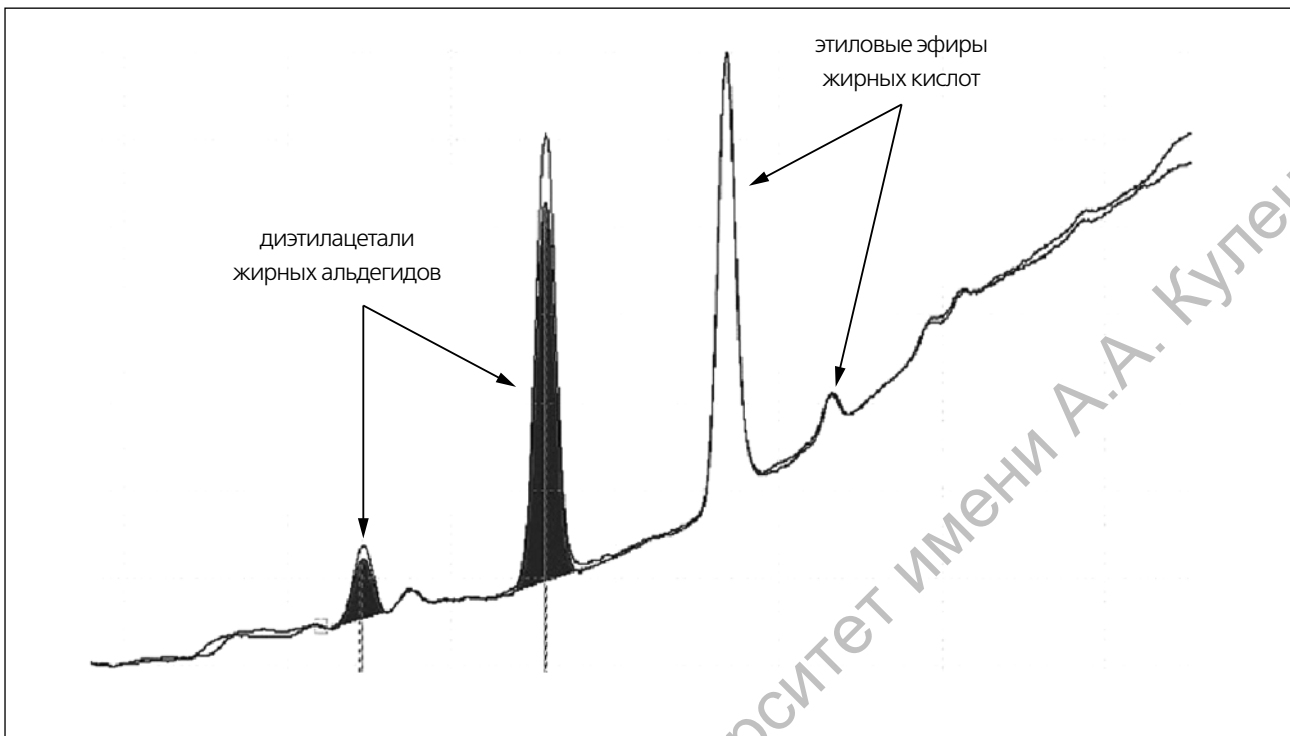
Рисунок 3. Хроматограммы ацильных (жирные кислоты) и альдегидогенных (жирные альдегиды) радикалов фосфолипидов эритроцитов, полученные до (внизу) и после обработки борогидридом натрия (по центру), а также после обработки перекисью водорода (вверху)



Таким образом, проведенные эксперименты показывают, что обработка перекисью водорода смеси этиловых эфиров различных жирных кислот и диэтилацеталей жирных альдегидов главным образом приводит к резкому сокращению содержания диэтилацеталей жирных альдегидов и образованию из них значительного количества

органических соединений, содержащих активный кислород. Следовательно, подавляющая часть окисленных углеводородных радикалов фосфолипидов, регистрируемых на хроматограммах при анализе жирных кислот и жирных альдегидов эритроцитов, является окисленными алкенильными альдегидогенными ради-

Рисунок 4. Визуальное сравнение двух хроматограмм наложением, иллюстрирующее увеличение уровня жирных альдегидов эритроцитов после инкубации цельной крови 180 минут при 37 °С. Закрашенные пики – диэтилацетали жирных альдегидов из эритроцитов, не подвергавшихся инкубации



