

Д. Г. Рекалов

**ПАТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ СОПРЯЖЕННОСТЬ НАРУШЕНИЯ МЕТАБОЛИЗМА  
ОКСИДА АЗОТА И ТИОЛ-ДИСУЛЬФИДНОГО СООТНОШЕНИЯ У ПАЦИЕНТОВ С  
ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА**

Запорожский государственный медицинский университет

**Summary.** Rekalov D. G. **PATHOGENETIC ASSOCIATION OF NITRIC OXIDE METABOLISM VIOLATION AND THIOL-DISULFIDE RATIO IN THE PATIENTS WITH CORONARY HEART DISEASE.** – *Zaporozhiye State medical University, Ukraine.* The study of patterns of pathophysiological conjugation metabolism of nitric oxide and the parameters of the thiol-disulfide balance at CAD. It is shown that with increasing of thiol-disulfide imbalance significantly reduced nitric oxide bioavailability and its elevation to the nitrotyrosin level. One of the predictors of increased tolerance to physical activity in patients with CAD it is initially high levels of thiol-disulfide ratio and low concentration of serum nitrotyrosin.

**Key words:** nitrosative stress, glutathione, thiols, nitrotyrosin.

**Реферат.** Рекалов Д. Г. **ПАТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ СОПРЯЖЕННОСТЬ НАРУШЕНИЯ МЕТАБОЛИЗМА ОКСИДА АЗОТА И ТИОЛ-ДИСУЛЬФИДНОГО СООТНОШЕНИЯ У ПАЦИЕНТОВ С ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА.**

Проведено изучение закономерностей патофизиологической сопряженности метаболизма оксида азота и параметров тиол-дисульфидного баланса при ИБС. Показано, что по мере нарушения тиол-дисульфидного дисбаланса значительно снижается синтез оксида азота и его биодоступность с элевацией уровня нитротирозина. Одним из предикторов повышения толерантности к физической активности при ИБС является первоначально высокий уровень тиол-дисульфидного соотношения и низкая концентрация нитротирозина сыворотки крови.

**Ключевые слова:** нитрозилирующий стресс, глутатион, тиолы, нитротирозин.

**Реферат.** Рекалов Д. Г. **ПАТОГЕНЕТИЧНА СПРЯЖЕНІСТЬ ПОРУШЕННЯ МЕТАБОЛІЗМУ ОКСИДУ АЗОТУ ТА ТІОЛ-ДИСУЛЬФІДНОГО СПІВВІДНОШЕННЯ ПРИ ІШЕМІЧНІЙ ХВОРОБИ СЕРЦЯ.**

Проведено вивчення закономірностей патофізіологічної спряженості метаболізму оксиду азоту та параметрів тіол-дисульфідного балансу при ІХС. Показано, що в міру порушення тіол-дисульфідного дисбалансу значно знижується синтез оксиду азоту та його біодоступність з елевацією рівня нитротирозину. Одним з предикторів підвищення толерантності до фізичної активності при ІХС є початково високий рівень співвідношення тиол-дисульфідного співвідношення і низька концентрація нитротирозину сироватки крові.

**Ключові слова:** нітрозілюючий стрес, глутатіон, тіоли, нитротирозин.

Тиол-дисульфидная биохимическая система характеризует активность антиоксидантной системы и окислительно-восстановительных механизмов организма в целом, также принимает участие в реакциях фагоцитоза и иммунных взаимодействий, системе клеточного деления и роста, проницаемости биологических мембран, агрегационных свойств крови, мышечного сокращения [1]. Исходно тиолы рассматривались как антиоксиданты, направленные на связывание активных форм кислорода при оксидативном повреждении, но в последнее время появилось большое количество публикаций, показывающих важную роль окисления белков в регуляции окислительно-восстановительного потенциала клеток [2]. На сегодняшний день уровень плазменных или сывороточных тиолов и тиол-дисульфидное соотношение крови

рассматривают также как параметры иммунокомпетентности и состояния неспецифической резистентности организма.

