

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© САВЧЕНКО А.А., САВЧЕНКО Е.А. , ГРИНШТЕЙН Ю.И.

ГРИНШТЕЙН И.Ю.

УДК 612.111.7: 616.12 - 009.72

ЗАВИСИМОСТЬ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СТАТУСА ТРОМБОЦИТОВ ОТ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО КЛАССА СТЕНОКАРДИИ У БОЛЬНЫХ ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА

А.А. Савченко, Е.А. Савченко, Ю.И. Гринштейн, И.Ю. Гринштейн

Красноярский государственный медицинский университет им. проф.

В.Ф.Войно-Ясенецкого, ректор – д.м.н., проф. И.П. Артюхов;

НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН, директор – член-корр.

РАМН В.Т. Манчук.

***Резюме.** Целью исследования явилось изучение активности НАД- и НАДФ-зависимых дегидрогеназ тромбоцитов у больных ИБС в зависимости от функционального класса стенокардии. Доказано, что состояние метаболического статуса тромбоцитов зависит от функционального класса стенокардии. У больных стабильной стенокардией II функционального класса в тромбоцитах выявляются минимальные изменения, связанные с ингибированием пластических процессов. У больных III функционального класса ингибирование реакций липидного обмена проявляется на фоне повышения активности гликолиза. При IV функциональном классе стенокардии обнаружены наиболее выраженные нарушения метаболического статуса: на фоне инги-*

бирования реакций пластического обмена и липидного катаболизма повышается интенсивность анаэробного дыхания.

Ключевые слова: функциональный класс, тромбоциты, метаболизм, де-гидрогеназы.

Савченко Андрей Анатольевич – д.м.н., проф., зав. каф. физиологии им. проф. А.Т. Пшоники КрасГМУ, рук. лаборатории молекулярно-клеточной физиологии и патологии НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН; e-mail: aasavchenko@yandex.ru.

Савченко Елена Александровна – врач-лаборант клинико-диагностического отделения ККБ № 1; тел.: 8(391)2280789.

Гринштейн Юрий Исаевич – д.м.н., проф. зав. каф. терапии ИПО КрасГМУ; тел.: 8(391)2642718.

Смертность населения от заболеваний сердечно-сосудистой системы продолжает неуклонно возрастать. Рост смертности наблюдается, несмотря на жесткие стандарты доказательной медицины, предусматривающей назначение препаратов, снижающих риск смертности и инвалидизации не менее чем на 50% [3,5]. Ведущей причиной смертности в мире является атеротромбоз. Повреждение эндотелия над покрышкой атеромы сопровождается активацией тромбоцитов, повышением их адгезивно-агрегационных свойств, что является одним из пусковых механизмов тромбообразования, приводящего к развитию острого коронарного синдрома [2,11]. В то же время, изначально повышенная адгезивно-агрегационная функция тромбоцитов без повреждения сосудистой стенки также может служить причиной образования тромбов.

Тромбоциты называют «воспалительными» клетками, так как они активно синтезируют гуморальные факторы, способствующие как образованию сгустков, так и развитию воспалению [7,11,16]. При ишемической болезни сердца (ИБС) отмечается активация плазменного и тромбоцитарного звеньев ге-

мостаза, повышение в крови маркеров воспаления, что может индуцировать тромбогенную ситуацию [12,16]. Однако метаболические процессы в тромбоцитах до сих пор остаются практически не изученными. В то же время, именно от активности внутриклеточных процессов зависит синтез поверхностных рецепторов, биологически активных веществ, которые выделяются тромбоцитами, состояние мембран тромбоцитов, что напрямую определяет реактивность системы гемостаза в целом, в том числе, и при патофизиологических процессах [10,15].

В связи с этим, целью исследования явилось изучение активности НАД- и НАДФ-зависимых дегидрогеназ тромбоцитов у больных ИБС в зависимости от функционального класса (ФК) стенокардии.

Материалы и методы

Под нашим наблюдением находился 91 пациент мужского пола со стенокардией II-IV функционального класса, в возрасте от 45 до 72 лет, поступивший на лечение в кардиохирургическое отделение Красноярской краевой клинической больницы. Функциональный класс (ФК) стенокардии диагностировался по классификации Канадского кардиоваскулярного общества и с помощью стресс-пробы на велоэргометре (ВЭМ) по методике непрерывно-возрастающей нагрузки с использованием критериев Д.М. Аронова [1]. Контрольная группа состояла из 30 здоровых мужчин аналогичного возрастного диапазона.

