



УДК 615.015.23:546.41:546.172.6-31:612.111.7:616.131-008.331.1

© 2007

К. М. Амосова, А. В. Коцюруба, Є. М. Задорін, Ю. І. Губський,
Л. Ф. Конопльова

**Стан NO-системи в тромбоцитах крові хворих
на ідіопатичну легеневу гіпертензію та його зміни
в умовах лікування блокатором кальцієвих каналів
дилтіаземом**

(Представлено академіком НАН України О. О. Мойбенком)

A considerable decrease of constitutive NO-synthase activity (cNOS) in blood thrombocytes of patients with idiopathic pulmonary hypertension (IPH) is shown. This is the evidence of a decrease of NO synthesis with vaso-dilating properties and an increase of inducible NO-synthase activity (iNOS), that is accompanied by increase of the pool of nitrate-anions (NO_3^-) and promotes the activation of lipids peroxidation. Activity of Ca^{2+} – dependent cNOS in blood thrombocytes of patients with IPH increases, and the part of NO_2^- of the stable metabolites pool increases under treatment with diltiazem. This is the evidence of the activation of NO pool production with vaso-dilating properties. Treatment with diltiazem doesn't influence the activity Ca^{2+} – independent iNOS and the NO_3^- pool.

Ідіопатична легенева гіпертензія (ІЛГ) є рідкісним захворюванням, що уражає переважно осіб молодого віку і швидко прогресує, призводячи до інвалідності та смерті хворих через декілька років після появи перших симптомів [1]. Причину ІЛГ ще досі не встановлено. Деякі вчені вважають, що важливим фактором патогенезу ІЛГ є дисфункція ендотелію судин легень. Як фактори, що ушкоджують ендотелій, обговорюються вірусні аутоантитіла, хімічні речовини, лікарські засоби тощо [1, 2]. Багато прихильників має вазоконстрикторна теорія, згідно з якою початок ІЛГ дає спазм легневих артерій м'язового типу.

Ендотелій судин відіграє провідну роль у регуляції кровообігу шляхом секреції низки фізіологічно активних речовин, найважливішим з яких є ендотеліальний фактор розслаблення, ідентифікований як оксид азоту (NO) [2]. Порушення функції ендотелію, що виявляється у погіршенні ендотелійзалежного розслаблення, в основному внаслідок зменшення синтезу NO, при збереженні або збільшенні продукції ендотелійзалежних вазоконстрикторів, передусім ендотеліну, доведено при ішемічній хворобі серця і атеросклерозі [3]. Як

надмір, так і нестача NO можуть відігравати значну роль у патогенезі багатьох захворювань і патологічних станів. Нами виявлено зниження базального рівня NO в плазмі крові при гіпертонічній хворобі та цукровому діабеті, і навпаки, його збільшення при гіпоксії та ішемічній хворобі серця.

Існують поодинокі вказівки на збільшення у частини хворих з васкулярною легеневою гіпертензією сироваткового вмісту ендотеліну-1 [4], однак стан NO-системи при цьому захворюванні раніше не вивчався.

У зв'язку з популярністю вазоконстрикторної теорії в терапії хворих на ІЛГ широко використовуються периферійні вазодилататори, у першу чергу блокатори кальцієвих каналів (БКК), які здатні знижувати тиск у легеневій артерії, стабілізувати та певною мірою покращувати стан хворих. У той же час вплив БКК на метаболізм NO та активність різних ізоформ NOS в тромбоцитах крові у хворих на ІЛГ практично не вивчені.

Зважаючи на вищесказане, метою нашого дослідження була оцінка стану NO-системи в тромбоцитах крові хворих на ІЛГ та його зміни в умовах тривалого лікування БКК дилтіаземом.

