

© О. А. Вороб'єва

УДК 616.12-008. 331.1-06:616.13-004. 6]-072/.073-085.225.2

О. А. Вороб'єва

ПАТОФІЗІОЛОГІЧНА АССОЦІАЦІЯ НІТРОЗИЛІРУЮЩЕГО СТРЕССА І ЕФФЕКТОВ ПЛАЗМЕННИХ ТІОЛОВ ПРИ ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНІ СЕРДЦА У ЛІЦ СТАРШИХ ВОЗРАСТНИХ ГРУПП

Запорожський державний медичний університет (г. Запоріжжя)

Данна робота выполнена в соответствии с плановой научно-исследовательской работой кафедры клинической фармакологии, фармации, фармакотерапии и косметологии Запорожского государственного медицинского университета «Клініко-біохімічні аспекти діагностики та корекції ендотеліальної дисфункції у осіб з серцево-судинною патологією» (№ госрегистрации: 0108U005111).

Вступление. На протяжении последних десятилетий исследования свойств оксида азота (NO) показано, что это реакционная молекула играет роль важного регулятора многих метаболических и физиологических процессов в организме. Выяснение биофизических и бioхимических аспектов действия этого соединения является до сих пор актуальной и недостаточно исследованной проблемой [5].

Одним из важнейших вопросов остается роль NO в работе и регуляции кардиоваскулярной системы [6, 11]. Имеются многочисленные данные о проявлении вазодилататорной 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 [2, 4]. 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 [4, 8].

Под влиянием NO наблюдается окисление тиолов с образованием нитрозотиолов [1]. В плазме крови обнаружаются нитрозотиолы цистеина, альбумина, а в клетках – нитрозотиолы глутатиона, цистенилглицина, различных белков, включая очень важные для регуляции пролиферативной активности клеток и их апоптоза [10, 12]. NO – свободный радикал, вызывающий эндотелий-зависимую вазодилатацию, ингибирующий агрегацию тромбоцитов, адгезию лейкоцитов к эндотелию и пролиферацию гладкомышечных клеток сосудистой стенки [6, 8]. NO после конъюгации с супероксиданином направляется по различным путям преобразования

пероксинитрита, включая нитрование белков, образование нитрозотиолов, в том числе нитрозотиолов гомоцистеина [13-15]. 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 [15]. Кроме того, сам NO представляет парамагнитную молекулу, т. е. свободный радикал, и при неблагоприятных условиях метаболизма способен вызвать так называемый нитрозилирующий стресс (нитрозативный, нитрозирующий) [11].

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 [5, 7], большой интерес вызывают оценка роли нитрозативного стресса и глутатион-зависимых реакций. Поэтому изучение окислительного и нитрозативного напряжения, а также локальных тиол-дисульфидной и NO-ergicеской стресс-лимитирующих систем при ИБС, особенно в старших возрастных группах, 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 у лиц пожилого и старческого возраста.

Объект и методы исследования. Обследован 121 больной пожилого и старческого возраста, которые находились на лечении и обследовании в клинике КУ «Запорожская областная клиническая больница» ЗОР в рамках вышеуказанной научно-исследовательской работы, с диагнозом стабильная стенокардия напряжения II-III функционального класса (определялся согласно критериям, предложенным Канадской Ассоциацией Кардиологов) без клинически значимой сопутствующей патологии,

ПАТОФІЗІОЛОГІЯ

Таблица

Метаболізм оксида азота і параметри нитрозилируючого стресу обслідованих лиц в залежності вираженості нарушения тиол-дисульфідного баланса $M \pm t$ (95%-доверительний інтервал)

| 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±0,39 (17,69-19,23)* | 13,16±0,36 (12,43-13,88) ** | 16,8±0,36 (16,07-17,53)* | 27,48±0,90 (25,69-29,27) |
| NOS, мкмоль НАДФ/ мин./г белка | 6,26±0,20 (5,86-6,65)* | 4,12±0,20 (3,72-4,51) ** | 5,58±0,17 (5,23-5,93)* | 9,24±0,5 (8,24-10,24) |
| Нитротирозин, нМоль/л | 269,27±2,27 (264,74-273,81)* | 299,47±3,67 (292,13-306,81) ** | 278,76±2,31 (274,13-283,38)* | 145,61±15,15 (115,31-175,92) |

Примечание: * – отличия с контрольной группой статистически значимы ($p<0,05$); ** – отличия с группой с ГЛУв/ГЛУо > 5,5 у. е. статистически значимы ($p<0,05$).

средний возраст $77,12 \pm 0,71$ лет, 53 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 33 практически здоровых человека без клинически значимой кардиоваскулярной патологии и релевантных различий по возрасту с группой больных ($71,33 \pm 1,36$ лет). Все пациенты получали ацетилсалициловую кислоту, нитраты, статины, бета-блокаторы.

