

на правах рукописи

Огуркова Оксана Николаевна

**Продукция оксида азота лейкоцитами и тромбоцитами
здоровых доноров и больных с метаболическим синдромом**

14.00. 16 - патологическая физиология

03.00.13 - физиология

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой
степени кандидата медицинских наук**

Томск – 2006

Работа выполнена в ГОУ ВПО Сибирский государственный медицинский университет
Росздрава и в ГУ НИИ кардиологии ТНЦ СО РАМН

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор

Федорова Татьяна Сергеевна

кандидат медицинских наук

Ситожевский Алексей Викторович

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор,
академик РАМН

Дыгай Александр Михайлович

доктор биологических наук, профессор

Петрова Ирина Викторовна

Ведущая организация: ГОУ ВПО Новосибирский государственный медицинский
университет Росздрава

Защита состоится « ____ » _____ 2006 г. в ____ час на заседании диссертационного совета
Д 208.096.01 при Сибирском государственном медицинском университете (634050, г.Томск,
ул. Московский тракт, 2).

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке Сибирского
государственного медицинского университета (634050, г.Томск, пр. Ленина, 107).

Автореферат разослан « ____ » _____ 2005 года

Ученый секретарь
диссертационного совета

Суханова Г.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Сахарный диабет является широко распространенной патологией, приводящей к развитию сосудистых осложнений. По мнению одного из ведущих экспертов в области патогенеза сахарного диабета 2 типа Р. А. де Фронзо, сахарный диабет возникает как следствие нарушения баланса между чувствительностью к инсулину и его секрецией [DeFronzo R.A. et al., 1979]. В 1988 году G. Reaven описал дисметаболический кардиоваскулярный синдром, в который включил сахарный диабет 2 типа, ожирение, дислипидемию, эссенциальную гипертензию, тем самым подчеркивая общность патогенетических механизмов и исключительно неблагоприятный прогноз сочетания основных факторов этого синдрома. Для постановки диагноза метаболического синдрома достаточно наличия у пациента хотя бы двух факторов из первых трех [Reaven G.M., 1988; Timothy C. et. al., 1998]. Инсулинорезистентность часто рассматривают как основной патогенетический механизм, влекущий за собой проявления основных и второстепенных признаков этого синдрома [Piedrola G. et. al., 1996; Зимин Ю.В., 1998; Алмазов В.А. и соавт., 1999; Бутрова С.А., 1999]. Гиперинсулинемия и инсулинорезистентность являются факторами, способствующими развитию атеросклероза, это может быть обусловлено характерными для данного синдрома изменениями липидного спектра – гипертриацилглицеролемией и гиперхолестеролемией [Алмазов В.А. и соавт., 1999; Диденко В.А., 1999]. Однако, в патогенезе сосудистых осложнений сахарного диабета важная роль принадлежит также дисфункции эндотелия. Известно, что различные медиаторы, такие как тромбин, пептидолейкотриены, гистамин, брадикинин стимулируют эндотелиальные клетки, в результате чего на их поверхности экспрессируются белки Р-селектины, обладающие адгезивными свойствами [Cooper M.E., 1998; Anderson T.J., 1999; Балаболкин М.И. и соавт., 2004]. В процесс адгезии активно вовлекаются моноциты и полиморфноядерные лейкоциты, также у больных сахарным диабетом 2 типа наблюдается выраженное повышение адгезивной и агрегационной способности тромбоцитов [Козлов Ю.А. и соавт., 1988; Новицкий В.В. и соавт., 1997]. Согласно данным литературы, при развитии дисфункции эндотелия снижается синтез таких вазодилататоров, как оксид азота, эндотелин, фактор Виллебранда, увеличивается образование активных форм кислорода полиморфноядерными лейкоцитами, которые оказывают повреждающее действие на сосудистую стенку [Bellative P., 1988; Зенков Н.К. и соавт., 1993; Титов В.Н., 2001]. Одним из общих и ключевых элементов патогенеза инсулинорезистентности может быть нарушение синтеза оксида азота, продуцируемого эндотелиальными и гладкомышечными клетками, моноцитами, тромбоцитами. По современным представлениям в стенке сосуда функционирует сложная межклеточная кооперация, включающая эндотелиоциты, гладкомышечные клетки, моноциты, полиморфноядерные лейкоциты и тромбоциты. Главной целью этой кооперации является регуляция метаболизма гладкомышечной клетки [Hauschild S. et. al., 1990; Forstermann U. et. al., 1991; Lambect L.E. et. al., 1991; Bedard S. et. al., 1998]. Оксид азота служит важным фактором в поддержании гомеостаза сосудистой стенки, регулируя межклеточную адгезию,

