

УДК 616.12-008.46-074:616.45-001.1/3

СВЯЗЬ ПЛАЗМЕННОГО СОДЕРЖАНИЯ ГАЛЕКТИНА-3 С МАРКЕРАМИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО И НИТРОЗИЛИРУЮЩЕГО СТРЕССОВ У БОЛЬНЫХ С ХРОНИЧЕСКОЙ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ

Ю.В. Шукин, Е.И. Селезнев, И.И. Березин, Е.А. Медведева, В.А. Дьячков

ГБОУ ВПО «Самарский государственный медицинский университет»

Шукин Юрий Владимирович – e-mail: samgmu_pt@mail.ru

В статье представлены результаты определения плазменного содержания галектина-3 и показателей окислительного и нитрозилирующего стрессов у больных с хронической сердечной недостаточностью ишемической этиологии. По результатам исследования получены достоверные связи уровня галектина-3 и окЛПНП, внеклеточной супероксиддисмутазы, 3-нитротирозина у группы исследуемых пациентов.

Ключевые слова: галектин-3, хроническая сердечная недостаточность, окислительный стресс, нитрозилирующий стресс.

In article presents results of the definition of plasma level galectin-3 and indicators of oxidative and nitrosative stresses in patients with chronic heart failure of ischemic etiology. By results of research obtained significant association level galectin-3 and oxidized low-density lipoprotein, extracellular superoxide dismutase, 3-nitrotyrosine in group of study patients.

Key words: galectin-3, chronic heart failure, oxidative stress, nitrosative stress.

Необходимым условием диагностики и прогноза хронической сердечной недостаточности (ХСН) является определение биологически уникальных биомаркеров. Поэтому в настоящее время разрабатываются мультимаркерные подходы для оценки пациентов с подозреваемой или доказанной ХСН. Так, в работе Lee D.S., Vasan R.S. [1] предлагаются возможные мультимаркерные стратегии и классификация сывороточных биомаркеров ХСН на четыре категории: нейрогормональные, деструкции кардиомиоцитов, ремоделирования матрицы миокарда и эндогенного воспаления.

В реальной кардиологической практике широкое применение нашли лишь два молекулярных маркера ХСН – мозговой натрийуретический пептид (BNP) и N-концевой фрагмент предшественника BNP – NT-proBNP. Однако, при стабильно выраженной ХСН эти два показателя могут иметь значительную вариабельность значений и зависеть от таких факторов, как пол, возраст, вес тела пациента, наличие фибрилляции предсердий или почечной недостаточности [2]. Поэтому с позиции новой мультимаркерной стратегии диагностики, оценки качества лечения, определения прогноза и выраженности патогенетических факторов ХСН есть необходимость в поиске новых эффективных тестов диагностики этого состояния.

Одним из современных достижений молекулярной биологии и медицины является открытие нового биомаркера галектина-3 (Гал-3). Это белок с молекулярной массой 26 кДа из группы галектинов (более 10), обладающий структурой в виде tandemных повторов коротких аминокислотных последовательностей – N-концевой домен, связанный с C-концевым углеводраспознающим доменом (около 130 аминокислот). При этом C-концевой домен отвечает за лектин-активность, а присутствие N-концевого домена необходимо для полной биологической активности галектина-3 [3, 4].

Галектин-3 широко представлен в различных тканях и в клетках он локализуется в цитоплазме, саркоплазматическом ретикулуме, ядрах и митохондриях. Цитозольный пул

Гал-3 при активации смещается к плазматической мембране и интегрируется в пузырьках для выделения из мембраны. Галектин-3 участвует во многих биологических процессах, таких как рост и пролиферация клеток, апоптоз, эндогенное воспаление, фиброз миокарда и др. [5, 6]. Остается невыясненной связь галектина-3 с одним из важнейших факторов патогенеза ХСН – окислительным и нитрозилирующим стрессами.

Цель исследования: определить возможность использования плазменного содержания галектина-3 как показателя окислительного и нитрозилирующего стрессов у больных с хронической сердечной недостаточностью.

