

МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ СТАТУС ТРОМБОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ СТАБИЛЬНОЙ СТЕНОКАРДИЕЙ

Гринштейн И. Ю.¹, Савченко А. А.^{1,2}, Савченко Е. А.¹, Косинова А. А.¹, Гринштейн Ю. И.¹

Цель. Изучить активность НАД- и НАДФ-зависимых дегидрогеназ тромбоцитов у больных ИБС в зависимости от функционального класса стенокардии.

Материал и методы. В исследование были включены 91 пациент мужского пола со стенокардией II–IV функционального класса в возрасте от 45 до 72 лет. У всех больных биолюминесцентным 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).

Результаты. Показано, 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 ингибирования реакций пластического обмена и липидного катаболизма повышается интенсивность анаэробного дыхания.

Заключение. При стабильной ИБС отмечаются изменения внутриклеточной метаболической активности тромбоцитов, нарастающие по мере увеличения функционального класса стенокардии. Влияние на метаболизм тромбоцитов, вероятно, может быть одним из путей понижения рецепторной, а, значит, агрегационной активности клеток.

Российский кардиологический журнал 2013, 6 (104): 23-27

Ключевые слова: стенокардия, тромбоциты, НАД- и НАДФ-зависимые дегидрогеназы, внутриклеточный метаболизм.

¹БООУ ВПО — КрасГМУ им. проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России; ²ФГБУ — НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН, Красноярск, Россия.

Гринштейн И. Ю.* — к.м.н., докторант кафедры поликлинической терапии, семейной медицины и ЗОЖ, Савченко А. А. — д.м.н., профессор, ¹зав. кафедрой физиологии им. проф. А. Т. Пшеника, ²руководитель лаборатории молекулярно-клеточной физиологии и патологии, Савченко Е. А. — к.м.н., ассистент кафедры клинической лабораторной диагностики, Косинова А. А. — аспирант кафедры терапии института последипломного образования, Гринштейн Ю. И. — д.м.н., профессор, зав. кафедрой терапии института последипломного образования.

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author): grinst@rambler.ru, grinstein.yi@mail.ru

CD — Cluster of Differentiation (Кластер дифференцировки — номенклатура дифференцировочных антигенов лейкоцитов человека), LOX-1 — Oxidized low-density lipoprotein receptor 1 (рецептор окисленных липопротеидов низкой плотности 1), SR-B1 — scavenger receptor class B1 (рецептор липопротеидов высокой плотности 1), ВЭМ — велоэргометрия, ГЗФДГ — глицерол-3-фосфатдегидрогеназа, Г6ФДГ — глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, ГДГ — глутаматдегидрогеназа, ГР — глутатионредуктаза, ИБС — ишемическая болезнь сердца, ИЦДГ — изоцитратдегидрогеназа, ЛДГ — лактатдегидрогеназа, МДГ — малатдегидрогеназа, Ме — медиана, НАД — Никотинамидадениндинуклеотид, НАДФ — Никотинамидадениндинуклеотидфосфат, ОКС — острый коронарный синдром, СКТБ — специальное конструкторско-технологическое бюро, СО РАН — Сибирское Отделение Российской Академии Наук, ФК — функциональный класс.

Рукопись получена 02.02.2013

Принята к публикации 11.11.2013

METABOLIC PLATELET STATUS IN PATIENTS WITH STABLE ANGINA

Grinstein I. Yu.¹, Savchenko A. A.^{1,2}, Savchenko E. A., Kosinova A. A.¹, Grinstein Yu. I.¹

Aim. To study the activity of NAD- and NADP-dependent platelet dehydrogenases in patients with various functional classes of angina.

Material and methods. The study included 91 men with Functional Class II–IV angina, aged 45–72 years. In all participants, the bioluminescent method was used to measure the activity of the following enzymes: glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD), glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH), NADP-malate dehydrogenase (NADP-MDH), NAD- and NADH-dependent lactate dehydrogenase reaction (LDH and NADH-LDH, respectively), NAD- and NADH-dependent malate dehydrogenase reaction (MDH and NADH-MDH, respectively), NADP- and NADPH-dependent glutamate dehydrogenase (NADP-GDH and NADPH-GDH, respectively), NAD- and NADH-dependent glutamate dehydrogenase (NAD-GDH and NADH-GDH, respectively), NAD- and NADP-dependent isocitrate dehydrogenase (NAD-IDH and NADP-IDH, respectively), and glutathione reductase (GR).