Определение стабильных метаболитов моноксида азота в тканях головного мозга по Гриссу (Принцип метода – стабильными метаболитами моноксида азота – являются нитриты, которые, реагируя с реагентом Грисса, образуют стойкий окрашенный комплекс, имеющий максимум поглощения при длине волны 540 нм). Обязательным в исследование системы оксида азота является определение активности/экспрессии NOS, для определения общей активности которой использовали флюорометрический метод определения ее активности (Принцип метода – в катализируемой NO-сингтазой реакции образования моноксида азота из аргинина, происходит стериометрическое 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 несвязанный выборок, для большего числа выборок – критерий Kruskal-Wallis

с дальнейшим сравнением по Games-Howell. Результаты исследования обработаны с применением статистического пакета лицензионной программы «STATISTICA® for Windows 6. 0» (StatSoft Inc., № AXXR712D833214FAN5) на кафедре медицинской информатики ЗГМУ, а также «SPSS 16. 0», «Microsoft Excel 2003». Отдельные статистические процедуры и алгоритмы реализованы в виде специально написанных макросов в соответствующих программах [3]. Результаты представляли в виде: среднее значение \pm стандартная ошибка репрезентативности средней величины. Достоверными считали различия при уровне значимости $<0,05$.

Результаты исследований и их обсуждение. Предварительно мы рассчитали 50 персентиль всех значений соотношения ГЛУв/ГЛУо, которое составило 5,5 у. е.

В таблице приведены данные анализа метаболизма оксида азота и нитрозилирующего 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.

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 пожилого и старческого возраста 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 нитротиразина. 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 нитротиразина.

Как свидетельствуют данные, полученные в ходе регрессионного анализа (рис. 1), взаимосвязь между величиной ГЛУв/ГЛУо и значением нитротиразина наиболее адекватно характеризовала модель регрессии логарифмического вида нитротиразин = $373,2425 - 117,911 \cdot \log_{10}(X)$, $R = 0,49$, $R^2 = 0,24$, нормированный $R^2 = 0,23$ при при $F = 14,29$ $p < 0,001$. При значениях ГЛУв/ГЛУо менее 6 усл. ед.

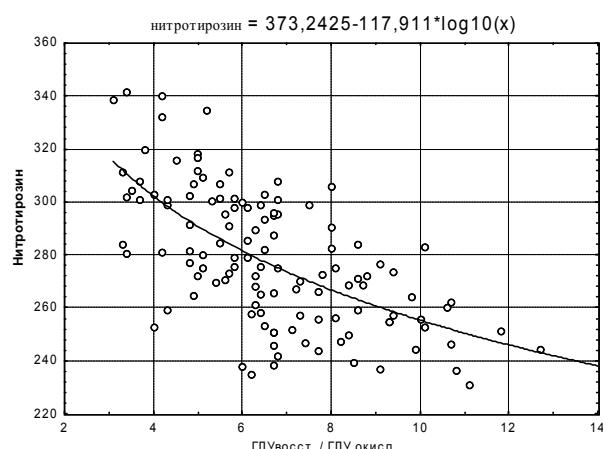


Рис. 1. Результаты регрессионного анализа взаимосвязи между концентрацией нитротиразина и фракций глутатиона у больных ИБС пожилого и старческого возраста.

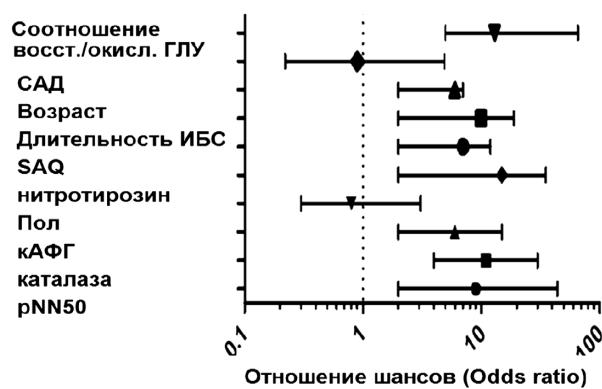


Рис. 2. Предикторы повышения толерантности к физической нагрузке (более 350 м согласно 6 мин. тесту).

практически все значения нитротиразина превышали 260 нМоль/л.

Это позволяет отметить, что уровень ГЛУв/ГЛУо, согласно рассчитанному квадратичному уравнению, определяет около 23% общей дисперсии величины нитротиразина. Это свидетельствует про важное патогенетическое значение нарушение обмена тиолов под влиянием оксидативных процессов в развитии нитрозирующего стресса с накоплением нитротиразина.

Таким образом, у больных с ИБС пожилого и старческого возраста по данным лабораторных исследований, выявлены изменения со стороны нитрозирующего стресса, которые сопровождались снижением содержания в плазме крови нитратов, снижением активности NOS, а также повышением плазменной концентрации нитротиразина. Указанные изменения у данной категории пациентов прогрессивно нарастили с возрастом, снижением толерантности к физической нагрузке, ухудшением активности антиоксидантных систем. Проведенный бинарный регрессионный анализ показал, что у больных ИБС пожилого и старческого возраста, ключевой маркер окислительной деструкции оксида азота – 3-нитротиразин – 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 являются первоначально высокий уровень соотношения ГЛУв и низкий – 3-нитротиразина (рис. 2).