Для определения активности НАД- и НАДФ-зависимых дегидрогеназ из забранного супернатанта с тромбоцитами отбирали объем, содержащий 10^7 клеток. Разрушали тромбоциты методом осмотического лизиса с доведением общего объема до 2,5 мл (конечная концентрация клеток составила 4×10^6 /мл). Активность НАД- и НАДФ-зависимых дегидрогеназ определяли с помощью биolumинесцентного анализа [4]. Биolumинесцентный анализ проводили с использованием биферментного препарата, выделенного из *Photobacterium leognathi*, (получен в Институте биофизики СО РАН, Красно-

ярск) и биохемилюминесцентного анализатора БХЛ-3606М (СКТБ «Наука», Красноярск). Данным методом определялась активность следующих ферментов: глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ), глицерол-3-фосфатдегидрогеназы (ГЗФДГ), малик-фермента (НАДФМДГ), НАД- и НАДН-зависимой реакции лактатдегидрогеназы (ЛДГ и НАДН-ЛДГ, соответственно), НАД- и НАДН-зависимой реакции малатдегидрогеназы (МДГ и НАДН-МДГ, соответственно), НАДФ- и НАДФН-зависимой глутаматдегидрогеназы (НАДФ-ГДГ и НАДФН-ГДГ, соответственно), НАД- и НАДН-зависимой глутаматдегидрогеназы (НАД-ГДГ и НАДН-ГДГ, соответственно), НАД- и НАДФ-зависимых изоцитратдегидрогеназ (НАД-ИЦДГ и НАДФ-ИЦДГ, соответственно) и глутатионредуктазы (ГР). Активность оксидоредуктаз выражали в мкЕ/мг белка (1 Е=1 мкмоль/мин [13]). Содержание белка определяли по методу Брэдфорда.

Описание выборки производили с помощью подсчета медианы (Me) и интерквартильного размаха в виде 25 и 75 перцентилей (C_{25} и C_{75}). Достоверность различий между выборками оценивали по непараметрическому критерию Манна-Уитни. Для сравнения нескольких независимых выборок применяли ранговый дисперсионный анализ Краскела-Уоллиса (Kruskal-Wallis ANOVA). Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью пакета прикладных программ Statistica 8.0 (StatSoft Inc., 2007).

Результаты и обсуждение

При исследовании уровней активности НАДФ-зависимых дегидрогеназ в тромбоцитах обнаружено, что при II и IV функциональном классе стенокардии относительно контрольного диапазона снижена активность Г6ФДГ (рис. 1, а). В то же время, только у больных III функционального класса стенокардии в тромбоцитах снижена активность НАДФМДГ (рис. 1, б). При этом, у больных IV функционального класса в тромбоцитах крови повышена активность ГР (рис. 1, в). Причем, данное повышение проявляется как относительно контрольного диапазона, так и значений, выявленных при II функциональном классе. Зависимость активности данного фермента от ФК стенокар-

дии также подтверждается с помощью теста Крускала-Уоллиса ($H=5,999$, $p=0,048$) В то же время, активность НАДФГДГ в тромбоцитах снижена у больных II и III ФК (рис. 1, г).

Значительные изменения установлены и в уровнях активности НАД-зависимых дегидрогеназ тромбоцитов у больных стабильной стенокардией. Так, независимо от ФК стенокардии, у больных снижается активность ГЗФДГ (рис. 2, а). Выявляется тенденция снижения активности ЛДГ с увеличением степени ФК стенокардии: отсутствие достоверных различий с контрольным диапазоном у больных II ФК, при III ФК – понижение на 38,8%, при IV – 43,4% (рис. 2, б). Обратная тенденция установлена при исследовании активности НАДН-ЛДГ: также отсутствие различий с контрольным диапазоном у больных II ФК стенокардии, при III ФК – повышение в 3,0 раза, при IV – в 4,5 раза (рис. 2, в). Только у больных III ФК в тромбоцитах повышается активность НАДН-МДГ (рис. 2, г).

Исследуемые оксидоредуктазы занимают ключевые позиции основных метаболических путей. Следовательно, их анализ позволяет не только оценить уровни активности отдельных ферментов, но и определить интенсивность метаболических путей или циклов, а также реактивность метаболических процессов в целом. Так, Г6ФДГ является ключевым и инициализирующим ферментом пентозофосфатного цикла, от активности которого зависит ряд пластических процессов [8,13]. Г6ФДГ является основным конкурентом гликолиза за субстрат и снижение ее активности у больных II и III ФК стенокардии может привести к повышению интенсивности анаэробного окисления глюкозы. Однако повышение активности анаэробной реакции ЛДГ, уровень которой характеризует интенсивность терминальных реакций гликолиза, обнаружено при III и IV ФК. Причем, активация фермента более выражена у больных с IV ФК стенокардии.

