

УДК 616-008.9:612.124/.125

**О.Н. Огуркова, А.В. Ситожевский,
О.А. Кошельская, *Т.С. Федорова**

E-mail: oon@cardio.tsu.ru

ИЗУЧЕНИЕ ПРОДУКЦИИ ОКСИДА АЗОТА ТРОМБОЦИТАМИ БОЛЬНЫХ С МЕТАБОЛИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ

ГУ НИИ кардиологии Томского научного центра
СО РАМН;

*ГОУ ВПО Сибирский государственный
медицинский университет Росздрава, г. Томск

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время наблюдается высокая распространенность сочетания нарушений углеводного обмена с атеросклерозом, гипертонической болезнью и ожирением, что является основной причиной смертности в индустриально развитых странах. Для такого сочетания был предложен термин «метаболический синдром». В патогенезе данного синдрома важная роль отводится состоянию инсулинорезистентности [1,2,3]. Известно, что при инсулинорезистентности снижается инсулинстимулированная продукция оксида азота эндотелиальными и гладкомышечными клетками [6,9,12]. Оксид азота является важным фактором, регулирующим межклеточную адгезию, тонус сосудов и транспорт глюкозы в гладкомышечные клетки [12,14], так же NO регулирует процессы агрегации-деагрегации тромбоцитов, синтезируясь не только в эндотелиальных и гладкомышечных клетках, но и в самих тромбоцитах, сдерживая проагрегационное действие тромбоксана A_2 , осуществляя тем самым саморегуляцию тромбоцитами собственной активности [8]. Модификация NO-синтазной активности тромбоцитов больных с метаболическим синдромом может играть центральную роль в возникновении их гиперактивности

и формировании микро- и макроангиопатий. По современным представлениям, в стенке сосуда функционирует сложная межклеточная кооперация, включающая эндотелиоциты, гладкомышечные клетки, моноциты, полиморфноядерные лейкоциты и тромбоциты [12,13,14]. Данные об изменении продукции NO моноцитами, нейтрофилами и тромбоцитами – основными участниками межклеточной кооперации, неоднозначны и зачастую носят противоречивый характер. Нарушение продукции оксида азота эндотелиальными и другими видами клеток может быть связано с компонентами метаболического синдрома, но механизмы этого явления остаются малоизученными. Целью данной работы явилось изучение продукции оксида азота тромбоцитами больных с метаболическим синдромом и здоровых доноров.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

В ходе выполнения данной работы было обследовано 36 человек. Группу больных, состоящую из 26 больных с сочетанием ИБС, АГ и сахарным диабетом 2-го типа в возрасте от 45-55 лет, обозначили как группу больных с метаболическим синдромом. На основании контрольных параметров компенсации сахарного диабета 2-го типа, предложенных European NIDDM Policy Group, 1993г., больные были разделены на три группы: I группа – больные с компенсированным течением сахарного диабета 2-го типа (n=6); II группа – больные с субкомпенсированным течением (n=10); III группа – больные с декомпенсированным течением сахарного диабета 2-го типа (n=10). Клиническая характеристика больных представлена в табл. 1. В контрольную группу были включены 10 здоровых добровольцев в возрасте от 35 до 45 лет, не страдающих сахарным диабетом, ожирением, с нормальным артериальным давлением, без сосудистых и эндокринных заболеваний в анамнезе. Для определения продукции

Таблица 1

Клиническая характеристика больных с метаболическим синдромом и здоровых доноров

Показатель	I группа (n=6)	II группа (n=10)	III группа (n=10)	Здоровые доноры (n=10)
Длительность диабета, года	3,0±0,7	4,3±1,0	5,3±0,8	Не выявлено
Длительность артериальной гипертензии, года	7,7±0,5	6,8±1,2	8,8±1,4	Не выявлено
Систолическое АД, мм рт.ст.	157,1±9,0	158,8±9,5	152,3±5,2	123,7±1,2
Диастолическое АД, мм рт.ст.	92,4±4,1	89,5±3,9	87,8±2,8	66,5±0,8
Индекс массы тела, кг/м ²	33,3±1,4	31,4±0,8	33,0±0,8	22,9±0,2

Примечание: * – p≤0,05 различия с контролем.