калами в составе плазмалогенных фосфолипидов (что частично подтверждается результатами масс-спектрометрического анализа).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что высокий уровень плазмалогенных фосфолипидов хотя и снижает вероятность окисления ПНЖК активными формами кислорода, как об этом упоминается в ряде источников, указывающих на антиоксидантную роль плазмалогенных фосфолипидов [1, 3, 10], но тем не менее сам становится причиной образования окисленных метаболитов, влияющих на процессы клеточного гомеостаза. Это согласуется с выводами некоторых исследователей [5, 11]. Также существуют данные, что взаимодействие альдегидогенных радикалов плазмалогенных фосфолипидов с активными формами хлора приводит к образованию их хлорсодержащих производных, которые могут являться проатерогенными молекулами [4].

По результатам анализа эритроцитов из образцов крови здоровых добровольцев, подвергавшихся трехчасовой инкубации при 37 °С, был определен баланс между алкенильными альдегидогенными радикалами (жирными альдегидами) и ацильными радикалами (жирными кислотами) эритроцитарных фосфолипидов. Следует отметить, что определяемая доля и тех и других соединений может несколько отличаться от реальной, в связи с тем, что чувствительность пламенно-ионизационного детектора газового хроматографа к веществам различной природы неодинакова (особенно в том случае, если анализируемые вещества существенно

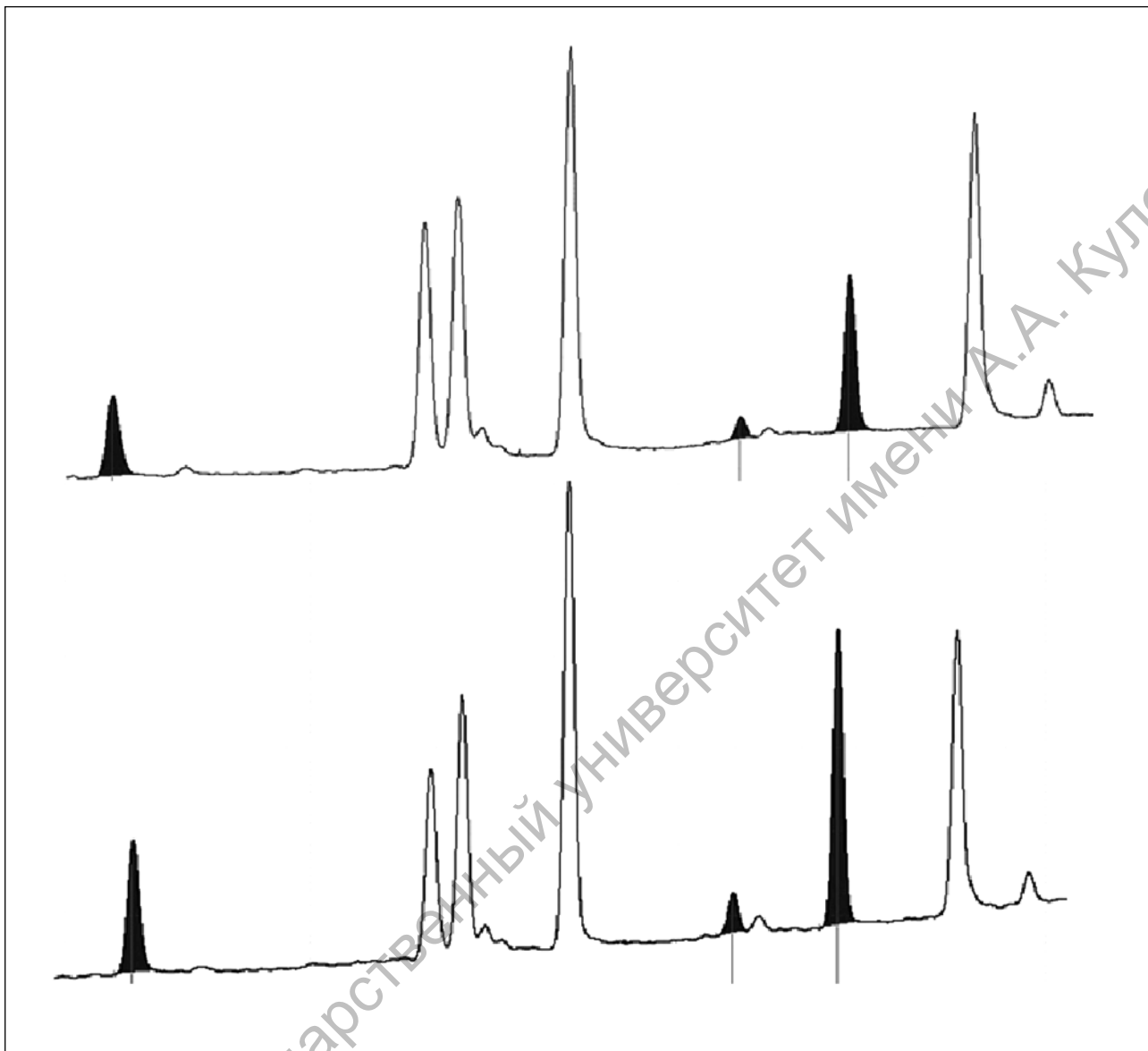
отличаются по химической структуре и элементному составу). Однако данного подхода вполне достаточно для оценки степени увеличения или снижения того или иного химического соединения в клетках или плазме крови при физиологических нагрузках или патологических процессах.