Материалы и методы

В исследование включен 101 пациент ($64,5 \pm 4,3$) с хронической сердечной недостаточностью, которые в прошлом перенесли инфаркт миокарда (ИМ) давностью более 2 лет. Критериями исключения являлись перенесенный ИМ давностью менее 6 месяцев, все виды онкологических заболеваний, тяжелая степень хронических легочных заболеваний, а также заболеваний печени и почек, острое нарушение мозгового кровообращения давностью менее 6 месяцев, сахарный диабет 1-го типа, возраст старше 75 лет. Диагностика ХСН основывалась на положениях Национальных рекомендаций по диагностике и лечению ХСН третьего пересмотра (2009). Эхокардиографию проводили на аппарате Logic-7. Больные были распределены по тяжести на 2 группы (таблица 1): 1-я группа – лица с ХСН IIIA III ФК и 2-я группа – пациенты с IIIB III - IV ФК. Контрольную группу (КГ) составили 36 практически здоровых лиц (средний возраст $54,7 \pm 4,5$ года), у которых при клинико-инструментальном обследовании не выявлялись признаки ИБС, ГБ, ХСН.

Содержание галектина-3 в плазме крови определяли иммуноферментным методом с помощью наборов фирмы «BCM Diagnostics». Активность плазменного окислительного стресса (ОС) оценивали по уровню окисляемости липопротеинов низкой плотности [7], а нитрозилирующего стресса – по содержанию протеинсвязанного 3-нитротирозина (3-НТ),

определяемого неферментным методом (наборы фирмы «НБТ»). Состояние антиокислительного компонента устанавливали по активности фермента внеклеточной супероксиддисмутазы (ЕхСОД) [8, 9]. Для верификации тяжести ХСН исследовали иммуоферментным методом содержание в плазме крови NT-proBNP.

Статистическая обработка полученных результатов осуществлялась с помощью непараметрических методов. Для сравнения различий между группами применялся критерий Уилкоксона, парный корреляционный анализ производился по методике Спирмена. Для анализа использовался пакет программ StatSoft Statistica 6.0.

Результаты и их обсуждение

Из таблицы 1 видно, что обе группы по возрасту и полу были практически одинаковыми. Тогда как величина ФВ ЛЖ и содержание NT-proBNP достоверно различались между группами. При этом значения ФВ ЛЖ у больных 2-й группы были ниже данного показателя 1-й группы на 22,5%, а концентрация NT-proBNP была выше у лиц 2-й группы в 3,7 раза. В обеих группах наблюдалась достоверная отрицательная корреляция в парах ФВ – NT-proBNP, соответственно $r_1 = -0,40$ ($p = 0,004$) и $r_2 = -0,48$ ($p = 0,021$). Полученные результаты указывают на то, что оценка тяжести течения ХСН по содержанию NT-proBNP в большей степени эффективна, чем по показателю ФВ ЛЖ. В то же время содержание галектина-3 достоверно не коррелировало с ФВ ЛЖ в обеих группах больных ХСН, тогда как в парах Гал-3 – NT-proBNP отмечалась умеренная достоверная корреляция как в 1-й, так и во 2-й группах (таблица 3). Полученные результаты соответствуют данным литературы [2, 4] и свидетельствуют о том, что экспрессия и выделение галектина-3 в отличие от NT-proBNP умеренно связано с фактором систолического стресса, но в большей степени галектин-3 индуцирует диастолическую дисфункцию [10].

Нами установлено, что концентрация галектина-3 в плазме больных 2-й группы (таблица 2) была достоверно выше по сравнению с лицами 1-й группы на 123% ($p < 0,001$). По совокупности имеющихся клинических данных плазменный галектин-3 значительно возрастает при острой и хронической сердечной недостаточности [4, 11]. Показано, что сердечные макрофаги активируются уже на ранней стадии сердечной недостаточности и в повышенном количестве выделяют галектин-3. При этом он увеличивает количество макрофагов и вызывает их альтернативную активацию, а также инфильтрацию тучных клеток. В свою очередь, тучные клетки являются важным источником цитокинов, факторов роста и хемокинов, в том числе гистамина, фактора некроза опухолей- α (ФНО- α), ядерного фактора κB и ренина, которые выпускаются при их дегрануляции [12]. Кроме этого галектин-3 активирует синтез коллагена I типа и усиливает процессы деградации компонентов внеклеточного матрикса. Таким образом, в сердце развиваются процессы воспаления и особенно фиброза, которые лежат в основе неблагоприятного ремоделирования миокарда у больных ХСН [13].