Матеріалом для досліджень були тромбоцити 10 хворих на ІЛГ з серцевою недостатністю III–IV класу за класифікацією Нью-Йоркської асоціації кардіологів (NYHA). Хворі знаходилися на лікуванні в кардіологічному центрі центральної міської клінічної лікарні м. Києва. Більшість хворих (8 осіб) були жіночої статі. Вік хворих коливався від 16 до 26 років і становив у середньому ($21,4 \pm 4,8$) роки. Діагноз ІЛГ ставили на основі клінічних та інструментальних (ЕКГ у 12 відведеннях, рентгенографія органів грудної порожнини, доплер-ехокардіографія) даних після виключення відомих причин легеневої гіпертензії. Систолічний тиск у легеневій артерії за даними доплерівського дослідження транстрикуспідального кровотоку [5] коливався від 89 до 107 мм рт. ст. і становив у середньому (98 ± 9) мм рт. ст. Хворі отримували загальноприйняте лікування аспірином (100 мг на добу) або непрямими антикоагулянтами, кисневу терапію, при ознаках затримки рідини — діуретики, до якого після первинного обстеження та стабілізації стану додавали дилтіазем (“Діакордин”, Lesciva, Чехія). Його прийом починали з 90 мг 1 раз на добу з поступовим підвищенням дози протягом 7 днів до максимально переносимої під ретельним контролем з урахуванням артеріального тиску та частоти серцевих скорочень — 180–360 мг, у середньому (270 ± 90) мг на добу. Істотних побічних ефектів (запаморочень, артеріальної гіпотензії, брадикардії та ін.) не виявлено. У перші два тижні лікування відмічали зменшення системного систолічного артеріального тиску на (10 ± 2) мм рт. ст. та частоти серцевих скорочень на (11 ± 3) ударів/хв, що не вимагало відміни препарату.

Забір крові проводили в клініці з дотриманням відповідних правил. Виділяли тромбоцити крові в градієнті щільності альбуміну в модифікації [6]. Альбумін зводить до мінімуму механічну травму тромбоцитів, запобігає тісному контакту їх один з одним та з поверхнею центрифугальної пробірки в процесі центрифугування. Для стабілізації крові як антикоагулянт використовували не цитрат натрію, а трилон В та аскорбінову кислоту, кров поміщали в пластмасові пробірки, щоб не ушкодити клітини. З метою вивчення стану NO-системи в тромбоцитах крові визначали вміст його стабільних метаболітів: нітрит-аніона (NO_2^-) — за допомогою реактиву Гріса в колориметричній реакції [7], нітрат-аніона (NO_3^-) — спектрофотометричним методом [7] у модифікації, де замість стрихніну використовували його гідроксильоване похідне — бруцин. Активність NO-синтаз (Ca^{2+} -залежної — cNOS та Ca^{2+} -незалежної — iNOS) визначали спектрофотометричним методом [8]. Паралельно в тромбоцитах крові визначали вміст пероксиду водню методом [9], активність аргінази оцінювали

за утворенням сечовини [10]. Кількість білка розраховували за Бредфордом. Лабораторні обстеження хворих проводили двічі: на час включення в обстеження та після 6 міс. лікування з використанням дилтіазему. Нормативні величини показників, що вивчались, отримані при дослідженні тромбоцитів крові 10 практично здорових осіб, які відповідали за статтю (10 осіб жіночої статі) та віком (від 18 до 23 років, у середньому $(20,5 \pm 2,5)$ роки) обстежуваним хворим на ІЛГ.

Дані обробляли за допомогою непараметричної статистики з використанням критеріїв Вілкоксона.

На кінець спостереження у 9 із 10 хворих, що отримували дилтіазем, відзначено певне поліпшення самопочуття (зменшення задишки, слабкості), стан одного хворого залишився без змін. Зменшення класу NYHA на один відмічено у одного хворого. У 9 хворих динаміка класу NYHA була відсутня.