оксида азота тромбоцитами клетки выделяли из венозной крови с 6%-ным ЭДТА путем центрифугирования 15 минут при 200 g, и затем клетки ресуспендировали в 1 мл раствора Хенкса. Определение продукции NO проводили методом конверсии оксигемоглобина в метгемоглобин оксидом азота и изменении абсорбции при 577 нм. Оксигемоглобин получали следующим методом: гемоглобин человека ("Sigma", США) смешивали с дитионатом натрия "Sigma" (США) и хроматографировали через колонку 30x1 см с сефадексом G-25 ("Pharmacia", Швеция). Отбирали ярко красную фракцию оксигемоглобина, разливали в пробирки и хранили при -20°C, концентрацию гемоглобина определяли при $\lambda=415$ нм, коэффициент экстинкции $131000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [7].

В кювету в раствор Хенкса вносили тромбоциты в концентрации 10^8 клеток/мл. В качестве индуктора образования оксида азота добавляли адреналин в концентрации 5 мкг/мл ("Технология-Стандарт", Россия). Расчет продукции оксида азота проводили, оценивая снижение абсорбции оксигемоглобина при $\lambda=577$ нм, коэффициент экстинкции $11\,200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ и выражали в пмоль NO/мин/ 10^8 клеток. Показатели глюкозы, гликозилированного гемоглобина, мочевой кислоты и липидного спектра определяли с помощью стандартных наборов ("Bioson", Германия). Полученные результаты анализировали с помощью интегрированной системы статистического анализа STATISTICA 6.0. фирмы StatSoft Inc., USA. Статистическую значимость различий параметров сравниваемых групп оценивали по непараметрическим критериям U-Манна-Уитни и Вилкоксона, данные представлены в виде $M \pm m$, различия считались статистически значимыми при достигнутом уровне значимости $p < 0,05$. Корреляционный анализ проводили с использованием коэффициента корреляции Спирмана.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При исследовании биохимических показателей во всех группах больных были обнаружены биохимические маркеры метаболического синдрома: гипергликемия, гиперурикемия и дислипидемия, характеризующаяся увеличением общего холестерина, триацилглицеролов и снижением холестерина в ЛПВП (табл. 2). Гипергликемия и гиперурикемия могут приводить к изменению липидного спектра крови. Действительно, при проведении корреляционного анализа в группе больных с декомпенсированным течением сахарного диабета 2-го типа выявлена положительная взаимосвязь между уровнем триацилглицеролов и содержанием гликозилированного гемоглобина ($r=0,58$; $p < 0,05$), а также содержанием мочевой кислоты ($r=0,65$; $p < 0,05$). Таким образом, полученные результаты свидетельствуют об атерогенных изменениях липидного спектра крови, наиболее отчетливо выраженных в группе больных с декомпенсированным течением сахарного диабета 2-го типа и о взаимосвязи изменений углеводного и пуринового обменов с процессами метаболизма липидов. Дислипидемия, гипергликемия и инсулинорезистентность оказывают существенное влияние на функциональные и метаболические характеристики клеток иммунокомпетентной системы [1,7]. Итогом этих сдвигов может быть изменение функционального состояния сердечно-сосудистой системы, в том числе нарушение эндотелийзависимой релаксации сосудов. Моноциты, тромбоциты и эндотелиальные клетки продуцируют оксид азота, который является частью многокомпонентной системы регуляции сосудистого тонуса и обладает антиатерогенным эффектом [14]. Базальная и гормон-индуцированная продукция

Таблица 2

Биохимические показатели больных с метаболическим синдромом и здоровых доноров

Показатель	I группа (n=6)	II группа (n=10)	III группа (n=10)	Здоровые доноры (n=10)
Глюкоза, ммоль/л	$5,31 \pm 0,45^{***}$	$6,61 \pm 0,73^*$	$8,60 \pm 0,8^*$	$4,53 \pm 0,11$
Гликозилированный гемоглобин, %	$7,42 \pm 0,27^{***}$	$7,83 \pm 0,29^{****}$	$8,71 \pm 0,22$	Не определяли
Мочевая кислота, мкмоль/л	$384,25 \pm 13,56^*$	$383,82 \pm 19,82^*$	$391,78 \pm 15,33^*$	$327,50 \pm 15,75$
Общий холестерол, ммоль/л	$5,30 \pm 0,32^{**}, ***$	$5,81 \pm 0,21^*$	$6,39 \pm 0,24^*$	$4,88 \pm 0,15$
Триацилглицеролы, ммоль/л	$1,95 \pm 0,18^*$	$2,35 \pm 0,24^*$	$3,11 \pm 0,478^*$	$1,29 \pm 0,06$
Холестерол ЛПВП, ммоль/л	$1,11 \pm 0,07$	$1,06 \pm 0,07^*$	$1,04 \pm 0,06^*$	$1,26 \pm 0,04$
Холестерол ЛПНП, ммоль/л	$3,27 \pm 0,25$	$3,63 \pm 0,16^*$	$3,98 \pm 0,20^*$	$3,12 \pm 0,16$
Индекс атерогенности	$3,03 \pm 0,30^{***}$	$3,50 \pm 0,25^*$	$4,06 \pm 0,24^*$	$2,44 \pm 0,14$