Results. The metabolic platelet status was associated with the functional class of angina. In patients with Functional Class II angina, minimal platelet changes, linked to the inhibition of plastic processes, were observed. Patients with Functional

Class III angina demonstrated an inhibition of lipid metabolism and an increase in glycolytic activity. In Functional Class IV angina, the metabolic disturbances were most pronounced and manifested in inhibited plastic processes and lipid catabolism, together with activated anaerobic reactions.

Conclusion. In stable angina patients, the changes in intracellular metabolic activity of platelets mirror the increase in the functional class of angina. Modification of platelet metabolism could be one of the methods of decreasing the receptor and, therefore, aggregation platelet activity.

Russ J Cardiol 2013, 6 (104): 23-27

Key words: angina, platelets, NAD- and NADP-dependent dehydrogenases, intracellular metabolism.

¹Professor V.F. Voino-Yasenetskyi Krasnoyarsk State Medical University; ²Research Institute of Far North Medical Problems, Siberian Branch, Russian Academy of Medical Sciences, Krasnoyarsk, Russia.

Сердечно-сосудистые заболевания по праву называют эпидемией XXI века. Распространенность сердечно-сосудистых заболеваний, тяжесть их последствий с серьезной утратой трудоспособности и преждевременной смертностью остается большой

проблемой здравоохранения во всем мире [1]. До настоящего времени ишемическая болезнь сердца среди всех заболеваний является основной причиной ухода из жизни и, в то же время, составляет 50% случаев смертности при сердечно-сосудистой патологии [2].

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 (ОКС) [3].

Тромбоциты называют “воспалительными” клетками, так как они активно синтезируют гуморальные факторы, способствующие как образованию сгустков, так и развитию воспаления [4, 5]. При ишемической болезни сердца (ИБС) отмечается активация плазменного и тромбоцитарного звеньев гемостаза, повышение в крови маркеров воспаления, что может индуцировать тромбогенную ситуацию [5, 6]. 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 [6].

В связи с этим, целью исследования явилось изучение метаболического профиля тромбоцитов, именно активности НАД- и НАДФ-зависимых дегидрогеназ тромбоцитов у больных с разными функциональными классами (ФК) стабильной стенокардии.

Материал и методы

Исследование было выполнено в соответствии со стандартами надлежащей клинической практики (Good Clinical Practice) и принципами Хельсинской Декларации. Протокол исследования был одобрен этическими комитетами участвующих клинических центров. До включения в исследование у всех участников было получено письменное информированное согласие.

Под нашим наблюдением был 91 пациент мужского пола со стенокардией II–IV функционального класса в возрасте от 45 до 72 лет. ФК стенокардии диагностировался по классификации Канадского кардиоваскулярного общества и с помощью стресс-пробы на велоэргометре (ВЭМ) по методике непрерывно-возрастающей нагрузки. Контрольная группа состояла из 30 здоровых мужчин аналогичного возрастного диапазона.

Для определения активности НАД- и НАДФ-зависимых дегидрогеназ в тромбоцитах из забранного супернатанта отбирали объем, содержащий 107 клеток. Разрушали тромбоциты методом осмотического лизиса с доведением общего объема до 2,5 мл (конечная концентрация клеток составила $4 \cdot 10^6$ /мл). Активность НАД- и НАДФ-зависимых дегидрогеназ определяли с помощью биoluminesцентного ана-