ГЗФДГ является ферментом, осуществляющим перенос продуктов липидного катаболизма на окислительно-восстановительные реакции гликолиза [13,14]. Активность данного фермента у больных, независимо от ФК стено-

кардии, снижена, что позволяет предположить понижение уровня интенсивности реакций липидного катаболизма в тромбоцитах. Кроме того, сниженный уровень активности малик-фермента (ключевая реакция липидного анаболизма [13]) в тромбоцитах больных III ФК стенокардии совместно с низкой активностью ГЗФДГ позволяет заключить об ингибировании реакций липидного обмена. Действительно, известно, что нарушение липидного обмена во многом определяет развитие и характер течения данного заболевания [9,17].

Особенности метаболического состояния тромбоцитов у больных IV ФК стенокардии также характеризуются повышенным уровнем ГР. Необходимо отметить, что данный фермент входит в состав глутатион-зависимой антиоксидантной системы и повышение его активности проявляется на фоне активации перекисных процессов [13].

Тромбоциты являются клетками, в которых сохранились и функционируют митохондрии [6]. В связи с этим, биоэнергетика данного типа клеток определяется не только анаэробным окислением глюкозы, но и аэробными процессами. Известно, что интенсивность аэробного дыхания во многом определяется активностью цикла трикарбоновых кислот [13]. Однако активность МДГ и НАДИЦДГ, входящих в лимонный цикл, у больных ИБС, не изменяется. Между тем, у больных III и IV ФК выявляется выраженное ингибирование аэробной реакции ЛДГ. Кроме того, у больных II и III ФК стенокардии выявляется снижение активности НАДФГДГ – фермента, осуществляющего НАДФ-зависимый перенос продуктов аминокислотного обмена на реакции цикла Кребса. Данная реакция определяется как вспомогательная (также как и НАДФИЦДГ), активируется в случае ингибирования НАД-зависимого потока субстратов по циклу трикарбоновых кислот. Подобное нарушение метаболизма митохондриального компартмента является многофакторным и зависит как от поступления субстратов на цикл Кребса, так и от регуляторных свойств метаболизма клетки в целом. Кроме того, у больных с III ФК стенокардии дополнительно выявляется увеличение активности НАДН-зависимой реакции МДГ в 1,5 раза относительного контрольного уровня. Известно, что

данная реакция является ключевой в системе малат-аспартатного водородного шунта, функция которого заключается в поддержании водородного градиента митохондрий [13].

Таким образом, у больных стабильной стенокардией II ФК в тромбоцитах при сохранении нормального уровня интенсивности анаэробного и аэробного дыхания, выявляется снижение активности ключевой и инициализирующей реакции пентозофосфатного цикла и реакции, осуществляющей перенос продуктов липидного катаболизма на гликолиз. У больных стенокардией III ФК, по мере прогрессирования коронарного атеросклероза, ингибирование реакций липидного обмена проявляется на фоне повышения активности терминальных реакций гликолиза и сохранения на нормальном уровне аэробного дыхания и ключевой реакции пентозофосфатного цикла. При IV ФК стенокардии в тромбоцитах, на фоне ингибирования реакций пластического обмена и липидного катаболизма, установлено повышение интенсивности анаэробного дыхания и сохранения на нормальном уровне аэробных процессов. Закономерно, что на фоне ухудшения коронарного кровотока и прогрессирования сердечной недостаточности, особенно при III-IV ФК стенокардии, в тромбоцитах начинают преобладать реакции ингибирования пластического обмена и липидного катаболизма вплоть до высокой интенсивности анаэробного дыхания. Данная трансформация метаболизма тромбоцитов, вероятно, обусловлена нарастающей внутриклеточной гипоксией на фоне редуцированного коронарного кровотока, приводящего к сердечной недостаточности у больных с тяжелой стенокардией. Не исключено, что установленное нарушение метаболизма тромбоцитов является одной из причин резистентности к антитромбоцитарным препаратам.

CORRELATION OF PLATELETS METABOLIC STATUS IN PATIENTS WITH ISCHEMIC HEART DISEASE WITH THE FUNCTIONAL CLASS OF STENOCARDIA

A.A. Savchenko, E.A. Savchenko, I.Yu. Grinstein, Yu.I. Grinstein

Abstract. The aim of the study was to investigate activity of NAD and NADP dependent dehydrogenises of platelets in relation with stenocardia functional class in patients with IHD. We revealed that platelets metabolic status depends on the stenocardia functional class. Minimal inhibition of plasticity processes in platelets was found out in the patients with stable stenocardia class II. In the patients of functional class III the lipid metabolism reactions were inhibited and glycolysis was activated. The most expressed disturbances of lipid metabolism were detected in stenocardia functional class IV where the reaction of plasticity processes and lipid catabolism were inhibited and the anaerobic respiration was enhanced.