В тоже время, в рамках исследования свойств оксида азота (NO) было показано, что это реакционная молекула играет роль важного регулятора многих метаболических и физиологических процессов в организме. Выяснение биофизических и биохимических аспектов действия этого соединения является до сих пор актуальной и недостаточно исследованной проблемой [3]. Одним из важнейших вопросов остается роль NO в работе и регуляции кардиоваскулярной системы [2, 4]. Имеются многочисленные данные о проявлении вазодилаторной активности путем регуляции тонуса сосудов, а также уменьшения последствий ишемии органов и тканей, перехвата супероксидных радикалов, появляющихся во время реперфузии при насыщении ткани миокарда кислородом после продолжительного нарушения кровоснабжения [4, 5]. Механизмы образования NO (как ферментативные, так и неферментативные) в условиях нарушения и восстановления кровоснабжения органов активно исследуются в настоящее время. В последнее время считается, что такие факторы, как продолжительность действия гипоксии, определяют — снижаются ли последствия ишемии после восстановления кровотока или произойдет стимуляция оксидативного стресса [5, 6].

Под влиянием NO наблюдается окисление тиолов с образованием нитрозотиолов [8]. В плазме крови обнаруживаются нитрозотиолы цистеина, альбумина, а в клетках – нитрозотиолы глутатиона, цистеинилглицина, различных белков, включая очень важные для регуляции пролиферативной активности клеток и их апоптоза [9, 10]. NO – свободный радикал, вызывающий эндотелий-зависимую вазодилатацию, ингибирующий агрегацию тромбоцитов, адгезию лейкоцитов к эндотелию и пролиферацию гладкомышечных клеток сосудистой стенки [2, 6]. NO после конъюгации с супероксиданионом направляется по различным путям преобразования пероксинитрита, включая нитрование белков, образование нитрозотиолов, в том числе нитрозотиолов гомоцистеина [11-13]. Часть этих продуктов приводит к усилению оксидативного стресса и свертываемости крови, тромбообразованию. В условиях нарастающего оксидативного стресса за счет генерации активных форм кислорода чаще наблюдается снижение активности эндотелиальной NO-синтазы и глутатион-пероксидаз [13]. Кроме того, сам NO представляет парамагнитную молекулу, т.е. свободный радикал, и при неблагоприятных условиях метаболизма способен вызвать так называемый нитрозилирующий стресс (нитрозативный, нитрозирующий) [3].

В связи с тем, что снижение уровня глутатиона и антиоксидантных ферментов является одним из ведущих факторов в развитии процессов не только ишемической болезни сердца, но и старения [1, 14], большой интерес вызывают оценка роли нитрозативного стресса и глутатион-зависимых реакций. Поэтому изучение окислительного и нитрозативного напряжения, а также локальных тиол-дисульфидной и NO-ергической стресс-лимитирующих систем при ИБС, является весьма актуальным и перспективным. Учитывая большую функциональную нагрузку данных метаболических систем, можно предполагать, что регуляция межклеточных и системных взаимодействий, связанных с изменением продукции NO и изменениями антиоксидантного статуса организма, окажется весьма эффективным способом в патогенетическом подпоре медикаментозной терапии.

**Цель работы:** изучение закономерностей патофизиологической сопряженности метаболизма оксида азота и параметров тиол-дисульфидного баланса при ИБС.

#### **Объект и методы исследования**

Обследовано 56 пациентов с ИБС, которые находились на лечении и обследовании в клинике КУ «Запорожская областная клиническая больница» ЗОР, с диагнозом стабильная стенокардия напряжения II-III функционального класса (определялся согласно критериям, предложенным Канадской Ассоциацией Кардиологов) без клинически значимой сопутствующей патологии, средний возраст составил  $47,12 \pm 0,71$  лет, 24 - женщины. Все испытуемые дали добровольное согласие на включение их в исследование. В исследование не включались больные с клапанными пороками сердца, нарушениями ритма сердца и проводимости, с эндокринной патологией, с симптоматическими артериальными гипертензиями. В рамках группы контроля был обследовано 20 практически здоровых человека без клинически значимой кардиоваскулярной патологии и релевантных различий по возрасту с группой больных. Все пациенты получали ацетилсалициловую кислоту, нитраты, статины, бета-блокаторы.

Определение стабильных метаболитов монооксида азота в тканях головного мозга по Гриссу (принцип метода - стабильными метаболитами монооксида азота – являются нитриты,

которые, реагируя с реактивом Грисса, образуют стойкий окрашенный комплекс, имеющий максимум поглощения при длине волны 540 нм). Обязательным в исследовании системы оксида азота является определение активности/экспрессии NOS, для определения общей активности которой использовали флюорометрический метод определения ее активности (принцип метода - в катализируемой NO-синтазой реакции образования монооксида азота из аргинина, происходит стериметрическое окисление НАДФН, регистрируя которое при 340 нм, можно оценивать активность данного фермента).