Згідно з результатами дослідження (табл. 1), у тромбоцитах крові хворих на ІЛГ відбувалось зниження активності cNOS у 2,5 раза порівняно з контрольною групою ($p < 0,05$). Це свідчить про зниження синтезу ендogenous NO, який є сильним вазодилатором і інгібітором агрегації тромбоцитів завдяки прямій стимуляції розчинної гуанілатциклази за гемзалежним механізмом і накопиченню цГМФ, який спричиняє також розслаблення гладких м'язів судин [2]. Нами також виявлено підвищення агрегації тромбоцитів у хворих на ІЛГ. В ендотелії судин синтез NO здійснюється в основному ендотеліальною ізоформою eNOS (eNOS). Тромбоцити в процесі агрегації, яка регулюється АДФ, тромбоксаном A_2 та серотоніном, звільняють NO. Продукти, які виділяються тромбоцитами — серотонін і АДФ, зменшують виділення NO ендотеліоцитами [2]. Вченими показано, що NO, синтезований eNOS, інгібує агрегацію тромбоцитів, адгезію моноцитів до ендотелію та проліферацію гладеньком'язових клітин при атеросклерозі. Загальновідомо, що активність cNOS, у тому числі eNOS, залежить від концентрації іонів кальцію в клітині. Підвищення вмісту цитозольного Ca^{2+} спричиняє пригнічення синтезу NO із L-аргініну за дії eNOS. Існує припущення [6], що підвищений рівень ендотеліну в ендотеліоцитах також може обумовлювати підвищення рівня іонів кальцію в клітинах, прямо діючи на L-типи кальцієвих каналів. За допомогою флуоресцентного барвника *grip 2* показано [11], що збільшення концентрації іонів кальцію в цитоплазмі тромбоцитів при дії тромбіну, фактора активації тромбоцитів та АДФ відбувається за рахунок відкриття рецепторзалежних Ca^{2+} каналів. БКК верапаміл у концентрації 10^{-4} М повністю блокував дію фактора агрегації тромбоцитів на вміст іонів кальцію [11].

Спочатку збільшення концентрації іонів кальцію в клітині спричиняє активацію cNOS, але при високих концентраціях іонів кальцію в клітинах активність cNOS знижується, що ми і спостерігали в тромбоцитах крові хворих на ІЛГ, і це приводить до зменшення рівня “корисного” NO.

Активність Ca^{2+} -незалежного ізоферменту iNOS в тромбоцитах крові хворих на ІЛГ була збільшена в 3,6 раза порівняно з нормою (див. табл. 1, $p < 0,05$). Активація iNOS може виникати внаслідок активації цитокінів, вільнорадикальних процесів і пригнічення активності антиоксидантних ферментів супероксиддисмутази і глутатіонпероксидази. Так, нами відмічено значне підвищення вмісту в крові хворих на синдром Ейзенменгера протизапальних цитокінів ІЛ-1 β та ІЛ-6 [12]. iNOS спричинює надлишкову продукцію вільних радикалів, зокрема “шкідливого” NO, який бере участь в активації процесів пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ), призводить до ушкодження клітин, а також до накопичення супероксидного аніон-радикала (O_2^-). Супероксидний аніон-ра-

Таблиця 1. Показники NO-системи в тромбоцитах крові хворих на ідіопатичну легеневу гіпертензію та їх зміни в умовах лікування дилтіаземом ($M \pm m$)

Група обстежуваних	iNOS, пмоль/ (хв · мг білка)	cNOS, пмоль/ (хв · мг білка)	NO ₂ ⁻ , пмоль/ мг білка	NO ₃ ⁻ , нмоль/ мг білка	iNOS/ cNOS, ум. од.	$\frac{NO_2^-}{NO_2^- + NO_3^-}$, %
Здорові особи	1,68 ± 0,31	1,49 ± 0,26	176,1 ± 89,2	6,9 ± 0,8	1,13 ± 0,06	2,49 ± 0,08
Хворі на ІЛГ						
до лікування	6,11 ± 0,52*	0,59 ± 0,08*	438,2 ± 139,1	45,5 ± 9,8*	10,36 ± 0,51*	0,95 ± 0,10*
на фоні лікування	6,06 ± 1,43*	5,36 ± 1,71***	731,8 ± 156,3*	45,5 ± 10,8*	1,13 ± 0,23**	1,58 ± 0,07***

*Різниця достовірна порівняно з даними у здорових осіб, $p < 0,05$.