тонус сосудов, процесс агрегации-деагрегации тромбоцитов [Марков Х.М., 1996]. Недостаток или избыток оксида азота играет существенную роль в патогенезе заболеваний, объединенных в метаболический синдром. Известно, что при инсулинорезистентности снижается инсулинстимулированная продукция оксида азота эндотелиальными и гладкомышечными клетками [Bedard S. et. al., 1998; Ding Y. et. al., 2000; Salt I. P. et. al., 2003]. Данные об изменении продукции NO моноцитами, нейтрофилами и тромбоцитами – основными участниками межклеточной кооперации, неоднозначны и зачастую носят противоречивый характер, мало исследованными остаются механизмы гормональной регуляции паракринной продукции оксида азота. Так же недостаточно изучена взаимосвязь изменения продукции оксида азота с основными проявлениями метаболического синдрома.

Цель:

изучить продукцию оксида азота моноцитами, полиморфноядерными лейкоцитами и тромбоцитами здоровых доноров и больных с метаболическим синдромом.

Задачи исследования:

1. Исследовать базальную продукцию оксида азота тромбоцитами, моноцитами и полиморфноядерными лейкоцитами здоровых доноров и больных с метаболическим синдромом.
2. Установить влияние инсулина *in vitro* на продукцию оксида азота тромбоцитами, моноцитами и полиморфноядерными лейкоцитами здоровых доноров и больных с метаболическим синдромом.
3. Изучить влияние адреналина и АДФ *in vitro* на продукцию оксида азота тромбоцитами здоровых доноров и больных с метаболическим синдромом.
4. Оценить взаимосвязь изменения продукции оксида азота моноцитами, полиморфноядерными лейкоцитами и тромбоцитами с основными проявлениями метаболического синдрома.

Научная новизна

Впервые показано, что базальная продукция оксида азота моноцитами больных с метаболическим синдромом увеличена, в то время как базальная продукция оксида азота тромбоцитами и полиморфноядерными лейкоцитами больных снижена по сравнению со здоровыми донорами.

Установлено, что культивирование моноцитов и полиморфноядерных лейкоцитов с инсулином в физиологической концентрации приводит к увеличению продукции оксида азота клетками больных с метаболическим синдромом, но на продукцию оксида азота тромбоцитами больных инсулин не оказывает влияния. Культивирование с инсулином моноцитов здоровых лиц приводит к увеличению продукции оксида азота клетками, но при этом, инсулин вызывает ингибирование продукции оксида азота полиморфноядерными лейкоцитами здоровых доноров.

Показано, что АДФ вызывает снижение продукции оксида азота тромбоцитами больных, в то время как адреналин приводит к увеличению активности фермента в тромбоцитах больных с метаболическим синдромом.

Научно-практическая значимость

Результаты исследования носят фундаментальный характер и дают новые знания о продукции оксида азота клеточной кооперацией, включающей, кроме эндотелиальных и гладкомышечных клеток, моноциты, полиморфноядерные лейкоциты и тромбоциты, что позволит понять роль нарушения продукции оксида азота в патогенезе метаболического синдрома. Полученные данные расширяют существующие представления о продукции оксида азота клетками крови в норме, что может быть использовано для раскрытия механизмов нарушения продукции оксида азота, моноцитами, полиморфноядерными лейкоцитами и тромбоцитами не только при метаболическом синдроме, но и при других заболеваниях. Уточнение роли изменения продукции оксида азота в возникновении сосудистых осложнений при метаболическом синдроме, позволит улучшить диагностику его основных проявлений и может быть использовано для обеспечения контроля эффективности и безопасности терапии. Области применения полученных данных являются патологическая физиология, физиология, биохимия и кардиология.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Инсулин в физиологическом диапазоне концентраций увеличивает содержание стабильных метаболитов оксида азота в культуре моноцитов здоровых доноров. Базальная и инсулининдуцированная продукция оксида азота культивируемыми моноцитами больных с метаболическим синдромом значительно превышает образование оксида азота моноцитами здоровых лиц.
2. Добавление инсулина вызывает увеличение продукции оксида азота в культуре полиморфноядерных лейкоцитов больных с метаболическим синдромом, но подавляет образование оксида азота полиморфноядерными лейкоцитами здоровых лиц.
3. Базальная и индуцированная инсулином, АДФ и адреналином продукция оксида азота тромбоцитами больных с метаболическим синдромом снижена по сравнению с продукцией оксида азота клетками здоровых лиц.
4. Существует тесная взаимосвязь между увеличением степени тяжести сахарного диабета 2 типа, артериальной гипертензией, ожирением и снижением базальной продукции оксида азота моноцитами и полиморфноядерными лейкоцитами больных с метаболическим синдромом.