Определение нитротирозина проводили спектрофотометрическим методом Лобышева И.И. Флюорометрически оценивали в плазме уровень восстановленного (ГЛУв) и окисленного глутатиона (ГЛУо), с последующим расчетом их соотношения.

Исследуемые величины представлены в виде: выборочное среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка среднего значения. Нормальность распределения оценивали по критериям Kolmogorov-Smirnov (D), Lilliefors и Shapiro-Wilk (W). В случае распределения, отличающегося от нормального, или анализа порядковых переменных использовали Mann-Whitney U для 2-х несвязанных выборок, для большего числа выборок – критерий Kruskal-Wallis H с дальнейшим сравнением по Games-Howell. Результаты исследования обработаны с применением статистического пакета лицензионной программы «STATISTICA<sup>®</sup> for Windows 6.0» (StatSoft Inc., № AXXR712D833214FAN5) на кафедре медицинской информатики ЗГМУ, а также «SPSS 16.0», «Microsoft Excel 2013». Отдельные статистические процедуры и алгоритмы реализованы в виде специально написанных макросов в соответствующих программах [15]. Результаты представляли в виде: среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка репрезентативности средней величины. Достоверными считали различия при уровне значимости  $<0,05$ .

#### **Результаты и их обсуждение**

Исходно мы рассчитали 50 перцентиль всех значений соотношения ГЛУв/ГЛУо, которое составило 5,5 у.е. В таблице приведены данные анализа метаболизма оксида азота и нитрозирующего стресса у обследованных лиц в зависимости от состояния тиол-дисульфидного баланса. При соотношении ГЛУв/ГЛУо ниже 5,5 отмечалось максимальное снижение уровня нитратов – разница с аналогичными данными лиц с более высоким соотношением ГЛУв/ГЛУо составила 28,71% ( $p<0,05$ ), с контрольной группой различия были еще более существенными, составив 52,11% ( $p<0,05$ ). У пациентов с более высоким соотношением ГЛУв/ГЛУо разница в сравнении с контрольной группой составила 32,82% ( $p<0,05$ ). Подобная динамика была выявлена для синтазы оксида азота – у пациентов с более низким соотношением ГЛУв/ГЛУо рассматриваемый показатель был ниже, чем у лиц с более высоким показателем ГЛУв/ГЛУо на 34,19% ( $p<0,05$ ), а также чем в контрольной группе на 55,41% ( $p<0,05$ ). По мере снижения соотношения ГЛУв/ГЛУо у пациентов основной группы отмечен прогрессивный рост содержания нитротирозина, который у пациентов основной группы был достоверно выше, чем в контрольной на 105,67% ( $p<0,05$ ) и 84,93% ( $p<0,05$ ) соответственно при низком и высоком соотношении ГЛУв/ГЛУо.

Таблица 1

#### **Метаболизм оксида азота и параметры нитрозирующего стресса обследованных лиц в зависимости от выраженности нарушения тиол-дисульфидного баланса М $\pm$ m (95%-доверительный интервал)**

Показатели	Больные ИБС		В целом по группе ИБС (n=121)	Контрольная группа (n=31)
	ГЛУв/ГЛУо > 5,5 у.е. (n=83)	ГЛУв/ГЛУо < 5,5 у.е. (n=38)		
Нитраты, мкмоль/л	18,46 $\pm$ 0,39 (17,69-19,23)*	13,16 $\pm$ 0,36 (12,43-13,88) * #	16,8 $\pm$ 0,36 (16,07-17,53)*	27,48 $\pm$ 0,90 (25,69-29,27)
NOS, мкмоль НАДФ/мин./г белка	6,26 $\pm$ 0,20 (5,86-6,65)*	4,12 $\pm$ 0,20 (3,72-4,51) * #	5,58 $\pm$ 0,17 (5,23-5,93)*	9,24 $\pm$ 0,5 (8,24-10,24)
Нитротирозин, нМоль/л	269,27 $\pm$ 2,27 (264,74-273,81)*	299,47 $\pm$ 3,67 (292,13-306,81) * #	278,76 $\pm$ 2,31 (274,13-283,38)*	145,61 $\pm$ 15,15 (115,31-175,92)

*Примечания:*

1. \* - отличия с контрольной группой статистически значимы ( $p<0,05$ );
2. # - отличия с группой с ГЛУв/ГЛУо >5,5 у.е. статистически значимы ( $p<0,05$ ).