лиза [7]. Биoluminesцентный анализ проводили с использованием биферментного препарата, выделенного из *Photobacterium leognathi*, (получен в Институте биофизики СО РАН, Красноярск) и биохемилюминесцентного анализатора БХЛ-3606М (СКТБ “Наука”, Красноярск). Данным методом определялась активность следующих ферментов: глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ), глицерол-3-фосфатдегидрогеназы (Г3ФДГ), 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 глутатион-редуктазы (ГР). Активность оксидоредуктаз выражали в мкЕ/мг белка (1 Е = 1 мкмоль/мин [8]). 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 Крускала-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 напряжения относительно контрольного диапазона снижена активность Г6ФДГ (рис. 1, а). Только у больных III функционального класса стенокардии в тромбоцитах снижена активность НАДФМДГ (рис. 1, б) и только у больных IV функционального класса в тромбоцитах крови повышена активность ГР (рис. 1, в). Причем, данное повышение активности ГР проявляется как относительно контрольного диапазона, так и значений, выявленных при II функциональном классе стенокардии. Зависимость активности данного фермента от ФК стенокардии 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 стенокардии (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

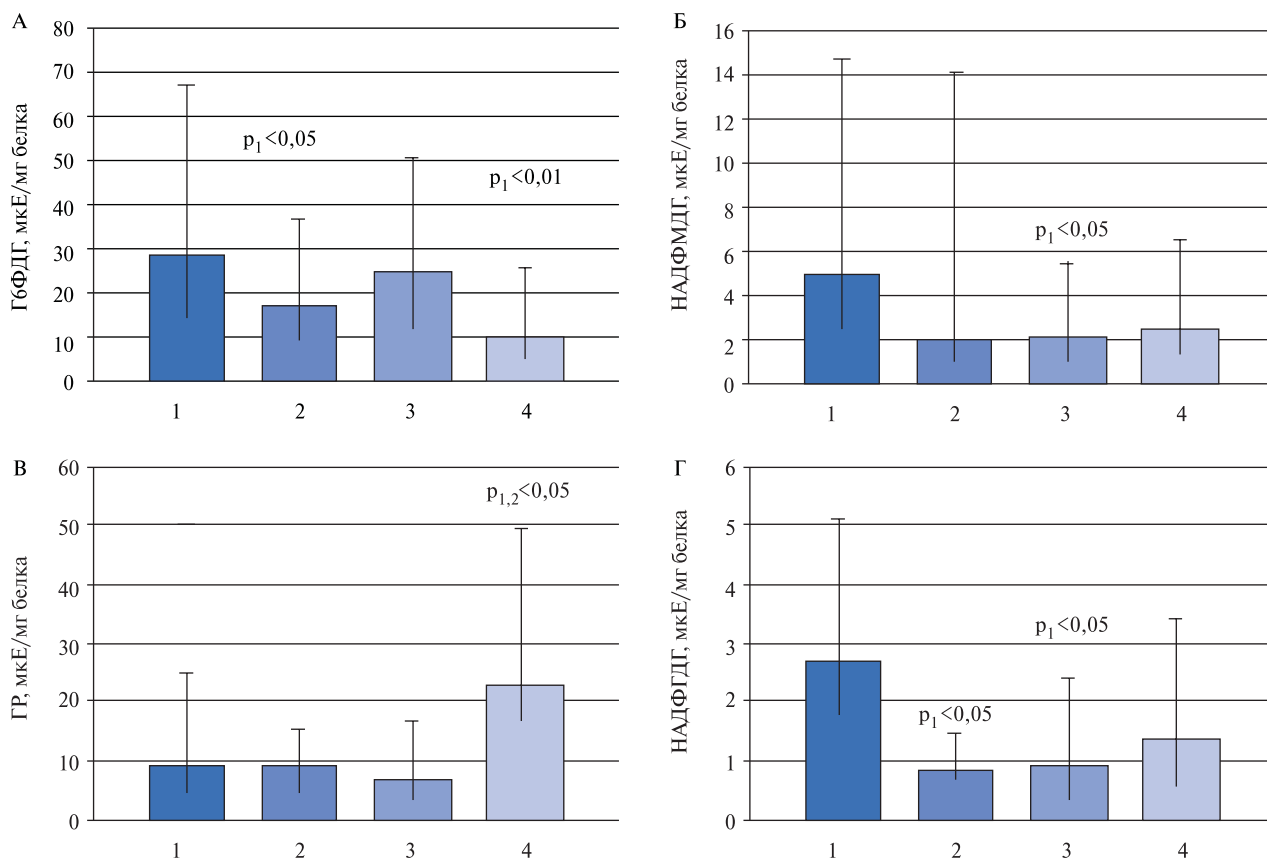


Рис. 1. Активность НАДФ-зависимых дегидрогеназ в тромбоцитах у больных в зависимости от ФК стенокардии.