Примечание: * - $p < 0,05$ различия с контролем; ** - $p < 0,05$ различия I группы со II; *** - $p < 0,05$ различия I группы с III; **** - $p < 0,05$ различия II группы с III.

Таблица 3

**Базальная и адреналининдуцированная продукция оксида азота тромбоцитами
здоровых доноров и больных метаболическим синдромом**

Исследованные показатели	Содержание оксида азота (пмоль NO/ мл /108 клеток)			
	I группа (n=6)	II группа (n=10)	III группа (n=10)	Контроль (n=10)
Базальная продукция	112,56±12,50	119,12±15,06 *	85,97±9,38 *	230,57±15,47
Адреналин [5 мкг/мл]	105,01±13,42 * ***	121,06±15,43 *	124,03±13,02 * **	180,01±19,72

Примечание: * - $p < 0,05$ различия с контролем; ** - $p < 0,05$ различия между базальной и адреналининдуцированной продукцией оксида азота; *** - $p < 0,05$ различия I группы с III.

оксида азота отражает степень функциональной активности клеток. При изучении продукции оксида азота тромбоцитами выявлено, что базальная продукция NO во всех группах больных с метаболическим синдромом снижена по сравнению с группой здоровых доноров, причем наиболее низкое образование оксида азота наблюдалось в группе больных с декомпенсированным течением сахарного диабета 2-го типа (табл. 3). Снижение базального образования оксида азота клетками больных с метаболическим синдромом может быть вызвано различными причинами. В условиях гипергликемии в результате аутоокисления глюкозы образуется супероксидный анион, который взаимодействует с оксидом азота с образованием пероксинитрита, что приводит к снижению содержания NO [5,10]. Известно, что в тромбоцитах функционирует Ca^{2+} -кальмодулинзависимая конститутивная NO-синтаза, поэтому снижение базального образования оксида азота может быть результатом гликозилирования кальмодулина, кроме того, метаболические нарушения могут влиять на экспрессию NO-синтазы в мегакариоцитах и приводить к снижению активности фермента в тромбоцитах [7]. При сахарном диабете наблюдается увеличение адгезивной способности тромбоцитов и отмечается их повышенная спонтанная агрегация [8,11]. На мембране этих клеток присутствуют α_2 - и β_2 - адренорецепторы, повышение уровня холестерина сопровождается ростом плотности α_2 -адренорецепторов на мембране тромбоцитов и усилением агрегации клеток в ответ на действие адреналина [4,11]. Механизм адреналининдуцированной агрегации связан с α_2 - типом рецепторов, взаимодействие с которыми приводит к ингибированию аденилатциклазы, экспозиции фибриногеновых мест для связывания и образованию тромбосана A_2 [4]. Как известно, оксид азота обладает антиагрегантным действием, в связи с этим одной из задач данной работы явилось изучение влияния адреналина на продукцию оксида азота тромбоцитами. В группе здоровых лиц не было обнаружено статистически значимой разницы между базальной и адреналининдуцированной продукцией NO, но при проведении корреляционного анализа была получена положительная взаимосвязь между уровнем холестерина в сыворотке крови и продукцией NO тромбоцитами в ответ на добавление

адреналина ($r=0,70$; $p < 0,05$). При этом в группе больных с декомпенсированным течением сахарного диабета 2-го типа, характеризующейся наиболее выраженными нарушениями липидного обмена, добавление адреналина в суспензию клеток увеличивало продукцию оксида азота тромбоцитами (табл. 3). При повышении содержания холестерина, увеличивается агрегация тромбоцитов в ответ на адреналин [4], но одновременно происходит увеличение продукции оксида азота клетками, таким образом, вариации уровня холестерина тесно взаимосвязаны с изменением продукции оксида азота клетками, что позволяет предположить наличие ауторегуляторного механизма, контролирующего гиперагрегацию тромбоцитов.