Отмечена достоверная разница по данному показателю между пациентами с различным

соотношением ГЛУв/ГЛУо, которая составила 11,22% ( $p < 0,05$ ). Таким образом, у больных с ИБС по мере увеличения выраженности нарушений тиол-дисульфидного баланса зафиксированы изменения метаболизма оксида азота в виде снижения содержания нитратов, снижения активности NO-синтазы, а также рост содержания нитротирозина. Эти изменения характеризуют прогрессирование эндотелиальной дисфункции у данной категории пациентов. Это позволяет заключить, что формирование эндотелиальной дисфункции статистически значимо ассоциируется с низким функциональным потенциалом глутатионового звена системы антиокислительной системы и с невозможностью адекватного пополнения пула восстановленного глутатиона.

При изучении патогенетических аспектов формирования нарушения функционального эндотелия в процессе формирования его дисфункции у больных ИБС и оценки не только степени/направленности, но и характера зависимости, описывающей функциональную взаимосвязь между числовыми переменными, мы провели регрессионный анализ, при котором в регрессионную модель в качестве независимой переменной (предиктора) включали параметры тиол-дисульфидного баланса (значения соотношения восстановленного к окисленному глутатиону), а в качестве зависимой переменной, подверженной влиянию со стороны независимого аргумента, использовали показатель концентрационной величины нитротирозина.

Как свидетельствуют данные, полученные в ходе регрессионного анализа (рис. 1), взаимосвязь между величиной ГЛУв/ГЛУо и значением нитротирозина наиболее адекватно характеризовала модель регрессии логарифмического вида  $\text{нитротирозин} = 373,2425 - 117,911 * \log_{10}(X)$ ,  $R = 0,49$ ,  $R^2 = 0,24$ , нормированный  $R^2 = 0,23$  при  $F = 14,29$   $p < 0,001$ . При значениях ГЛУв/ГЛУо менее 6 усл. ед. практически все значения нитротирозина превышали 260 нМоль/л. Это позволяет отметить, что уровень ГЛУв/ГЛУо, согласно рассчитанному квадратичному уравнению, определяет около 23% общей дисперсии величины нитротирозина. Это свидетельствует про важное патогенетическое значение нарушение обмена тиолов под влиянием оксидативных процессов в развитии нитрозирующего стресса с накоплением нитротирозина.

Таким образом, у больных с ИБС по данным лабораторных исследований, выявлены изменения со стороны нитрозирующего стресса, которые сопровождалось снижением содержания в плазме крови нитратов, снижением активности NOS, а также повышением плазменной концентрации нитротирозина. Указанные изменения у данной категории пациентов прогрессивно нарастали с возрастом, снижением толерантности к физической нагрузке, ухудшением активности антиоксидантных систем. Проведенный бинарный регрессионный анализ показал, что у больных ИБС, ключевой маркер окислительной деструкции оксида азота – 3-нитротирозин – достоверно, согласно логарифмической зависимости, снижается по мере роста уровня ГЛУ.

Анализ возможных факторов детерминирования толерантности к физической нагрузке после терапии, независимо от схемы лечения, согласно рассчитанным значениям отношения шансов и их доверительных интервалов, показал, что одними из возможных предикторов повышения толерантности к физической активности является первоначально высокий уровень соотношения ГЛУв и низкий – 3-нитротирозина (рис.1).

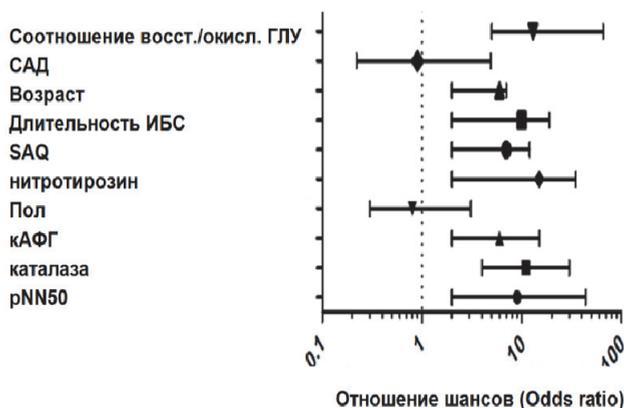


Рис. 1. Предикторы повышения толерантности к физической нагрузке (более 400 м согласно 6 мин. тесту).