Апробация работы

Основные положения диссертационной работы были представлены и доложены на II Всероссийском симпозиуме “Хроническое воспаление” (Новосибирск, 2000); 2 и 3 ежегодных семинарах молодых ученых “Актуальные вопросы клинической и экспериментальной кардиологии” (Томск, 2001-2002);

Публикации

По теме диссертации опубликовано 11 работ, из которых 2 статьи в центральной печати.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 121 странице машинописного текста. Содержит 40 рисунков и 8 таблиц. Состоит из введения, 4 глав: “Обзор литературы”, “Материал и методы исследования”, “Результаты собственных наблюдений”, “Обсуждение полученных результатов”, заключения, выводов и указателя литературы, включающего 122 источников, из них 54 отечественных и 68 зарубежных.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В ходе выполнения данной работы было обследовано 83 человека. Группу больных, состоящую из 57 больных сахарным диабетом 2 типа в сочетании с ишемической болезнью сердца и артериальной гипертензией в возрасте от 45 до 55 лет, обозначили как группу больных с метаболическим синдромом. На основании контрольных параметров компенсации сахарного диабета 2 типа, предложенных European NIDDM Policy Group, 1993г., больные были разделены на три группы: I группа – больные с компенсированным течением сахарного диабета 2 типа (n=9); II группа – больные с субкомпенсированным течением (n=17); III группа – больные с декомпенсированным течением сахарного диабета 2 типа (n=31).

Таблица 1.

Контрольные параметры компенсации сахарного диабета 2 типа, предложенные European NIDDM Policy Group, 1993г.

параметры	компенсация	субкомпенсация	декомпенсация
Глюкоза крови (ммоль/л)	4,4-6,1	≤ 7,8	> 7,8
Гликозилированный гемоглобин (%)	< 8	≤ 9,5	> 9,5
Общий холестерол (ммоль/л)	< 5,2	≤ 6,5	> 6,5
Холестерол – ЛПВП (ммоль/л)	> 1,1	≤ 0,9	< 0,9
Триацилглицеролы (ммоль/л)	< 1,7	≤ 2,2	> 2,2
Артериальное давление (мм рт. ст.)	≤ 140/90	≤ 160/95	> 160/95

Клинический диагноз верифицировали с помощью клинико-лабораторных методов исследования на базе отделения атеросклероза и хронической ишемической болезни сердца (руководитель – академик РАМН Р.С. Карпов) НИИ кардиологии Томского научного центра Сибирского отделения РАМН. У всех больных отмечались дислипидемия и избыточная масса тела. Коррекция гипергликемии, дислипидемии включала диетические мероприятия и пероральные сахароснижающие средства (препараты сульфонилмочевины второй генерации, бигуаниды). Все исследования проводили не менее чем через 4 недели после отмены предшествующей гипотензивной терапии. В контрольную группу было включено 26 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. Лабораторный этап работы проводился на базе клинико-диагностической лаборатории НИИ кардиологии ТНЦ СО РАМН (руководитель – с.н.с., к.м.н. Т.Е. Сулова).

Показатели глюкозы, гликозилированного гемоглобина, липидного обмена и мочевой кислоты определяли с помощью стандартных наборов (“Bioson”, Германия), значение

фруктозамина исследовали с помощью наборов (“Chronolab”, Швейцария), базальное содержание инсулина и С-пептида в сыворотке крови определяли иммуноферментным методом с помощью наборов фирмы (“Dako”, Дания).

Мононуклеарные и полиморфноядерные лейкоциты выделяли из гепаринизированной венозной крови на градиенте плотности Histopaque (1.119/1.077). Число мононуклеаров и гранулоцитов подсчитывали в камере Горяева с использованием 1% трепанового синего, концентрацию доводили до 5×10^6 клеток, которые затем культивировали 48 часов в полной среде с добавлением бактериального липополисахарида (“Calbiochem”, США) 10 мкг/мл, с добавлением инсулина (“Sigma”, США) в концентрациях 0,03; 0,1; 0,3; 1 и 10 нМ. Базальную и инсулининдуцированную продукцию оксида азота моноцитами и полиморфноядерными лейкоцитами определяли в клеточных супернатантах по содержанию в них нитритов с использованием реактива Грисса. Содержание нитритов оценивали спектрофотометрически при 550 нм. Калибровочную кривую строили с использованием раствора NaNO_2 , концентрацию выражали в нмоль NO_2^- /мл / 10^6 клеток.