Результаты исследования, полученные без применения поправочных коэффициентов для учета различий в чувствительности детектора хроматографа, показали, что в общей сумме углеводородных радикалов фосфолипидов эритроцитов из образцов крови, не подвергавшихся инкубации (контрольная группа 2), 12,92 [12,83; 15,27] % составляют жирные альдегиды, в то время как 87,08 [84,73; 87,17] % составляют жирные кислоты.

После трехчасовой инкубации (рис. 4) изолированных образцов крови при 37 °С (опытная группа 2) было обнаружено увеличение доли алкенильных альдегидогенных радикалов в составе эритроцитарных фосфолипидов до 18,14 [17,31; 19,25] % ($p < 0,05$). Учитывая, что увеличение доли жирных альдегидов отражает повышенное относительное содержание плазмалогенных фосфолипидов, можно заключить, что после инкубации содержание плазмалогенных фосфолипидов в составе эритроцитарных мембран увеличивается на 40 %. Наряду с этим отмечалось снижение pH плазмы крови с 7,38 [7,37; 7,38] до 7,32 [7,31; 7,33] ($p < 0,01$).

У пациентов с ИБС, стенокардией напряжения и атеросклерозом (опытная группа 1) в общей сумме углеводородных радикалов фосфолипидов

Рисунок 5. Хроматограммы жирных кислот и жирных альдегидов эритроцитарной массы здорового добровольца (вверху) и эритроцитарной массы пациента с ИБС, стенокардией напряжения и атеросклерозом (внизу). Закрашенные пики – диэтилацетали жирных альдегидов



эритроцитов $19,54 \pm 1,77\%$ составляют жирные альдегиды, в то время как $80,46 \pm 1,77\%$ составляют жирные кислоты. В первой контрольной группе это соотношение существенно ($p < 0,001$) отличается. Так, доля жирных альдегидов составляет только $13,79 \pm 1,73\%$, в то время как доля жирных кислот – $86,21 \pm 1,73\%$ от общей суммы жирных кислот и жирных альдегидов (рис. 5). Это отражает повышение содержания плазмалогенных фосфолипидов в составе мембран эритроцитов у пациентов с ИБС, стенокардией напряжения и атеросклерозом по сравнению с контролем почти в полтора раза. При этом ацидоз венозной крови ($pH\ 7,31 \pm 0,04$ против $7,37 \pm 0,01$ в контроле 1, $p < 0,01$) присутствовал и у пациентов с ишемией миокарда.

Показано, что снижение pH крови при ишемии вызвано главным образом повышенным образованием лактата и его пониженным окислением в связи

с дефицитом кислорода [12]. Сдвиг pH за счет образования лактата в процессе гликолиза, диссоциация кислорода с гемоглобином отмечается и при достаточно длительном хранении необходимой для гемотрансфузии крови. При этом изменения происходят несмотря на то, что для замедления метаболизма эритроцитов используют достаточно низкую температуру хранения (обычно $1-6^\circ\text{C}$). При повышении температуры соответствующие изменения развиваются значительно быстрее [13]. Следует отметить, что после 30 минут инкубации цельной крови при 37°C изменений по величине pH и содержанию плазмалогенных фосфолипидов не отмечается. Это говорит о том, что резервы буферных систем крови к данному моменту еще не исчерпаны, и свидетельствует о связи между двумя этими показателями.