Это указывает на функциональную недостаточность систем антиоксидантной защиты и генерации оксида азота на фоне повышенной интенсивности оксидативных процессов, в условиях снижения концентрации стабильных метаболитов оксида азота и несбалансированных изменений в системе антиоксидантной защиты и является предрасполагающими факторами развития снижения толерантности к физической нагрузке пациентов с ИБС.

#### **Выводы:**

1. Полученные данные показали, что при ИБС у пациентов с более выраженными проявлениями тиол-дисульфидного дисбаланса (соотношение ГЛУв/ГЛУо менее 5,5 у.е.) имеет место значительное снижение синтеза оксида азота и активация нарушения его биодоступности с элевацией уровня нитротирозина сыворотки крови.

2. Формирование эндотелиальной дисфункции статистически значимо ассоциируется с низким функциональным потенциалом глутатионового звена системы антиокислительной системы и с невозможностью адекватного пополнения пула восстановленного глутатиона плазмы.

3. По данным проведенного регрессионного анализа отмечено важное патогенетическое значение нарушение обмена тиолов под влиянием оксидативных процессов в развитии нитрозирующего стресса с накоплением нитротирозина при ИБС.

4. Одним из возможных предикторов повышения толерантности к физической активности при ИБС является первоначально высокий уровень соотношения ГЛУв и низкий – нитротирозина сыворотки крови.

5. Функциональная недостаточность систем антиоксидантной защиты и генерации оксида азота на фоне повышенной интенсивности оксидативных процессов, снижения концентрации стабильных метаболитов оксида азота и несбалансированных изменений в системе антиоксидантной защиты является предрасполагающими факторами развития снижения толерантности к физической нагрузке пациентов с ИБС.

#### **Перспективы дальнейших исследований**

В дальнейшем перспективными направлениями является оптимизация коррекции метаболизма тиолов и оксида азота путем применения новых метаболитотропных кардиопротекторов.

#### **Литература**

1. Ghezzi P., Bonetto V., Fratelli M. Thiol-disulfide balance: from the concept of oxidative stress to that of redox regulation // *Antioxidants & Redox Signaling*. – 2005.- Vol. 7, N 7/8. - P. 964 – 972.

2. Механизмы передачи сигнала оксидант - оксид азота в сосудистой ткани / Волин М. С., Дэвидсон К. А., Камински П. М. [и др.] // *Биохимия*. – 1998. – Т. 63, N 7. – С. 958–965.

3. Синяченко О. В. Оксид азота в терапевтической практике / О. В. Синяченко, Т. В. Звягина. – Донецк: Юго-Восток, 2001. – 258 с.

4. Владимиров Ю. А. Свободные радикалы и антиоксиданты / Ю. А. Владимиров // *Вест. Рос. Акад. Наук*. – 1998. – Вып. 7. – С. 43–51.

5. Ланкин В. З. Свободнорадикальные процессы в норме и при патологических состояниях: пособие для врачей / В. З. Ланкин, А. К. Тихазе, Ю. Н. Беленков. – М., 2001. – 78 с.

6. Окислительный стресс. Патологические состояния и заболевания / Меньщикова Е. Б., Зенков Н. К., Ланкин В. З. и др. – Новосибирск : АРТА, 2008. – 284 с.

7. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты / Меньщикова Е. Б., Ланкин В. З., Зенков Н. К. и др. – М.: Слово, 2006. – 553 с.

8. Ванин А. Ф. Динитрозильные комплексы железа и S-нитрозотиолы - две возможные формы стабилизации и транспорта оксида азота в биосистемах / А. Ф. Ванин // *Биохимия*. – 1998. – Т. 63, № 7. – С. 924 – 938.

9. Райхлин Н. Т. Регуляция и проявление апоптоза при физиологических условиях и в опухолях / Н. Т. Райхлин, А. Н. Райхлин // *Вопр. онкологии*. – 2002. – Т. 48, № 2. – С. 159–171.