** Різниця достовірна порівняно з даними у хворих на ІЛГ до лікування, $p < 0,05$.

дикал взаємодіє з NO з подальшим утворенням пероксинітриту (ONOO^-) — радикала, що виявляє деструктивний ефект відносно тромбоцитів [2]. Активація ПОЛ в еритроцитах та плазмі крові хворих на ІЛГ вперше показана нами в роботі [13]. Виявлене нами зменшення активності cNOS в тромбоцитах крові хворих на ІЛГ може відбуватися не тільки за рахунок зростання концентрації іонів кальцію, але і внаслідок високого рівня “шкідливого” NO, що продукуються iNOS. Відношення iNOS до cNOS в тромбоцитах крові в умовах ІЛГ значно зросло (в 9,2 раза, $p < 0,05$), що зумовлено зменшенням активності cNOS, яка продукує “корисний” NO, що бере участь у регуляції судинного тонуусу, і збільшенням активності iNOS, яка бере участь у синтезі “шкідливого” NO.

У хворих на ІЛГ в тромбоцитах крові вміст кінцевих продуктів метаболізму NO — нітрит-аніона (NO_2^-) та нітрат-аніона (NO_3^-) зростав порівняно з таким у контрольній групі відповідно в 2,5 і в 6,6 раза ($p < 0,05$, див. табл. 1), що свідчить про збільшене утворення тромбоцитарного та ендотеліального NO, в основному за рахунок дії iNOS. При цьому частка NO_2^- в загальному пулі ($\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$) стабільних метаболітів NO в тромбоцитах хворих на ІЛГ зменшувалась у 2,5 раза порівняно з контролем ($p < 0,05$, див. табл. 1).

Як показали отримані нами результати (табл. 2), у тромбоцитах крові хворих на ІЛГ зростала активність неокисного аргіназного шляху обміну L-аргініну (L-аргінін \rightarrow L-орнітин + карбамід), на що вказувала активація аргінази (у 6,3 раза порівняно з контрольною групою, $p < 0,05$). Рівень карбаміду значно збільшувався (у 3,2 раза порівняно з контролем, $p < 0,05$) як за рахунок збільшення активності аргінази, так і, можливо, за рахунок порушення його виведення в умовах серцевої недостатності. Активація неокисного аргіназного шляху обміну аргініну, вірогідно, має компенсаторне значення, яке полягає в обмеженні доступності аргініну як субстрату для синтезу “шкідливого” NO за умов патології. Тромбоцити крові хворих на ІЛГ знаходилися в стані оксидативного стресу, на що вказувало значне зростання (у 8,3 раза порівняно з контрольною групою, $p < 0,05$) вмісту стабільного метаболіту активного кисню — пероксиду водню (див. табл. 2). Ці дані підтверджують активацію процесів ПОЛ у хворих на ІЛГ.

За умов лікування БКК дилтіаземом активність cNOS в тромбоцитах крові значно підвищувалась (у 9 разів, $p < 0,05$) і навіть перевищувала нормальні величини ($p < 0,05$, див. табл. 1). Ці дані свідчать про активацію синтезу “корисного” NO в тромбоцитах, а можливо, і в ендотеліоцитах. Пул нітрит-аніона (NO_2^-) залишався на високому рівні. Активність iNOS і пул нітрат-аніона (NO_3^-) залишалися підвищеними у порівнянні з нормальними величинами ($p < 0,05$) без істотних змін (див. табл. 1). Ці дані підтверджують припущення, що в умовах лікування дилтіаземом NO, який утворюється завдяки iNOS, переважно фермен-

Таблиця 2. Активність ферменту аргінази та вміст пероксиду водню та карбаміду в тромбоцитах крові хворих на ІЛГ та їх зміни в умовах лікування дилтіаземом ($M \pm m$)

Група обстежуваних	H_2O_2 , пмоль/мг білка	Аргіназа, нмоль/(хв · мг білка)	Карбамід, нмоль/мг білка
Здорові особи	$42,0 \pm 11,1$	$0,91 \pm 0,09$	$177,3 \pm 23,8$
Хворі на ІЛГ до лікування	$349,4 \pm 88,9^*$	$5,70 \pm 0,85^*$	$572,7 \pm 109,8^*$
на фоні лікування	$373,6 \pm 118,1^*$	$13,77 \pm 2,60^{*,**}$	$740,7 \pm 115,8^*$

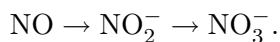
*Різниця достовірна порівняно з даними у здорових осіб, $p < 0,05$.