Следует также отметить, что, по нашим данным, при добавлении к 1 мл цельной крови 70 мкг ионов

двухвалентной меди существенного увеличения доли плазмалогенных фосфолипидов после трехчасовой инкубации крови при 37 °С не происходит. Это, по-видимому, вызвано ускоренным окислением плазмалогенных фосфолипидов в условиях повышенного содержания этого металла переходной валентности.

Учитывая полученные результаты, можно предположить, что одним из факторов увеличения содержания плазмалогенных фосфолипидов в составе клеточных мембран является тканевая гипоксия. Показано [14–16], что в отношении мембранных диацилглицерофосфолипидов активность цитозольных форм фосфолипазы A_2 (ФЛ A_2) существенно повышается в условиях дефицита кислорода (приводя к их удалению из липидного бислоя), и зависит от концентрации внутриклеточного кальция, в то время как плазмалогенные фосфолипиды являются субстратом специфической кальцийнезависимой плазмалогенной ФЛ A_2 . При этом в эритроцитах, в отличие от плазмы крови, присутствуют лишь следы кальция. Содержание ионизированного кальция (наиболее биологически активной фракции) в эритроцитах составляет всего 0,9–2,8 мкмоль/л [17], в то время как в плазме его содержание выше (1,1–1,4 ммоль/л) [18]. При этом ацидоз способствует переходу кальция в ионизированную форму [19]. Таким образом, активное проникновение этого иона внутрь через эритроцитарную мембрану должно в первую очередь приводить к активации кальцийзависимых фосфолипаз. Данный механизм параллельно с интенсификацией процессов перекисного окисления липидов в условиях дефицита кислорода может приводить к изменению состава клеточных мембран.

Существуют сведения, что при острой ишемии миокарда в межклеточной жидкости может происходить двукратное увеличение лизофосфатидилхолина (образующегося под действием ФЛ A_2) [20]. При этом сокращение коронарного кровотока до 20 % от нормального приводит к снижению рН ишемизированных участков миокарда до величины 6,94 [21].

Интересно отметить и тот факт, что изменения эритроцитов при ИБС и атеросклерозе сонных артерий, а также при длительном хранении крови связывают с их ускоренным старением [22–24]. При этом показано, что старые эритроциты могут терять значительное количество вещества мембран (в основном липидной составляющей), что приводит к существенному сокращению их площади. Параллельно с этим наблюдается потеря эластичности эритроцитарных мембран [25]. Таким образом, увеличение доли плазмалогенных фосфолипидов может рассматриваться в качестве возможного критерия при оценке качества эритроцитов при проведении гемотрансфузии.

Существуют сведения, что эфирная связь (наличие атома кислорода у двойной углерод-углерод-

ной связи и отсутствие карбонильного кислорода) в sn-1 положении плазмалогенного фосфолипида способствует увеличению энергии водородных связей между полярными головными группами фосфолипидов, вследствие чего они становятся более липофильными, что, в свою очередь, также приводит к увеличению вязкости мембран. Кроме того, несмотря на наличие радикала ПНЖК у второго атома углерода остатка глицерола, плазмалогенные фосфолипиды имеют свойство накапливаться в рафтах плазматических мембран [26–28]. Таким образом, повышение доли плазмалогенных фосфолипидов в составе плазматических мембран может быть одной из причин ингибирования мембранных рецепторов.

Если исходить из факта, что подавляющая часть окисгенированных углеводородных радикалов, регистрируемых на полученных хроматограммах, входит в состав плазмалогенных фосфолипидов, то в таком случае увеличение плазмалогенных фосфолипидов в мембранах эритроцитов будет содействовать снижению гидрофобности мембран и увеличению их пассивной проницаемости для ионов. Последнее обстоятельство требует интенсификации работы ионных насосов для восстановления водно-электролитного баланса. Однако в силу ограничения молекулярной подвижности содержащих альдегидогенные радикалы фосфолипидов должны затрудняться конформационные изменения интегральных мембранных ферментов, что снижает [29] их каталитическую активность. Следовательно, увеличение содержания плазмалогенных фосфолипидов в составе мембран эритроцитов может представлять важный механизм мембранной патологии при атеросклерозе.