Окислительный стресс относится к ситуации, когда существует дисбаланс между производством активных форм кислорода (АФК) и антиоксидантной защитой. Причем наиболее патогенными в окислении многочисленных биологических субстратов являются такие АФК, как супероксид радикал $O_2^{\bullet}$, гидроксил-радикал $OH^{\bullet}$, а также пероксид водоро-

да H_2O_2 и окисленные липопротеины низкой плотности (окЛПНП) [14]. В нашем исследовании у всех больных ХСН наблюдалось прогрессирующее увеличение концентрации окисленных ЛПНП в условиях *in vitro* ионами меди. При этом содержание окЛПНП у пациентов 2-й группы на 38% ($p < 0,001$) превышало таковое у больных 1-й группы (таблица 2). Установлена корреляция средней силы между окЛПНП и ФВ ЛЖ, толерантностью к физической нагрузке [15]. Основным механизмом окисления ЛПНП является перенапряжение миокарда, вызывающее резкое увеличение образования АФК с последующим окислением ЛПНП как в клетках сердца, так и в плазме, а также процессы, развивающиеся при ишемии-реперфузии миокарда [16]. Известно, что галектин-3 активирует рецепторный захват окЛПНП и их внутриклеточное окисление [17]. При корреляционном анализе пары галектин-3 и окЛПНП обнаружены (таблица 3) средней силы достоверные положительные связи у обследуемых лиц 1-й и 2-й групп (соответственно $r_1 = 0,520$, $p = 0,0005$ и $r_2 = 0,560$, $p = 0,0007$). Окисленные ЛПНП проявляют множество негативных биохимических эффектов, что обеспечивает их вовлечение в процессы клеточной миграции, сокращения, генной экспрессии адгезивных молекул, белков теплового шока. Они стимулируют процессы синтеза цитокинов, факторов роста, апоптоза, эндотелиальной дисфункции, фиброза миокарда при ХСН [17, 18]. В процессах прогрессирования ХСН галектин-3 активирует мембранную НАД(Ф)Н-оксидазу, особенно фибробластов. Это вызывает значительное увеличение продукции АФК, которые, активируя Ras (низкомолекулярные ГТФ-связывающие белки), Akt-путь, P-1-3-киназы, iMAP-киназу, индуцируют реакции фиброза, воспаления и апоптоза миокарда [4, 5, 19, 20].

В последние годы изучается значение нитрозилирующего миокардиального стресса в патогенезе ХСН. Данное состояние развивается при избыточном образовании в клетках миокарда радикала оксида азота ($NO^{\bullet}$), который с высокой скоростью связывается с супероксид радикалом $O_2^{\bullet}$, образуя наиболее сильный окислитель биологических структур пероксинитрит ($ONOO^-$) [21]. При окислительном нитрозировании протеинсвязанного тирозина образуется 3-нитротирозин, который выходит в кровь и является высокочувствительным маркером клеточного нитрозилирующего стресса. В нашем исследовании содержание 3-НТ по сравнению с КГ прогрессирующе возрастало: в 1-й группе на 25% ($p < 0,01$) и во 2-й группе на 130% ($p < 0,001$). При этом уровень 3-НТ во 2-й группе был на 84% выше, чем в 1-й ($p < 0,001$). Полученные данные показывают, что интенсивность нитрозилирующего стресса, а, следовательно, содержание пероксинитрита в клетках сердца значительно возрастает у больных с тяжелым течением ХСН. Также установлено, что плазменное содержание галектина-3 довольно сильно положительно коррелирует с уровнем 3-НТ в обеих группах больных (таблица 3). Можно полагать, что галектин-3 активирует внутриклеточный миокардиальный нитрозилирующий стресс опосредованно, через стимуляцию НАД(Ф)Н-оксидазы и его способности освобождать супероксид радикал $O_2^{\bullet}$ из митохондрий [18].

Естественным антиоксидантом, снижающим активность нитрозилирующего стресса, является внеклеточная супероксиддисмутаза (ЕхСОД), которая нейтрализует супероксид-радикал кислорода [9]. В нашей работе было установлено,