Для определения продукции оксида азота тромбоцитами, клетки выделяли из венозной крови с 6% ЭДТА путем центрифугирования 15 минут 1400 об/мин. Клетки ресуспендировали в 1 мл раствора Хенкса, концентрация тромбоцитов в пробе составляла 10^8 клеток. Определение продукции оксида азота проводили как описано [Rabini R.A. et. al., 1998]. Метод основан на конверсии оксигемоглобина в метгемоглобин оксидом азота и изменении абсорбции при 577 нм. Оксигемоглобин получали по методу [Rabini R.A. et. al., 1998]. Гемоглобин человека (“Sigma”, США) смешивали с дитионатом натрия “Sigma” (США) и хроматографировали через колонку 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 экстинции $131000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

В кювету в 50 мМ К-фосфатный буфер добавляли тромбоциты в концентрации 10^8 клеток/мл. В качестве ингибитора NO-синтазы использовали 100 мкМ L-NMMA (N^{ω} -monomethyl-L-arginine). В качестве индукторов продукции оксида азота добавляли 0,34 нМ инсулина (“Sigma”, США), а адреналин и АДФ в концентрации 5 мкг/мл (“Технология-Стандарт”, Россия). Расчет продукции оксида азота проводили, оценивая снижение абсорбции оксигемоглобина при $\lambda=577$ нм, коэффициент экстинции $11200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ и выражали в пмоль NO/мин/ 10^8 клеток.

Анализ полученных результатов проводили с помощью стандартного пакета программ STATISTICA 6.0. Достоверность различий параметров сравниваемых групп оценивали по непараметрическим критериям U-Манна-Уитни и Вилкоксона, корреляционный анализ проводили с использованием коэффициента корреляции Спирмена.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Стаж сахарного диабета 2 типа у обследованных больных составлял от 3 до 5 лет, а гипертонической болезни - от 7 до 8 лет. У всех обследованных больных отмечалось

увеличение индекса массы тела, соответствующее ожирению I степени. Клиническая характеристика обследованных больных представлена в таблице 2.

Таблица 2

Клиническая характеристика больных с метаболическим синдромом и здоровых доноров.

показатель	I группа (n=9)	II группа (n=17)	III группа (n=31)	Здоровые доноры (n=26)
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: приведены значения (M±m). * - p≤0,05 различия с контролем.

У обследованных больных с метаболическим синдромом отмечалось увеличение систолического и диастолического артериального давления. Механизм развития метаболического синдрома связан с повреждением организма на уровне клеточных структур: инсулинорезистентностью, при которой отмечается стимуляция функции надпочечников, задержкой натрия и воды, увеличением внутриклеточного содержания натрия, усилением сократительной способности кардиомиоцитов и гладкомышечных клеток стенок сосудов, пролиферацией эндотелия сосудов [Пушкарев В.М. и соавт., 1992; Балаболкин М.И. и соавт., 1999; Беляева Н.Ф. и соавт., 2000]. Известно, что основная роль в развитии гипергликемии принадлежит инсулинорезистентности тканей, это приводит к снижению инсулинобусловленного захвата глюкозы периферическими тканями – мышечной и жировой, в определенной мере связанного с работой транспортеров глюкозы GLUT 4, которые начинают функционировать как переносчики после рецепции инсулина [Алмазов В.А. и соавт., 1999]. Высокие концентрации глюкозы оказывают токсическое действие, связанное с неферментативным гликозилированием белков [Благосклонная Я.В. и соавт., 1996; Schmidt M. et. al., 1996]. Хроническая гипергликемия является причиной гликозилирования ЛПНП, которые становятся более чувствительными к воздействию на них свободных радикалов, образующихся при сахарном диабете [Yan S.D. et. al., 1994; Rabini R.A. et. al., 1999]. Повышенное количество гликозилированного гемоглобина, фруктозамина является одним из важных факторов в патогенезе сосудистых осложнений диабета. Конечные продукты гликозилирования снижают активность оксида азота и служат, тем самым, еще одним дополнительным фактором нарушения функции эндотелия. Во всех группах больных были обнаружены следующие биохимические маркеры, характеризующие метаболический синдром: гипергликемия, гиперурикемия и дислипидемия.

Биохимические показатели больных с метаболическим синдромом и здоровых доноров.