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

ПАТОФІЗІОЛОГІЯ

факторами развития снижения толерантности к физической нагрузке пациентов пожилого и старческого возраста с ИБС.

Выводы.

1. Полученные данные показали, что при ИБС у пациентов пожилого и старческого возраста с более выраженным проявлениемми 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 нитротиазина 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 нитротиазина при ИБС у пациентов пожилого и старческого возраста.

4. Одним из возможных предикторов повышения толерантности к физической активности при ИБС у пациентов пожилого и старческого возраста является первоначально высокий уровень соотношения ГЛУв и низкий – нитротиазина 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 пожилого и старческого возраста с ИБС.

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

Список литературы

1. 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.
2. Владимиров Ю. А. Свободные радикалы и антиоксиданты / Ю. А. Владимиров // Вест. Рос. Акад. Наук. – 1998. – Вып. 7. – С. 43-51.
3. Гланц С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц. – М.: Практика, 1999. – 459 с.
4. 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.
5. Малая Л. Т. Эндотелиальная дисфункция при патологии сердечно-сосудистой системы / Л. Т. Малая, А. Н. Корж, Л. Б. Балковая. – Х.: Форсинг, 2000. – 432 с.
6. Механизмы передачи сигнала оксидант – оксид азота в сосудистой ткани / Волин М. С., Дэвидсон К. А., Камински П. М. [и др.] // Биохимия. – 1998. – Т. 63, 7. – С. 958-965.
7. 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.
8. Окислительный стресс. Патологические состояния и заболевания / [Меныцикова Е. Б., Зенков Н. К., Ланкин В. З. и др.]. – Новосибирск: АРТА, 2008. – 284 с.
9. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты / [Меныцикова Е. Б., Ланкин В. З., Зенков Н. К. и др.]. – М.: Слово, 2006. – 553 с.
10. 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.
11. Синяченко О. В. Оксид азота в терапевтической практике / О. В. Синяченко, Т. В. Звягина. – Донецк: Юго-Восток, 2001. – 258 с.
12. Скулачев В. П. Кислород и явления запрограммированной смерти. Митохондрии, клетки и органы: роль активных форм кислорода / В. П. Скулачев. – М.: МГУ, 2000. – 48 с.
13. 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.
14. 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.
15. Mallis R. J. Oxidative modification of H-ras: S-thiolation and S-nitrosylation of reactive cysteines / Mallis R. J., Buss J. E., Thomas J. A. // Biochem J. – 2001. – Vol. 355. – P. 145-153.

ПАТОФІЗІОЛОГІЯ

УДК 616.12-008. 331.1-06:616.13-004.6]-072/.073-085.225.2

ПАТОФІЗІОЛОГІЧЕСКАЯ АССОЦІАЦІЯ НІТРОЗИЛІРУЮЩЕГО СТРЕССА И ЭФФЕКТОВ ПЛАЗМЕННЫХ ТІОЛОВ ПРИ ІШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА У ЛИЦ СТАРШИХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУПП

Вороб'єва О. А.

Проведено изучение закономерностей патофизиологической сопряженности метаболизма оксида азота и параметров тиол-дисульфидного баланса при ИБС у лиц пожилого и старческого возраста. 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 у пациентов пожилого и старческого возраста является первоначально высокий уровень соотношения глутатиона и низкая концентрация нитротирозина сыворотки крови.

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

УДК 616.12-008.331.1-06:616.13-004.6]-072/.073-085.225.2

ПАТОФІЗІОЛОГІЧНА АСОЦІАЦІЯ НІТРОЗИЛЮЮЧОГО СТРЕСУ I ЕФЕКТІВ ПЛАЗМОВИХ ТІОЛОВ ПРИ ІШЕМІЧНІЙ ХВОРОБІ СЕРЦЯ У ХВОРИХ СТАРШИХ ВІКОВИХ ГРУП

Воробйова О. О.

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

Ключові слова: нітрозилиючий стрес, глутатіон, тіоли, нітротирозин.

UDC 616.12-008.331.1-06:616.13-004. 6]-072/.073-085.225.2

Pathophysiological Association Nitrozative Stress and Plasma Thiols Effects at Coronary Artery Disease in Older Patients

Vorobieva O. A.

Summary. The study of patterns of pathophysiological conjugation metabolism of nitric oxide and the parameters of the thiol-disulfide balance at CAD in elderly and senile patients. It is shown that with increasing of thiol-disulfide imbalance significantly reduced nitric oxide bioavailability and its elevation to the nitrotirozin level. One of the predictors of increased tolerance to physical activity in elderly patients with CAD it is initially high levels of glutathione ratio and low concentration of serum nitrotirozin.

Key words: nitrosative stress, glutathione, thiols, nitrotirozin.

Стаття надійшла 5.11.2012 р.

Рецензент – проф. Костенко В. О.