что активность ЕхСОД у больных 1-й группы по сравнению с данными КГ умеренно, но достоверно повышена на 18%, ($p < 0,05$), а у лиц 2-й группы, наоборот, снижена на 22% ($p < 0,05$) (таблица 2). Такие изменения ЕхСОД в 1-й группе можно связать с активацией фермента, индуцируемой умеренно повышенной концентрацией супероксид радикала $O_2^{\bullet}$. Тогда как у пациентов 2-й группы с декомпенсированным окислительным и нитрозилирующим стрессами эффективность действия ЕхСОД частично ингибируется продуктами метаболизма АФК [22]. Это подтверждается результатами корреляционного анализа. Выявлено (таблица 3) наличие достоверной отрицательной корреляции в паре 3-НТ и ЕхСОД (в 1-й группе $r_1 = -0,320$, $p = 0,020$ и во 2-й группе $r_2 = -0,640$, $p = 0,0015$) и окЛПНП – ЕхСОД, которая была недостоверной только в первой группе (в 1-й группе $r_1 = -0,180$, $p = 0,145$ и во 2-й группе $r_2 = -0,480$, $p = 0,0008$). Также отрицательная корреляция средней силы наблюдалась и в паре Гал-3 – ЕхСОД (в 1-й группе $r_1 = -0,386$, $p = 0,0071$ и во 2-й группе $r_2 = -0,401$, $p = 0,0017$), что подтверждает связь галектина-3 с продукцией супероксид радикала $O_2^{\bullet}$ (таблица 3).

ТАБЛИЦА 1.

Характеристика больных ХСН

Показатели	Больные ХСН	
	1-я группа (n=54)	2-я группа (n=61)
Средний возраст (годы)	63,5±4,1	66,8±3,8
Мужчины (чел, %)	36 (69)	37 (61)
Женщины (чел, %)	18 (31)	24 (39)
Фракция выброса ЛЖ (%)	53±2,5	39±2,1*
NT-proBNP (нг/мл)	415±98,8	1550±95,4*
Лечение	Ингибиторы АПФ (чел., %)	51 (95)
	-блокаторы (чел., %)	45 (83)
	Диуретики (чел., %)	28 (52)

Примечания: * – обозначение наличия достоверных различий исследуемых показателей между группами.

ТАБЛИЦА 2.

Содержание галектина-3, 3-нитротирозина, окЛПНП и ЕхСОД в плазме крови у больных ХСН

Показатели	Контрольная группа (n=36) M(25-75 квартили)	Больные ХСН		p
		1-я группа (n=54) M(25-75 квартили)	2-я группа (n=61) M(25-75 квартили)	
Галектин-3 (нг/мл)	7,2 (5; 9)	13 (16; 18) *	29 (20; 37) *	<0,001
3-нитротирозин (нмоль/мл)	1,8 (1; 2,5)	2,5 (2; 3,5) *	4,6 (3,6; 5,9) *	<0,001
окЛПНП (нмоль/мг белка)	36,5 (30; 39)	45,5 (39; 49) *	60 (51; 70) *	<0,001
ЕхСОД (у. е./мл)	97 (80; 110)	115(95;129) *	76 (62; 94) *	<0,01

Примечания: * – показатель достоверности различий по отношению к КГ; p – показатель достоверности различий исследуемых показателей между группами.

ТАБЛИЦА 3.

Данные парной корреляции исследуемых показателей

Группы	1-я группа (n=54)		2-я группа (n=61)	
	Коефф. корреляции (r1)	p1-уровень	Коефф. корреляции (r2)	p2-уровень
Пары корреляции				
Гал-3 – ФВ ЛЖ	-0,210	0,1269	-0,142	0,2743
Гал-3 – NT-proBNP	0,307	0,0156	0,320	0,0118
Гал-3 – 3-НТ	0,595	0,0001	0,506	0,0001
Гал-3 – окЛПНП	0,520	0,0005	0,56	0,0007
Гал-3 – ЕхСОД	-0,386	0,0071	-0,401	0,0017
3-НТ – окЛПНП	0,575	0,0195	0,661	0,0002
3-НТ – ЕхСОД	-0,320	0,020	-0,640	0,0015
окЛПНП – ЕхСОД	-0,180	0,145	-0,480	0,0008

Заключение

Плазменное содержание нового биомаркера галектина-3 у больных с обострением ХСН тесно связано с показателями окислительного и нитрозилирующего стрессов как в патогенетическом, так и в диагностическом значении, и может быть использовано для оценки выраженности этих состояний у данной категории пациентов.