**Різниця достовірна порівняно з даними у хворих на ІЛГ до лікування, $p < 0,05$.

тативно окиснюється до нітрат-аніона (NO_3^-). Оскільки в умовах лікування дилтіаземом в тромбоцитах крові хворих на ІЛГ активність iNOS залишалася високою, а активність cNOS значно підвищувалася (вище норми), відношення iNOS/cNOS також нормалізувалося (див. табл. 1).

Вміст пероксиду водню в тромбоцитах при лікуванні дилтіаземом залишався без істотних змін ($p > 0,05$) на високому рівні (див. табл. 2). Це може бути частково обумовлено перетворенням супероксидних аніон-радикалів ферментом супероксиддисмутазою в стабільний H_2O_2 , активність якої за дії дилтіазему, як показали наші дослідження [14], істотно зростає. Оскільки в умовах лікування дилтіаземом в тромбоцитах крові збільшувалася продукція “корисного” NO внаслідок активації cNOS, можна припустити, що синтезований NO знижує ефективність дії H_2O_2 навіть при його надлишковій кількості, що було показано на культурі ендотеліальних клітин легеневої артерії [15]. Активність аргінази ще більше зростала ($p < 0,05$, див. табл. 2), а вміст карбаміду в тромбоцитах крові залишався підвищеним у порівнянні з нормою ($p < 0,05$, див. табл. 2), що має важливе значення для обмеження синтезу “шкідливого” NO ферментом iNOS, активність якої при лікуванні залишалася високою (див. табл. 1).

Отже, як нами показано, у тромбоцитах крові хворих на ІЛГ знижувалася активність cNOS і, як наслідок, продукція “корисного” NO, що може частково зумовлювати підвищення легеневого судинного тонусу і агрегації тромбоцитів — важливих ланок патогенезу цієї патології. Зниження активності cNOS може відбуватися за рахунок як високої внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію, так і збільшення пулу NO, який синтезується iNOS. Активність iNOS в тромбоцитах крові хворих на ІЛГ значно підвищувалася, про що також свідчило збільшення співвідношення iNOS/cNOS. NO, який синтезується за допомогою iNOS, переважно бере участь у вільнорадикальних реакціях окиснення [2]. У тромбоцитах крові хворих на ІЛГ значно зростали пули NO_2^- та NO_3^- . Це вказує на те, що значна частина синтезованого de novo NO окиснювалася:



Значно зростає також неокисний аргіназний шлях обміну L-аргініну, про що свідчить істотна активація аргінази і накопичення карбаміду, та вміст стабільного метаболіту активного кисню — пероксиду водню, що свідчить про те, що тромбоцити знаходяться в стані оксидативного стресу.

В умовах лікування БКК дилтіаземом активність cNOS в тромбоцитах крові значно підвищувалася (навіть вище норми). Ці дані свідчать про активацію синтезу “корисного” NO в тромбоцитах, а можливо, і в ендотеліоцитах. Частка NO_2^- в пулі стабільних метаболітів NO підвищувалася майже в 2 рази. Активність iNOS і пул NO_3^- залишалися високими без істотних змін, але відношення iNOS/cNOS повністю нормалізувалося. Вміст пероксиду водню залишався на високому рівні. Це може, однак, обумовлюватись перетворенням супероксидних аніон-радикалів ферментом супероксиддисмутазою у стабільний H_2O_2 . Активність компенсаторного неокисного шляху обміну аргініну зростала, про що свідчить підвищення активності аргінази в тромбоцитах крові.

Таким чином, в патогенезі ІЛГ важливу роль відіграє порушення функції судинного ендотелію, а також і тромбоцитів, значне підвищення синтезу токсичного NO в тромбоцитах крові і, можливо, в ендотеліоцитах. При лікуванні дилтіаземом активність cNOS підвищується, що сприяє збільшенню продукції функціонально активного NO, що може позитивно впливати на функцію ендотелію.