Необходимо отметить, что у пациентов с ИБС, стенокардией напряжения и атеросклерозом наряду с повышением уровня жирных альдегидов отмечается увеличение насыщенных миристиновой ($C_{14:0}$) и пальмитиновой ($C_{16:0}$) кислот в эритроцитах. Так, доли миристиновой ($C_{14:0}$) и пальмитиновой ($C_{16:0}$) жирной кислоты в общей сумме жирных кислот эритроцитов (без учета жирных альдегидов) у здоровых добровольцев первой контрольной группы составляют $0,30 \pm 0,06$ % и $25,80 \pm 0,77$ % соответственно. При этом в эритроцитах пациентов первой опытной группы доля миристиновой ($C_{14:0}$) жирной кислоты составляет $0,40 \pm 0,08$ % ($p < 0,05$), а пальмитиновой ($C_{16:0}$) – $27,22 \pm 0,78$ % ($p < 0,05$). Тенденция к увеличению миристиновой ($p < 0,10$) и пальмитиновой ($p < 0,10$) кислот в эритроцитах отмечается и после 180 минут инкубации цельной крови здоровых добровольцев при 37 °С.

Рост миристиновой ($C_{14:0}$) и пальмитиновой ($C_{16:0}$) жирных кислот в эритроцитах пациентов с ИБС и атеросклерозом может быть вызван увеличением относительного уровня сфингомиелина (СМ) в сравнении с содержанием диацилглицерофосфолипидов. Показано, что СМ эритроцитов помимо длинноцепочечных жирных кислот, таких

как С24:0 и С24:1 (регистрация которых не проводилась в связи с относительно высокими величинами удерживания данных компонентов проб в хроматографической колонке), содержит относительно высокие количества миристиновой (С_{14:0}) и пальмитиновой (С_{16:0}) кислот [30–32]. При этом, по некоторым данным, миристиновая (С_{14:0}) кислота в основном содержится в составе молекул сфингомиелина [31]. В связи с этим следует упомянуть о том, что высокий уровень СМ плазмы крови является независимым фактором риска развития атеросклероза и ИБС [33]. Показано возрастание уровня СМ в мембранах гладкомышечных клеток аорты при моделировании атеросклероза [35], кроме того, существуют данные, что снижение содержания СМ в мембранах макрофагов позитивно сказывается на развитии атеросклероза [35–37].

По некоторым оценкам, старение эритроцитов также сопровождается повышением содержания СМ в их мембранах [38, 39]. При этом в распаде молекул СМ плазматических мембран принимают участие не кальцийзависимые ФЛ А2 (как и в случае с плазмалогенными фосфолипидами), а главным образом зависящие от присутствия ионов магния и имеющие оптимум активности при нормальном рН крови сфингомиелиназы [40]. Таким образом, увеличение относительного содержания СМ в мембранах также может быть вызвано снижением общего содержания диацилглицерофосфолипидов.

Стоит также отметить снижение в эритроцитах пациентов первой опытной группы доли полиненасыщенной линолевой (С_{18:2}) кислоты (11,74 ± 0,77 % против 13,95 ± 1,09 % от суммы жирных кислот в первой контрольной группе, p < 0,01). Показано, что данная жирная кислота преимущественно входит в состав фосфатидилхолина эритроцитов [30–32], плазмалогенных форм которого в эритроцитах содержится лишь небольшое количество (подавляющая часть плазмалогенных фосфолипидов в эритроцитах представлена плазмалогенной формой фосфотидилэтаноламина) [41].

Некоторое увеличение плазмалогенных фосфолипидов отмечено нами и в плазме крови пациентов со стенокардией напряжения. Так, у лиц первой опытной группы доля жирных альдегидов составляет 2,85 ± 0,47 %, в то время как в плазме крови здоровых добровольцев (контрольная группа 1) этот показатель равен 2,09 ± 0,40 % (p < 0,05). У крыс (животных, значительно более устойчивых к развитию атеросклероза в сравнении с человеком), по нашим данным, доля жирных альдегидов в плазме крови составляет всего 0,50 ± 0,07 %, что существенно ниже соответствующего значения как у здоровых людей (p < 0,001), так и у пациентов с ИБС, стенокардией напряжения и атеросклерозом (p < 0,001). Учитывая показанное в ряде работ [42, 43] увеличенное содержание окисленных липопротеинов в плазме крови пациентов ИБС, можно предположить, что алкенильные радикалы