показатель	I группа (n=9)	II группа (n=17)	III группа (n=31)	Здоровые доноры (n=26)
Глюкоза, ммоль/л	5,31±0,45***	6,61±0,73 *	8,60±0,81 *	4,53±0,11
Гликозилированный гемоглобин, %	7,42±0,27***	7,83±0,29 ****	8,71±0,22	Не определяли
Фруктозамин, мкмоль/л	200,34±10,62 *	179,92±11,67 *	198,17±10,87 *	147,97±5,91
Мочевая кислота, мкмоль/л	384,25±13,56 *	383,82±19,82 *	391,78±15,33 *	327,50±15,75
Инсулин, пмоль/л	50,65±4,80 *	52,09±3,58 *	51,59±4,46 *	93,64±7,89
C-пептид, пмоль/л	660,01±57,80	660,72±52,04	685,01±18,89	628,64±19,12
Общий холестерол, ммоль/л	5,30±0,32 ** ***	5,81±0,21 *	6,39±0,24 *	4,88±0,15
Триацилглицеролы, ммоль/л	1,95±0,18 *	2,35±0,24 *	3,11±0,47 *	1,29±0,06
Холестерол ЛПВП, ммоль/л	1,11±0,07	1,06±0,07 *	1,04±0,06 *	1,26±0,04
Холестерол ЛПНП, ммоль/л	3,27±0,25	3,63±0,16 *	3,98±0,20 *	3,12±0,16
Индекс атерогенности	3,03±0,30 ***	3,50±0,25 *	4,06±0,24 *	2,44±0,14

Примечание: приведены значения ($M \pm m$). * - $p \leq 0,05$ различия с контролем; ** - $p \leq 0,05$ различия I группы со II; *** - $p \leq 0,05$ различия I группы с III; **** - $p \leq 0,05$ различия II группы с III.

Во всех группах больных обнаружено увеличение содержания мочевой кислоты по сравнению с группой здоровых доноров, во II и III группах выявлена положительная корреляция с уровнем триацилглицеролов ($r=0,49$ и $r=0,65$ соответственно, $p < 0,05$), причем наиболее выражена корреляционная связь в группе с декомпенсированным течением сахарного диабета 2

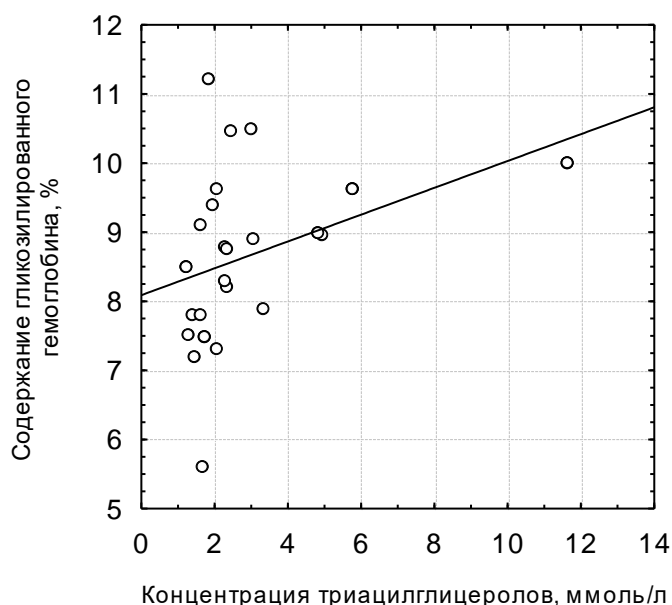
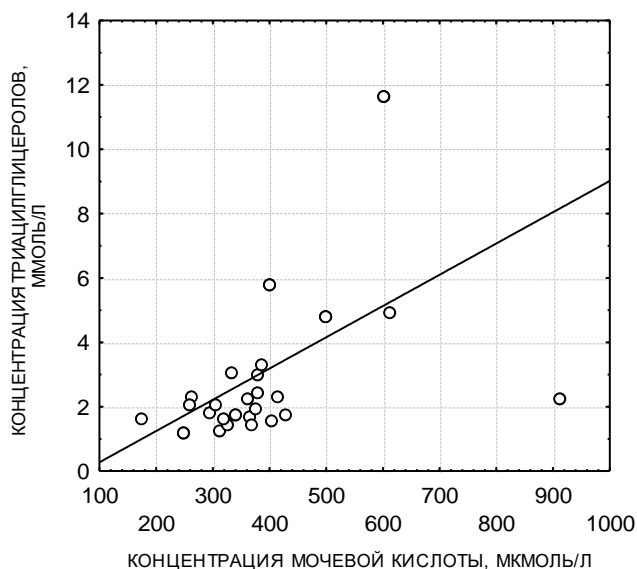


Рис.1. Зависимость между содержанием триацилглицеролов и мочевой кислоты в сыворотке крови больных с субкомпенсированным течением сахарного диабета 2 типа

типа, то есть изменение пуринового обмена развивалось параллельно с формированием нарушений обмена липидов (рис. 1 и 2). Полученные нами результаты согласуются с данными литературы о взаимосвязи таких компонентов метаболического синдрома, как дислипидемия, инсулинорезистентность и увеличение в сыворотке крови содержания мочевой кислоты.