За результатами досліджень можна зробити такі висновки. В тромбоцитах крові хворих на ІЛГ відбувається істотне зниження активності eNOS, що свідчить про зменшення синтезу NO з вазодилаторними властивостями. Підвищення активності iNOS супроводжується збільшенням пулу NO_3^- і сприяє активації процесів пероксидного окиснення ліпідів, про що свідчить збільшення вмісту H_2O_2 . Активація неокисного шляху обміну аргініну відбувається за рахунок активації фермента аргінази та збільшення рівня карбаміду. Вірогідно, це має компенсаторне значення для зменшення продукції “шкідливого” NO. За умов лікування блокатором кальцієвих каналів дилтіаземом активність Ca^{2+} -залежної eNOS в тромбоцитах крові хворих на ІЛГ підвищується і зростає частка NO_2^- в пулі стабільних метаболітів, що свідчить про активацію утворення пулу NO з вазодилаторними властивостями. При цьому дилтіазем не справляє впливу на активність Ca^{2+} -незалежної iNOS та пул NO_3^- . При застосуванні дилтіазему активність неокисного шляху обміну аргініну в тромбоцитах крові зростає.

1. Коноплева Л. Ф. Легочная гипертензия 1. Этиология, патогенез, клиника // Лікування та діагностика. – 2001. – № 4. – С. 29–35.
2. Белоус А. М., Малахов В. А. Клеточные механизмы сосудистой патологии // Журн. АМН України. – 1998. – 4, № 4. – С. 581–596.
3. Chin S. Y., Pandey K. N., Shi S. J. et al. Increased activity and expression of Ca^{2+} -dependent NOS in renal cortex of ANG II-infused hypertensive rats // Amer. J. Physiol. – 1999. – 277, No 5. – P. 797–804.
4. Чазова И. Е., Мартынюк Т. В., Масенко В. П. и др. Применение аспирина у больных с первичной легочной гипертензией // Терапевт. архив. – 1998. – 70, № 8. – С. 45–49.
5. Али Садек Али, Сергакова Л. М. Количественная оценка легочной гипертензии с помощью доплер-эхокардиографии // Кардиология. – 1988. – № 7. – С. 112–115.
6. Sheila T., Gacek J. H. Isolation of human platelets by albumin gradient and gel filtration // Methods in Enzymology. – 1989. – 169, Part A. – P. 11–13.
7. Green L. C., David A. V., Glogowski J. et al. Analysis of nitrate, nitrite and [^{15}N] nitrate in biological fluids // Ann. Biochem. – 1982. – 126, No 1. – P. 131–138.
8. Chang C., Liao J. C., Kno L. Arginase modulates NO production in activated macrophages // Ibid. – 1998. – 274, No 1. – H342-H348.
9. Cochen G., Dembile D., Marcus J. Measurement of catalase activity in tissue extracts // Anal. Biochem. – 1970. – No 34. – P. 30–38.
10. Garganta C. L., Bond J. S. Assay of kinetics of arginase // Ibid. – 1982. – 126, No 1. – P. 131–138.
11. Авдонин П. В., Меньшиков М. Ю., Орлов С. Н. и др. Механизм увеличения концентрации Ca^{2+} в цитоплазме тромбоцитов при действии факторов агрегации // Биохимия. – 1985. – 50, вып. 8. – С. 1241–1248.
12. Амосова Е. Н., Шпак Я. В., Недождий А. В. Изменение содержания цитокинов в сыворотке крови больных с диастолической сердечной недостаточностью // Укр. кардиол. журн. – 2003. – № 4. – С. 62–64.
13. Амосова К. М., Конопльова Л. Ф., Задорін Є. М. та ін. Стан вільнорадикальних процесів у хворих на первинну легенеvu гіпертензію // Практич. медицина. – 2002. – 8, № 4. – С. 18–22.
14. Амосова К. М., Гула Н. М., Губський Ю. І. та ін. Стан NO-системи в еритроцитах крові хворих з первинною легеневою гіпертензією та його зміни під час лікування дилтіаземом // Серце і судини. – 2004. – № 2(6). – С. 76–83.
15. Gupta M. P., Van Evanoff, Hart C. M. Nitric oxide attenuates hydrogen peroxide-mediated injury to porcine pulmonary artery endothelial cells // The American Physiological Society. – 1997. – P. L1133–1141.

Національний медичний університет
ім. О. О. Богомольця, Київ
Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна
НАН України, Київ

Надійшло до редакції 21.11.2006