плазмалогенных фосфолипидов, способствуя образованию метаболитов, содержащих активный кислород, могут быть одной из причин повышенной восприимчивости липопротеинов низкой плотности к окислительной модификации. Интересно также отметить, что доля жирных альдегидов в эритроцитах крыс выше, чем у здоровых людей (18,54 ± 0,75 %, p < 0,001). Тем не менее вязкость клеточных мембран этих животных, по-видимому, невысока благодаря высокому содержанию в ней арахидоновой ПНЖК (22,24 ± 0,61 % против 14,52 ± 0,56 % от суммы жирных кислот в первой контрольной группе, p < 0,001).

Следует отметить, что уровень плазмалогенных фосфолипидов в плазме крови в основном определяется активностью клеточных пероксисом печени, также участвующих в метаболизме холестерина [44, 45]. Таким образом, повышенный уровень жирных альдегидов в плазме крови, может быть связан с повышением общего холестерина крови при ИБС и атеросклерозе. Для подтверждения этой гипотезы требуются более масштабные исследования, которые бы позволили бы установить наличие достоверной связи между содержанием плазмалогенных фосфолипидов и общего холестерина.

Заключение

Проведенное исследование показало, что обработка полученной из эритроцитарных фосфолипидов смеси этиловых эфиров жирных кислот и диэтилацеталей жирных альдегидов перекисью водорода приводит главным образом к резкому сокращению содержания последних и образованию значительного количества органических соединений, содержащих активный кислород и, следовательно, способных оказывать повреждающее действие на клетки. Увеличение уровня плазмалогенных фосфолипидов в эритроцитах наряду со снижением рН крови отмечается после трехчасовой инкубации цельной крови при 37 °С. При этом в условиях повышенного содержания в плазме крови металлов переходной валентности существенного увеличения в эритроцитах содержания плазмалогенных фосфолипидов после соответствующей инкубации образцов цельной крови не происходит. При атеросклерозе и ишемии миокарда в эритроцитах также выявляется увеличение доли плазмалогенных фосфолипидов, что отражает уплотнение клеточных мембран, снижение их гидрофобности и увеличение проницаемости для ионов. При этом также отмечается снижение рН крови.

Предполагается, что одним из факторов увеличения содержания плазмалогенных фосфолипидов в составе мембран эритроцитов является увеличение активности кальцийзависимой ФЛ А₂ в сравнении с активностью кальцийнезависимой плазмалогенной ФЛ А₂. Свидетельствовать в пользу данного вывода может и увеличение

относительного содержания миристиновой ($C_{14:0}$) и пальмитиновой ($C_{16:0}$) кислот, а также снижение линолевой ($C_{18:2}$) кислоты. Полученные данные также указывают на необходимость коррекции метаболического ацидоза, развивающегося в условиях дефицита кислорода, как важной причины изменений физико-химических параметров клеточных мембран у пациентов с ИБС и атеросклерозом, вы-

званных увеличением содержания плазмалогенных фосфолипидов.

Конфликт интересов

Конфликт интересов отсутствует.