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

активность ГЗФДГ (рис. 2, а). Выявляется тенденция снижения активности ЛДГ с увеличением ФК стенокардии: отсутствие достоверных различий с контрольным диапазоном у больных II ФК, при III ФК — понижение на 38,8%, а при IV ФК стенокардии — понижение на 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). Активность НАДН-МДГ повышается только у больных III ФК в тромбоцитах (рис. 2, г).

Известно, что 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 клеточных метаболических процессов в целом. Так, Г6ФДГ ключевой и инициализирующий фермент пентозофосфатного цикла, от активности которого зависит ряд пластических процессов [8, 9]. Г6ФДГ является основным конкурентом гликолиза за субстрат и снижение ее активности у больных II и III ФК стенокардии может привести к повышению интен-

сивности анаэробного окисления глюкозы. Однако повышение активности анаэробной реакции ЛДГ, уровень которой характеризует интенсивность терминальных реакций гликолиза, обнаружено при III и IV ФК стенокардии. Причем, активация фермента более выражена у больных с IV ФК стенокардии.

ГЗФДГ является ферментом, осуществляющим перенос продуктов липидного катаболизма на окислительно-восстановительные реакции гликолиза [8]. Активность данного фермента у больных, независимо от ФК стенокардии, снижена, что позволяет предположить понижение уровня интенсивности реакций липидного катаболизма в тромбоцитах. Кроме того, сниженный уровень активности малик-фермента (ключевая реакция липидного анаболизма) в тромбоцитах больных III ФК стенокардии совместно с низкой активностью ГЗФДГ позволяет сделать вывод об ингибировании реакций липидного обмена. Действительно, известно, что нарушение липидного обмена во многом определяет развитие и характер течения данного заболевания [10]. Изменения в составе и функции тромбоцитов у больных с гиперхолестеринемией указывают на влияние липопротеидов на тромбоцитарный фенотип [11]. Липопротеиды оказывают влияние на функцию тромбоцитов посред-