На определенном этапе гиперурикемия может развиваться независимо от других

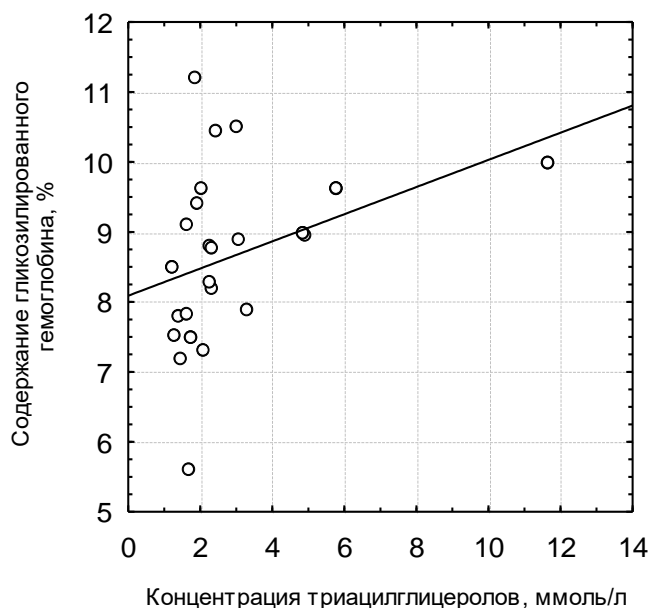


проявлений инсулинорезистентности. Однако, в дальнейшем, повышенный уровень мочевой кислоты способствует развитию тубулоинтерстициального нефрита, при котором происходит фибробластное перерождение интерстициальных клеток, что служит причиной задержки ионов натрия, воды и повышения артериального давления [Searle N.R. et.al., 1992; Trachman H. et.al., 2002].

Рис.2. Зависимость между содержанием триацилглицеролов и мочевой кислоты в сыворотке крови больных с декомпенсированным течением сахарного диабета 2 типа

Задержка натрия и воды является также одним из ведущих патогенетических механизмов АГ и при инсулинорезистентности из-за прямого влияния инсулина на почки [Подзолков В.И. и соавт., 2003]. Таким образом, наблюдаемые у обследованных больных гиперурикемия и гипергликемия, сопровождающиеся гликозилированием белков, приводят к снижению активности ферментов, нарушению состояния клеточных мембран, рецепторов и многим другим изменениям. Итогом этих сдвигов может явиться изменение функционального состояния сердечно-сосудистой системы, в том числе, изменения эндотелийзависимой релаксации сосудов. Во всех группах больных с метаболическим синдромом по сравнению со здоровыми содержание инсулина было снижено, в то время как, достоверных различий по содержанию С-пептида между группами и по сравнению с контролем обнаружено не было. Слабовыраженная тенденция к увеличению содержания С-пептида у больных с метаболическим синдромом свидетельствует о функциональном напряжении механизмов биосинтеза гормона, а отмечающаяся на этом фоне гипоинсулинемия, вероятно, объясняется усиленной деградацией гормона. Ожирению сопутствуют дислипидемии, предрасполагающие к развитию ишемической болезни сердца и атеросклероза. Анализ полученных данных свидетельствует о том, что во всех группах больных с метаболическим синдромом отмечается дислипидемия, выражающаяся в гипертриацилглицеролемии, увеличении общего холестерина и холестерина ЛПНП, при одновременном снижении содержания холестерина ЛПВП. Гипергликемия приводит к атерогенным изменениям липидного спектра крови, при проведении корреляционного анализа в III группе больных

выявлена положительная взаимосвязь между уровнем триацилглицеролов и содержанием гликозилированного гемоглобина ($r=0,58$ $p<0,05$), (рис. 3).



Относительная недостаточность инсулина и снижение утилизации глюкозы жировой тканью приводят к значительному опустошению жирового депо и увеличению уровня свободных жирных кислот, которые препятствуют связыванию инсулина гепатоцитами, что способствует возникновению системной гиперинсулинемии, которая, в свою очередь, через нарушение ауорегуляции инсулиновых рецепторов усиливает инсулинорезистентность периферических тканей.

Рис.3. Зависимость между содержанием гликозилированного гемоглобина и уровнем триацилглицеролов в сыворотке крови больных с декомпенсированным течением сахарного диабета 2 типа

В печени свободные жирные кислоты активируют процессы глюконеогенеза, что вызывает развитие гипергликемии [Бутрова С.А., 1999]. Таким образом, анализ полученных нами данных свидетельствует об атерогенных изменениях липидного спектра крови, наиболее четко выраженных в группах больных с субкомпенсированным и декомпенсированным течением сахарного диабета 2 типа и закономерных взаимосвязях изменений углеводного обмена с процессами метаболизма липидов, а также об участии этих сдвигов в патогенезе метаболического синдрома.