10. Скулачев В. П. Кислород и явления запрограммированной смерти. Митохондрии, клетки и органы: роль активных форм кислорода / В. П. Скулачев. – М.: МГУ, 2000. – 48 с.

11. Hogg N. The role of glutathione in the transport and catabolism of nitric oxide / Hogg N., Singh R. J., Kalyanaraman B. // *FEBS. Lett*. – 1996. – Vol. 382. – P. 223–228.

12. Homocyst(e)ine decreases bioavailable nitric oxide by a mechanism involving glutathione peroxidase / Upchurch G. R., Welch G. N., Fabian A. J. [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1997. – Vol. 272. – P. 17012–17017.
13. Mallis R. J. Oxidative modification of H-ras: S-thiolation and S-nitrosilation of reactive cysteines / Mallis R. J., Buss J. E., Thomas J. A. // *Biochem J.* – 2001. – Vol. 355. – P. 145–153.
14. Нарушение функции эндотелия у пациентов с ишемической болезнью сердца в сочетании с артериальной гипертензией / Коваленко В. Н., Гуляя Н. М., Семикопная Т. В. [и др.] // *Укр. кардіол. журн.* – 2002. – № 3. – С. 5–8.
15. Гланц С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц. – М.: Практика, 1999. – 459 с.

### **References**

1. Ghezzi P., Bonetto V., Fratelli M. Thiol-disulfide balance: from the concept of oxidative stress to that of redox regulation. *Antioxidants & Redox Signaling* 7, 7&8, 2005. P. 964–972.
2. Mechanisms of signal oxidant–nitrogen oxide sending in vascular tissue / Volin M. C. et al // *Biochemistry.* – 1998. – Vol. 63, N 7. – P. 958–965 (Rus.).
3. Siniachenko O. V. NO in therapeutic practice. – Donetsk: South-East, 2001. – 258 p. (Rus.)
4. Vladimirov Yu. A. Free radicals and anti-oxidants // *Herald of Russian Academy of Sciences.* – 1998. – Iss. 7. – P. 43–51 (Rus.).
5. Lankin V. Z. Free-radicals processes in norm and at pathological states: Guide for doctors. - Moscow, 2001. – 78 p. (Rus.)
6. Oxidative stress. Pathological states and diseases / Menshikova Ye. B. et al.. – Novosibirsk: ARTA, 2008. – 284 p. (Rus.).
7. Oxidative stress. Pro-oxidants and anti-oxidants / Menshikova Ye. B. et al. – Moscow: Slovo, 2006. – 553 p. (Rus.)/
8. Vanin A. F. Dinitrosyl complexes of Fe and S-nitrosothiols – two possible forms of stabilization and transport of NO in biosystems // *Biochemistry.* – 1998. – Vol. 63, № 7. – P. 924 – 938 (Rus.).
9. Paykhlin N. T. Regulation and manifestation of apoptosis at physiological conditions and at tumors // *Problems of oncology.* – 2002. – Vol. 48, № 2. – P. 159–171 (Rus.).
10. Skulachiov V. P. Oxygen and events of programmed death. Chondriosomes, cells and organs: role of active forms of oxygen. – Moscow: MSU, 2000. – 48 p. (Rus.)
11. Hogg N. The role of glutathione in the transport and catabolism of nitric oxide / Hogg N., Singh R. J., Kalyanaraman B. // *FEBS. Lett.* – 1996. – Vol. 382. – P. 223–228.
12. Homocyst(e)ine decreases bioavailable nitric oxide by a mechanism involving glutathione peroxidase / Upchurch G. R., Welch G. N., Fabian A. J. [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1997. – Vol. 272. – P. 17012–17017.
13. Mallis R. J. Oxidative modification of H-ras: S-thiolation and S-nitrosilation of reactive cysteines / Mallis R. J., Buss J. E., Thomas J. A. // *Biochem J.* – 2001. – Vol. 355. – P. 145–153.
14. Disturbances of endothelium functions in patients with ischemic heart disease in combination with arterial hypertension / Kovalenko V. N. et al. // *Ukr. Cardiological J.* – 2002. – № 3. – P. 5–8 (Rus.).
15. Glants S. Medical-biological statistics. – Moscow: Practice, 1999. – 459 p. (Rus.)

Работа поступила в редакцию 28.04.2016 года.

Рекомендована к печати на заседании редакционной коллегии после рецензирования