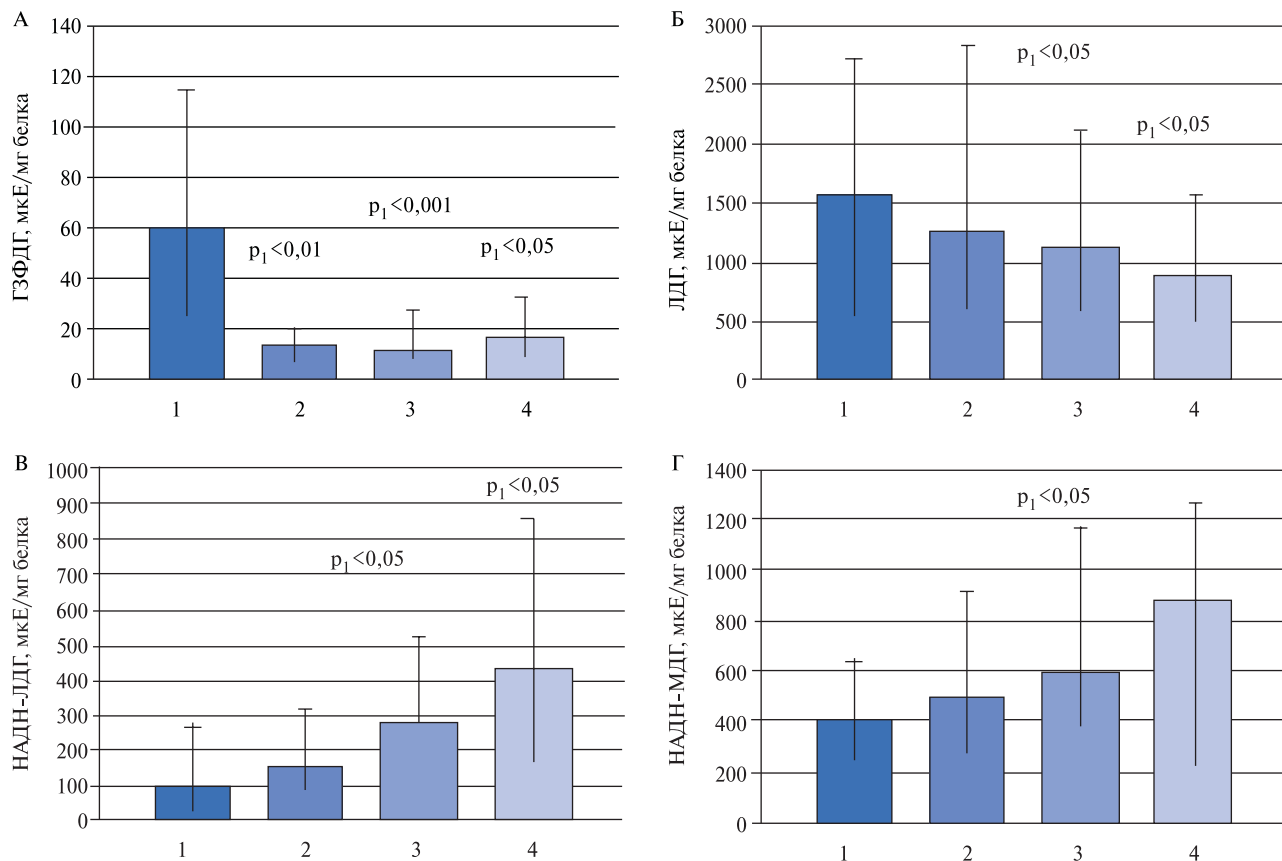


Рис. 2. Активность НАД-зависимых дегидрогеназ в тромбоцитах у больных в зависимости от ФК стенокардии.

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

ством связывания со специфическими рецепторами — такими как CD36, SR-B1 и LOX-1) [12]. До настоящего времени неизвестно, связываются ли липопротеиды с поверхностью мембраны либо проникают во внутриклеточные везикулы в процессе эндоцитоза. Полагают, что частицы липопротеидов оказывают влияние на функцию тромбоцитов через активацию трансдукционных сигналов или липидного обмена. Таким образом, частицы липопротеидов могут индуцировать синтез или транслокацию фосфолипидов мембраны тромбоцитов, встраивание фосфолипидов из кровотока и изменение фосфолипидного состава мембраны тромбоцитов [13]. С другой стороны, связанные с поверхностью тромбоцитов окисленные липопротеиды низкой плотности вызывают активацию, морфологические изменения и агрегацию тромбоцитов, способствуя тромбообразованию, особенно на поврежденной атеросклеротической бляшке [14].

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 повы-

шение его активности проявляется на фоне активации перекисных процессов [8].

Тромбоциты являются клетками, в которых сохранились и функционируют митохондрии [15]. 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 [8]. Однако, активность МДГ и НАД-ИЦДГ, входящих в лимонный цикл, у больных ИБС не изменяется. Между тем, у больных III и IV ФК стенокардии выявляется выраженное ингибирование аэробной реакции ЛДГ. Кроме того, у больных II и III ФК стенокардии выявляется снижение активности НАДФ-ГДГ — фермента, осуществляющего НАДФ-зависимый перенос продуктов аминокислотного обмена на реакции цикла Кребса. Данная реакция определяется как вспомогательная (так же, как и НАДФ-ИЦДГ), 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 относительно контрольного уровня. Известно, что данная реакция является ключевой в системе малат-аспаратного водородного шунта, функция которого заключается в поддержании водородного градиента митохондрий [8].

Заключение

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 III ФК стенокардии 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.