МА

ЛИТЕРАТУРА

- Lee D.S., Vasan R.S. Novel markers for heart failure diagnosis and prognosis. //Curr Opin Cardiol. 2005. 20. P. 201-210.
- Агеев Ф.Г., Азизова А.Г. Галектин-3 – новый биохимический маркер сердечной недостаточности. //Сердечная недостаточность. 2011. Т. 12. № 2. С. 108-114.
- Boer R.A., Voors A.A., Muntendam P. et al. Galectin-3: a novel mediator of heart failure development and progression. //Eur. J. Heart Fail. 2009. V. 11. P. 811-817.
- Shah R.V., Chen-Tournoux A.A., Picard M.H. et al. Galectin-3, cardiac structure and function, and long-term mortality in patients with acutely decompensated heart failure. //Eur. J. Heart Fail. 2010. № 8. P. 826-832.
- de Filippi C.R., Felker G.M. Galectin-3 in heart failure-linking fibrosis, remodeling, and progression. //US Cardiology. 2010. 7 (1). P. 67-70.
- Almkvist J., Karlsson A. Galectins as inflammatory mediators. //Glycocon. J. 2004. V. 19. P. 575-581.
- Рагино Ю.И., Воевода М.И., Душкин М.И. и др. Применение новых биохимических способов для оценки окислительно-антиоксидантного потенциала липопротеинов низкой плотности. Клиническая лабораторная диагностика. 2005. № 4. С. 11-15.
- Дубинина Е.Е., Туркин В.В., Бабенко Г.А. и др. Выделение и свойства супероксиддисмутазы плазмы крови человека. Биохимия. 1992. Т. 57. № 12. С. 1892-1901.
- Lu Z., Xu X., Hu X., Extracellular Superoxide Dismutase Deficiency Exacerbates Pressure Overload-Induced Left Ventricular Hypertrophy and Dysfunction. //Hypertension. 2008. V. 51 (1). P. 19-25.
- Boer R.A., Lok D.J., Jaarsma T. et al. Predictive value of plasma galectin-3 levels in heart failure with reduced and preserved ejection fraction. //Ann. Med. 2011. V. 43. P. 60-68.
- Sharma U.C., Pokharel S., Brakel T.J. et al. Galectin-3 Marks Activated Macrophages in Failure-Prone Hypertrophied Hearts and Contributes to Cardiac Dysfunction. //Circulation. 2004. V. 110. P. 3121-3128.
- MacKinnon A.C., Farnworth S.L., Hodgkinson P.S. et al. Regulation of alternative macrophage activation by galectin-3. //The J. Immunology. 2008. V. 180. P. 2650-2658.
- Boer R.A., Yu L., Veldhuisen D.J. Galectin-3 in cardiac remodeling and heart failure. //Curr. Heart Fail. Rep. 2010. V. 7. P. 1-8.
- Дубинина Е.Е. Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток. Санкт-Петербург. 2006 237 с.
- Zhu W., Sano H., Nagai R. et al. The Role of Galectin-3 in Endocytosis of Advanced Glycation End Products and Modified Low Density Lipoproteins. //Biochem. Biophys. Res. Commun. 2001. V. 2. № 4. P. 1183-1188.
- Марков Х.М. Молекулярные механизмы дисфункции сосудистого эндотелия. Кардиология. 2005. № 12. С. 62-71.
- Tsutsumi T., Tsutamoto T., Wada A. Plasma oxidized low-density lipoprotein as a prognostic predictor in patients with chronic congestive heart failure. //Journal of the American College Cardiology. 2002. V. 39. № 6. P. 957-962.
- Suzuki Y., Inoue T., Yoshimaru T., Ra C. Galectin-3 but not galectin-1 induces mast cell death by oxidative stress and mitochondrial permeability transition. //Biochim. Biophys. Acta. 2008. V. 1783 (5). P. 924-934.
- Lok D.J., van der Meer P., de la Porte PWB, et al. Prognostic value of galectin-3, a novel marker of fibrosis, in patients with chronic heart failure: data from the DEAL-HF study. //Clin. Res. Cardiol. 2010. V. 99 (5). P. 323-358.
- Nabeebaccus A., Zhang M., Shah A.M. NADPH oxidases and cardiac remodelling. //Heart Fail. Rev. 2011. V. 16. P. 5-12.
- Ungvari Z., Gupte S.A., Recchia F. et al. Role of Oxidative-Nitrosative Stress and Downstream Pathways in Various Forms of Cardiomyopathy and Heart Failure. //Curr. Vasc. Pharmacol. 2005. V. 20. P. 201-210.
- Меньшикова Е.Б., Зенков Н.К., Ланкин В.З. и др. Окислительный стресс. Патологические состояния и заболевания. Новосибирск. 2008. 290 с.