Список литературы

1. Engelmann B. Plasmalogens: targets for oxidants and major lipophilic antioxidants. *Biochem Soc Trans.* 2004;32(Pt 1):147-50.
2. Farooqui AA, Rapoport SI, Horrocks LA. Membrane phospholipid alterations in Alzheimer's disease: deficiency of ethanolamine plasmalogens. *Neurochem.* 1997;22(4):523-27.
3. Khan M, Singh J, Singh I. Plasmalogen deficiency in cerebral adrenoleukodystrophy and its modulation by lovastatin. *Neurochem.* 2008;106(4):1766-79.
4. Thukkani AK, McHowat J, Hsu FF, et al. Identification of α -chloro fatty aldehydes and unsaturated lysophosphatidylcholine molecular species in human atherosclerotic lesions. *Circulation.* 2003;108(25):3128-33.
5. Weisser M, Vieth M, Stolte M, et al. Dramatic increase of α -hydroxyaldehydes derived from plasmalogens in the aged human brain. *Chem Phys Lipids.* 1997;90(1-2):135-42.
6. Kates M. *Techniques of Lipidology: Isolation, Analysis, and Identification of Lipids.* Translation from English. Moscow: Mir; 1975:58-250. Russian (Кеймс М. Техника липидологии. Выделение, анализ и идентификация липидов. Пер. с англ. М.: Мир; 1975:58-250).
7. Watson AD, Leitinger N, Navab M, et al. Structural identification by mass spectrometry of oxidized phospholipids in minimally oxidized low density lipoprotein that induce monocyte/endothelial interactions and evidence for their presence in vivo. *J Biol Chem.* 1997;272(21):13597-607.
8. Beynon JH. *Mass spectrometry and its applications to organic chemistry.* Moscow: Mir; 1964:330-97. Russian (Бейнон Дж. Масс-спектрометрия и ее применение в органической химии. Пер. с англ. М.: Мир; 1964:330-97).
9. Glantz S. *Biomedical statistics.* Moscow: Practice; 1998:327-46. Russian (Гланц С. Медико-биологическая статистика. Пер. с англ. М.: Практика; 1998:327-46).
10. Hoffman-Kuczynski B, Reo NV. Studies of myo-inositol and plasmalogen metabolism in rat brain. *Neurochem Res.* 2004;29(4):843-55.
11. Foglia TA, Nungesser E, Marmer WN. Oxidation of 1-O-(alk-1-enyl)-2,3-di-O-acylglycerols: models for plasmalogen oxidation. *Lipids.* 1988;23(5):430-4.
12. Grabam RM, Frazier DP, Thompson JW, et al. A unique pathway of cardiac myocyte death caused by hypoxia-acidosis. *J Exp Biol.* 2004;207(Pt 18):3189-200.
13. Zubair AC. Clinical impact of blood storage lesions. *Am J Hematol.* 2010;85(2):117-22.
14. Farooqui AA, Yang HC, Horrocks LA. Plasmalogens, phospholipases A2 and signal transduction. *Brain Res Rev.* 1995;21(2):152-61.
15. Jackson MJ. Intracellular calcium, cell injury and relationships to free radicals and fatty acid metabolism. *Proc Nutr Soc.* 1990;49(1):77-81.
16. Yang HC, Farooqui AA, Horrocks LA. Plasmalogen-selective phospholipase A2 and its role in signal transduction. *J Lipid Mediat Cell Signal.* 1996;14(1-3):9-13.
17. Engelmann B, Duhr J. Intracellular calcium content of human erythrocytes: relation to sodium transport systems. *J Membr Biol.* 1987;98(1):79-87.
18. Ngwa NR, Ambe AE. Assessment of serum calcium in relation to dietary calcium intake in a rural population in Cameroon. *OJEpi.* 2013;3(4):209-12.
19. Murray R, Granter D, Mayes P, et al. *Harper's Biochemistry [in 2 vols]. Volume 2.* Moscow: Mir; 1993:193-94. Russian (Мэрри Р, Греннер Д, Мейес П, Родуэлл В. Биохимия человека [в 2-х томах]. Т. 2. Пер. с англ. М.: Мир; 1993:193-94).
20. Snyder DW, Crafford WA Jr, Glasgow JL, et al. Lysophosphoglycerides in ischemic myocardium effluents and potentiation of their arrhythmogenic effects. *Am J Physiol.* 1981;241(5):H700-7.
21. Watson RM, Markle DR, Ro YM, et al. Transmural pH gradient in canine myocardial ischemia. *Am J Physiol.* 1984;246(2 Pt 2):H232-8.
22. Bosman GJ, Werre JM, Willekens FL, et al. Erythrocyte ageing in vivo and in vitro: structural aspects and implications for transfusion. *Transfus Med.* 2008;18(6):335-47.