Вероятно, метаболические изменения, происходящие в тромбоцитах пациентов со стабильной стенокардией, обусловлены целым рядом факторов, ведущим из которых является гипоксия, нарастающая по мере увеличения ФК стенокардии и сердечной недостаточности. Именно на фоне гипоксии возникают метаболические изменения в тромбоцитах, влияющие на клеточную энергетику и синтетические процессы в клетке. Поэтому вполне логичной представляется взаимосвязь между метаболическим дисбалансом в тромбоцитах и рецепторной активностью клеток, определяющей активность адгезии и агрегации тромбоцитов. Влияние на метаболизм тромбоцитов может быть одним из путей понижения рецепторной, а, значит, агрегационной активности клеток с последующей эффективной профилактикой тромбообразования. Метаболический дисбаланс в тромбоцитах у больных с разными функциональными классами стенокардии, вероятно, объясняет индивидуальную чувствительность тромбоцитарных рецепторов к антитромбоцитарным препаратам. Метаболические нарушения в тромбоцитах в определенной степени могут снижать эффективность антитромбоцитарной терапии. Резистентность тромбоцитарных рецепторов к антитромбоцитарным препаратам способствует развитию атеротромбоза, тромбозов стентов и других неблагоприятных сердечно-сосудистых событий.

Литература

1. Turpie AG. Burden of disease: medical and economic impact of acute coronary syndromes. *Am J Manag Care* 2006; 12: Suppl.160: S430–4.
2. Tardif JC. Coronary artery disease in 2010. *Eur Heart J* 2010; 12: Suppl.: C2–10.
3. Cawaz M, Langer H, May AE. Platelet inflammation and atherosclerosis. *J Clin Invest* 2005; 115:3378–84.
4. Blann AD. Minireview: Platelets: The universal killer? *Biochimica et Biophysica Acta* 2007; 1772:715–7.
5. Chong AY, Lip GYH. Viewpoint: The protrombotic state in heart failure: A maladaptive inflammatory response? *Eur J Heart Failure* 2007; 9:124–8.
6. Payne CD, Li YG, Small DS. Increased active metabolite formation explains the greater platelet inhibition with prasugrel compared to high-dose clopidogrel. *J Cardiovasc Pharmacol* 2007; 50 (5):555–62.
7. Savchenko AA, Suncova LI. Highly sensitive determination of dehydrogenase activity in peripheral blood lymphocytes by bioluminescent. *Laboratory work* 1989; 11:23–5 (Савченко А. А., Сунцова Л. И. Высокочувствительное определение активности дегидрогеназ в лимфоцитах периферической крови биOLUMИНЕСЦЕНТНЫМ методом. *Лаб. дело* 1989, 11:23–5).
8. Elliott W. *Biochemistry and Molecular Biology*. Second edition. Oxford University Press; 2001. Great Britain.
9. Bolaños JP, 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; 1777 (7–8):789–93.
10. Canouï-Poitine F, Luc G, Bard JM et al. Relative contribution of lipids and apolipoproteins to incident coronary heart disease and ischemic stroke: the PRIME Study. *Cerebrovasc Dis* 2010; 30 (3):252–9.
11. Yeh PS, Lin HJ, Bai CH 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; 105 (10):1490–4.
12. Tandon NN, Kralisz U, Jamieson GA. Identification of glycoprotein IV (CD36) as a primary receptor for platelet-collagen adhesion. *J Biol Chem* 1989; 264:7576–83.
13. Engelman B, Kogl C, Kulschar R, et al. Transfer of phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine and sphingomyelin from low- and high-density lipoprotein to human platelets. *Biochem J* 1996; 315:781–9.
14. Maschberger P, Bauer M, Baumann-Siemons J, et al. Mildly oxidized low density lipoprotein rapidly stimulates via activation of the lysophosphatidic acid receptor src family and syk tyrosine kinases and Ca²⁺ influx in human platelets. *J Biol Chem* 2000; 275:19159–66.
15. Shitikova AS. *Platelet hemostasis*. SPb.: Izdatel'stvo SPb GMU; 2000. Russian (Шитикова А. С. Тромбоцитарный гемостаз. — СПб.: Издательство СПб ГМУ, 2000).