Атерогенные изменения липидного спектра крови, гипергликемия, инсулинорезистентность оказывают существенное влияние на функциональные и метаболические характеристики клеток иммунокомпетентной системы [Залевская А.Г. и соавт., 1981; Козлов Ю.А. и соавт., 1988]. Моноциты, полиморфноядерные лейкоциты, тромбоциты и эндотелиальные клетки входят в межклеточную кооперацию, определяющую в субэндотелиальном пространстве содержание оксида азота, который является частью многокомпонентной системы регуляции сосудистого тонуса и обладает антиатерогенным эффектом. В настоящем исследовании было установлено, что как базальная, так и индуцированная инсулином продукция оксида азота моноцитами в группах больных метаболическим синдромом была повышена по сравнению с контрольной группой, причем во II и III группах содержание стабильных метаболитов оксида азота было значительно выше, чем в I группе больных (табл. 4).

Таблица 4

Содержание стабильных метаболитов оксида азота в супернатанте клеточной культуры моноцитов здоровых доноров и больных метаболическим синдромом при культивировании клеток с различными концентрациями инсулина

Исследованные показатели	Концентрация стабильных метаболитов NO (нмоль NO ₂ ⁻ /мл/10 ⁶ клеток)			
	I группа (n=9)	II группа (n=17)	III группа (n=31)	Контроль (n=26)
Инсулин в среде культивирования (нМ)				
Проба без инсулина	29,95±4,18	37,18±5,41 *	36,48±2,88 *	18,90±3,69
0,03	31,88±1,81 * ** ***	38,78±3,98 *	37,69±2,54 *	22,97±0,59
0,1	38,57±2,96 * **	43,19±4,95 *	43,07±2,74 *	27,05±3,15
0,3	32,67±5,17 *	46,79±3,90 *	38,55±2,96 *	24,87±1,15
1	33,59±5,01 * ***	40,11±5,81 *	37,98±3,50 *	22,64±1,76
10	32,36±5,58 * ***	37,10±4,35 *	35,82±2,40 *	18,03±0,13

Примечание: приведены значения (M±m). * - p≤0,05 различия с контролем;

** - p≤0,05 различия I группы со II; *** - p≤0,05 различия I группы с III;

Одними из наиболее вероятных причин усиления генерации оксида азота мононуклеарами при сахарном диабете может быть увеличение уровня интерлейкина-6, трансформирующего

фактора роста, а так же продуктов гликозилирования [Алмазов В.А. и соавт., 1999]. При метаболическом синдроме гипергликемия может являться фактором, усиливающим экспрессию индуцибельной формы NO-синтазы [Mills C.D., 1991; Trachman H. et. al., 2002]. С помощью корреляционного анализа выявлено, что в III группе больных с метаболическим синдромом уровень глюкозы связан с усилением синтеза оксида азота моноцитами при культивировании клеток с инсулином в концентрации 0,3 нМ (r=0,37 p≤0,05), (рис. 4).

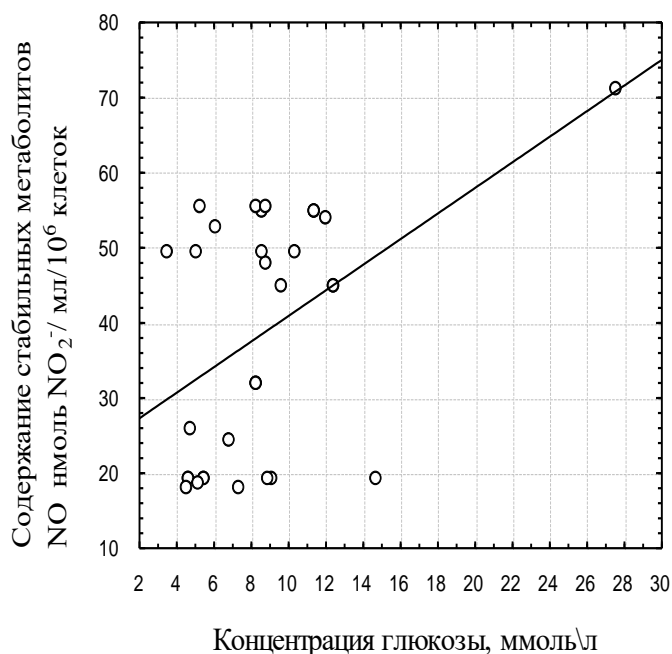
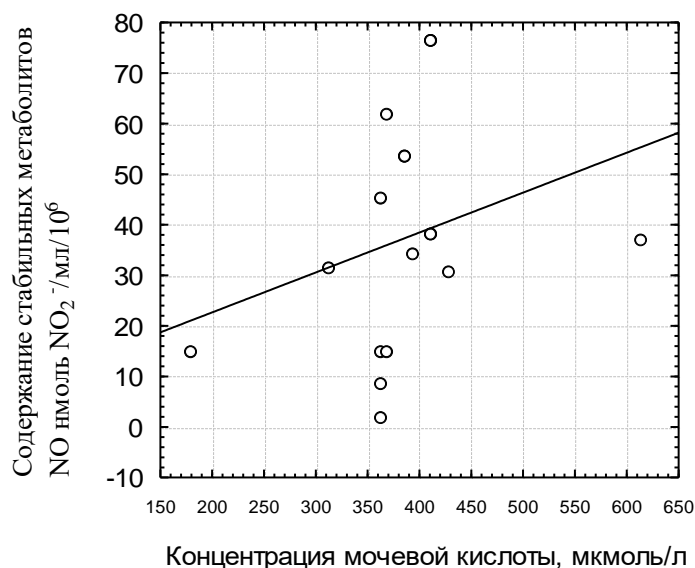