23. Bosman GJ, Willekens FL, Werre JM. Erythrocyte aging: a more than superficial resemblance to apoptosis? *Cell Physiol Biochem.* 2005;16(1-3):1-8.
24. Buttari B, Profumo E, Cuccu B, et al. Erythrocytes from patients with carotid atherosclerosis fail to control dendritic cell maturation. *Int J Cardiol.* 2012;155(3):484-6.
25. Waugh RE, Narla M, Jackson CW, et al. Rheologic properties of senescent erythrocytes: loss of surface area and volume with red blood cell age. *Blood.* 1992;79(5):1351-8.
26. Gorgas K, Teigler A, Komljenovic D, et al. The ether lipid-deficient mouse: tracking down plasmalogen functions. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1763(12):1511-26.
27. Magnusson CD, Haraldsson GG. Ether lipids. *Chem Phys Lipids.* 2011;164(5):315-40.
28. Pike LJ, Han X, Chung KN, et al. Lipid rafts are enriched in arachidonic acid and plasmalogen lipids and their composition is independent of caveolin-1 expression: a quantitative electrospray ionization/mass spectrometric analysis. *Biochemistry.* 2002;41(6):2075-88.
29. Boldyrev AA, Kaivarainen EI, Илюха ВА. *Biomembranology.* Petrozavodsk: KarRC RAS; 2006:161-70. Russian (Болдырев АА, Кайварайнен ЕИ, Илюха ВА. *Биомембранология.* Петрозаводск: Изд-во Кар НЦ РАН; 2006:161-70).
30. Dodge JT, Phillips GB. Composition of phospholipids and of phospholipid fatty acids and aldehydes in human red cells. *J Lipid Res.* 1967;8(6):667-75.
31. Dougherty RM, Galli C, Ferro-Luzzi A, et al. Lipid and phospholipid fatty acid composition of plasma, red blood cells, and platelets and how they are affected by dietary lipids: a study of normal subjects from Italy, Finland, and the USA. *Am J Clin Nutr.* 1987;45(2):443-55.
32. Gercken G, Tiling T, Brockmann U, et al. Fatty acid composition of phospholipids in erythrocytes of adults, normal newborn infants, and neonates with Rb erythroblastosis. *Pediatr Res.* 1972;6(5):487-94.
33. Jiang XC, Paultre F, Pearson TA, et al. Plasma sphingomyelin level as a risk factor for coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20(12):2614-8.
34. Chen M, Mason RP, Tulenko TN. Atherosclerosis alters the composition, structure and function of arterial smooth muscle cell plasma membranes. *Biochim Biophys Acta.* 1995;1272(2):101-12.
35. Fan Y, Shi F, Liu J, et al. Selective reduction in the sphingomyelin content of atherogenic lipoproteins inhibits their retention in murine aortas and the subsequent development of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30(11):2114-20.
36. Li Z, Fan Y, Liu J, et al. Impact of sphingomyelin synthase 1 deficiency on sphingolipid metabolism and atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32(7):1577-84.
37. Liu J, Huan C, Chakraborty M, et al. Macrophage sphingomyelin synthase 2 deficiency decreases atherosclerosis in mice. *Circ Res.* 2009;105(3):295-303.
38. Velichko LN, Fedorova VM. Phospholipid makeup of the membranes of young and old rabbit erythrocytes *Tsitologiya.* 1981;23(6):714-6.
39. Vasilyeva EM. Biochemical features of erythrocyte. The influence of disease (literature review). *Biomedical Chemistry.* 2005;51(2):118-26. Russian (Васильева ЕМ. Биохимические особенности эритроцита. Влияние патологии (обзор литературы). *Биомедицинская химия.* 2005;51(2):118-26).
40. Goci FM, Alonso A. Sphingomyelinases: enzymology and membrane activity. *FEBS Lett.* 2002;531(1):38-46.
41. Farquhar JW. Human erythrocyte phosphoglycerides. I. Quantification of plasmalogens, fatty acids and fatty aldehydes. *Biochim Biophys Acta.* 1962;60:80-9.
42. Klimov AN, Nikulcheva NG. *Lipids, lipoproteins and atherosclerosis.* St. Petersburg: Piter Press; 1995:190-95. Russian (Климов АН, Никульчева НГ. *Липиды, липопротеиды и атеросклероз.* СПб.: Питер Пресс; 1995:190-95).
43. Holvoet P. Oxidized LDL and coronary heart disease. *Acta Cardiol.* 2004;59(5):479-84.
44. Kovacs WJ, Shackelford JE, Tape KN, et al. Disturbed cholesterol homeostasis in a peroxisome-deficient PEX2 knockout mouse model. *Mol Cell Biol.* 2004;24(1):1-13.
45. Mandel H, Getsis M, Rosenblat M, et al. Reduced cellular cholesterol content in peroxisome-deficient fibroblasts is associated with impaired uptake of the patient's low density lipoprotein and with reduced cholesterol synthesis. *Lipid Res.* 1995;36(6):1385-91.