Key words: functional class, platelets, metabolism, dehydrogenises.

Литература

1. Аронов Д.М. Лечение и практика атеросклероза.- М.: Триада-Х, 2000. – 441 с.
2. Баркаган З.С., Костюченко Г.И., Котовщикова Е.Ф. Эндотелиоз и воспалительная концепция атеротромбоза – критерии диагностики и проблемы терапии // Тромбоз, гемостаз, реология. – 2004. – № 4. – С.3-11.
3. Оганов Р.Г., Масленникова Г.Я. Демографическая ситуация и сердечно-сосудистые заболевания в России: пути решения проблем // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2007. – № 8. – С. 7-14.
4. Савченко А.А., Сунцова Л.И. Высококчувствительное определение активности дегидрогеназ в лимфоцитах периферической крови биолюминесцентным методом // Лабораторное дело. – 1989. – № 11. – С. 23-25.
5. Чазов Е.И. Перспективы кардиологии в свете прогресса фундаментальной науки // Терапевт. архив. – 2009. – № 9. – С. 5-8.
6. Шитикова А.С. Тромбоцитарный гемостаз. – СПб.: Изд-во СПб ГМУ, 2000. – 227 с.
7. Blann A.D. Minireview: Platelets: The universal killer? // Biochimica et Biophysica Acta. – 2007. – Vol. 1772. – P. 715-717.
8. Bolaños J.P., Delgado-Esteban M., Herrero-Mendez A. et al. Regulation of glycolysis and pentose-phosphate pathway by nitric oxide: impact on neuronal survival // Biochim. Biophys. Acta. – 2008. – Vol. 1777, № 7-8. – P. 789-793.
9. Canouï-Poittrine F., Luc G., Bard J.M. et al. Relative contribution of lipids and apolipoproteins to incident coronary heart disease and ischemic stroke: the PRIME Study // Cerebrovasc. Dis. – 2010. – Vol. 30, № 3. – P. 252-259.
10. Cattaneo M. Resistance to antiplatelet drugs: molecular mechanisms and laboratory detection // J. Thromb. Haemost. – 2007. – Vol. 5, № 1. – P. 230-237.

11. Cawaz M., Langer H., May A.E. Platelet inflammation and atherosclerosis // J. Clin. Invest. – 2005. – Vol. 115. – P. 3378-3384.
12. Chong A-Y., Lip G.Y.H. Viewpoint: The protrombotic state in heart failure: A maladaptive inflammatory response? // Eur. J. Heart Failure. – 2007. – Vol. 9. – P. 124-128.
13. Elliott W. Biochemistry and Molecular Biology. Second edition. – Oxford: University Press, 2001. – 586 p.
14. Jeong D.W., Cho I.T., Kim T.S. Effects of lactate dehydrogenase suppression and glycerol-3-phosphate dehydrogenase overexpression on cellular metabolism // Mol. Cell. Biochem. – 2006. – Vol. 284, № 1-2. – P. 1-8.
15. Payne C.D., Li Y.G., Small D.S. Increased active metabolite formation explains the greater platelet inhibition with prasugrel compared to high-dose clopidogrel // J. Cardiovasc. Pharmacol. – 2007. – Vol. 50, № 5. – P. 555-562.
16. Wanger D.D., Burger P.C. Platelets in inflammation and thrombosis // Arterioscler Thromb Vasc Biol. – 2006. – Vol. 23. – P. 2131-2140.
17. Yeh P.S., Lin H.J., Bai C.H. et al. Effect of in-hospital initiation of lipid-lowering therapy on six-month outcomes in patients with acute ischemic stroke or transient ischemic attack // Am. J. Cardiol. – 2010. – Vol. 105, № 10. – P. 1490-1494.

Рис. 1. Активность НАДФ-зависимых дегидрогеназ в тромбоцитах у больных в зависимости от ФК стенокардии.

Примечание: 1 – контроль, 2 – больные II ФК стенокардии, 3 – больные III ФК стенокардии, 4 – больные IV ФК стенокардии.

Рис. 2. Активность НАД-зависимых дегидрогеназ в тромбоцитах у больных в зависимости от ФК стенокардии.

Примечание: то же, что и для рис. 1.