ВЫВОДЫ

1. Базальная и адреналининдуцированная продукция оксида азота тромбоцитами больных с метаболическим синдромом снижена по сравнению с продукцией оксида азота клетками здоровых доноров.
2. Адреналин в концентрации 5 мкг/мл *in vitro* приводит к увеличению продукции оксида азота тромбоцитами больных с декомпенсированным течением сахарного диабета 2-го типа.

ЛИТЕРАТУРА

1. Метаболический сердечно-сосудистый синдром /Алмазов В.А., Благосклонная Я.В., Шляхто Е.В., Красильникова Е.И. – Санкт-Петербург.: Изд-во СПб ГМУ, 1999. – 204 с.
2. Подзолков В.И. Прединдикторы возникновения основных факторов сердечно-сосудистого риска у больных с метаболическим синдромом / В.И. Подзолков, Д.А. Напалков, В.И. Маколкин // Кардиология. – 2003. – № 4. – С. 3-7.
3. Ройтберг Г.Е. Роль инсулинорезистентности в диагностике метаболического синдрома / Г.Е. Ройтберг, Т.И. Ушакова, Ж.В. Дорош // Кардиология. – 2004. – № 3 – С. 94-101.
4. Шитикова А.С. Тромбоцитарный гемостаз / А.С. Шитикова – СПб.:2000.- 222 с.
5. Alterations in platelet Ca^{2+} signaling in diabetic patients is due to increased formation of superoxide anions and reduced nitric oxide production / G. Schaeffer, T.C. Wascher, G.M. Kostner, W.F. Graier // Diabetologia. – 1999. – Vol. 42, №5. – P. 167-176.

6. Bedard S. Insulin inhibition iNOS in the skelet muscle cell / S. Bedard, B. Marcotte // *Diabetologia*. – 1998. – Vol. 12. – P. 125-129.
7. Decreased nitric oxide synthase activity in platelets from IDDM and NIDDM patients / R.A. Rabini, R. Staffolani, P. Fumelli et al. // *Diabetologia* – 1998. – Vol. 41, №1. – P. 101-104.
8. Differential inhibition of human platelet aggregation and thromboxane A2 formation by L-arginine in vivo and in vitro / S.M. Bode-Boger, R. H. Boger, A. Galland, J.C. Frolich // *Naunyn-Schmiedeberg archives of pharmacology*. – 1998. – Vol. 357. – № 4. – P. 143-150.
9. Drapier J.C. L- argining derived nitric oxide and the cell-mediated immune response / J.C. Drapier // *Res. Immunol*. – 1991. – Vol. 142. – P. 553-555.
10. Evidence for iNOS-dependent peroxynitrite production in diabetic platelets / M. Tannous, R.A. Rabini, A. Vignini et al. // *Diabetologia* – 1999. – Vol. 42, № 5. – P. 539-544.
11. Firkin B.G. The platelet and its disorders / B.G. Firkin. – MTP Press Limited, England, 1984. – 257 p.
12. Forstermann U. Calmodulindependent endothelium-derived relaxing factor / nitric oxide synthase activity in present in the particulate and cytosolic fractions of bovine aortic endothelial cells / U. Forstermann, J.S. Pollock, G.H. Schmid // *Proc. Nat. Acad. Sci.* – 1991. – Vol. 8. – № 5. – P. 1788-1795.
13. Hauschild S. Induction and activity of NO synthase in bone-marrow derived macrophages are independent of Ca⁺⁺ / S. Hauschild, A. Luschnoff, A. Mulsch // *Biochem. J.* – 1990. – Vol. 270. – № 1. – P. 351-360.
14. Nitric oxide syntesis in the CNS, endotelium and macrofages differs in its sensitivity to inhibition by arginine analogues / L.E. Lambect, Y.P. Whitten, B.M. Baron et al. // *Life Sci*. – 1991. – Vol. 48. – P. 69-75.

STUDYING NITRIC OXIDE PRODUCTION BY PLATELETS OF PATIENTS HAVING METABOLIC SYNDROME

O.N. Ogourkova, A.V. Ssitozhevski,
O.A. Koshel'skaya, T.S. Fedorova

SUMMARY

The study was performed in 26 patients having metabolic syndrome and in 10 control subjects. The platelet was isolated from peripheral venous blood. Basal and adrenalin-induced production of nitric oxide was measured using spectrophotometry method which was followed by the oxidation of oxihemoglobin to methemoglobin by the nitric oxide. The study results demonstrated that basal and adrenalin-induced nitric oxide production in platelet of patients with metabolic syndrome was reduced compared with control subjects. Our results suggest that adrenalin increased nitric oxide production of platelets in patients having metabolic syndrome.