Рис. 4. Зависимость между содержанием глюкозы в сыворотке крови и продукцией оксида азота моноцитами при культивировании клеток с инсулином в концентрации 0,3 нМ в группе больных с декомпенсированным течением сахарного диабета 2 типа

Усиление синтеза оксида азота сопровождается увеличением содержания мочевой кислоты, подтверждением этого может служить полученная в группе больных с субкомпенсированным течением сахарного диабета положительная взаимосвязь между уровнем мочевой кислоты и базальной продукцией оксида азота моноцитами ($r=0,50$ $p \leq 0,05$),

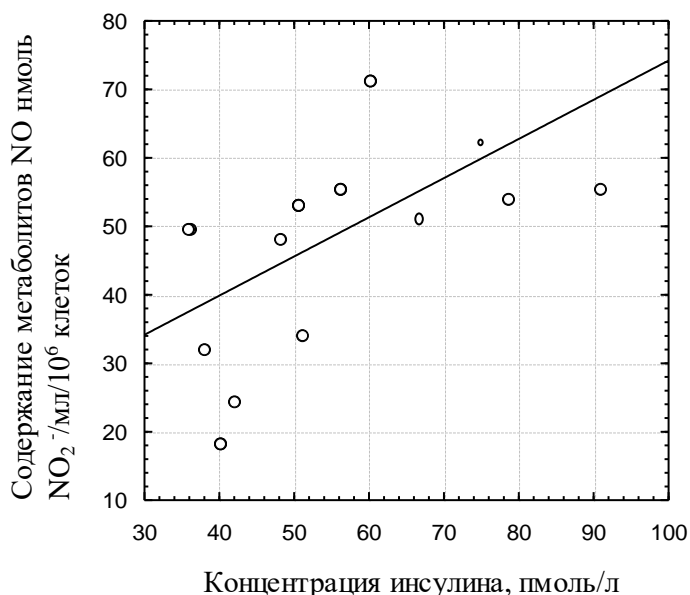


(рис.5).

Добавление инсулина в культуральную среду в концентрации 0,1 и 0,3 нМ приводило к максимальному увеличению содержания стабильных метаболитов оксида азота в супернатанте клеточной культуры моноцитов, как в группах больных, так и у здоровых лиц.

Рис.5. Зависимость между содержанием мочевой кислоты в сыворотке крови и базальной продукцией оксида азота моноцитами больных с субкомпенсированным течением сахарного диабета 2 типа

При увеличении концентрации инсулина до 10 нМ в среде культивирования продукция



оксида азота моноцитами не отличалась от базального уровня во всех группах обследованных лиц. Таким образом, при культивировании моноцитов с инсулином в различных концентрациях наблюдается модулирующий эффект гормона, как в группах больных метаболическим синдромом, так и в группе здоровых доноров. Стимулирующее действие инсулина на продукцию NO наиболее выражено именно в группе здоровых людей.

Рис.6. Зависимость между содержанием инсулина в сыворотке крови и продукцией оксида азота моноцитами, при культивировании клеток с инсулином в концентрации 0,3 нМ в группе больных с субкомпенсированным течением сахарного диабета 2 типа

Наиболее резистентными к действию инсулина оказались моноциты больных с декомпенсированным течением диабета. Подтверждением наличия инсулинорезистентности моноцитов больных с метаболическим синдромом является обнаруженная в группе с субкомпенсированным течением сахарного диабета положительная взаимосвязь между содержанием инсулина в сыворотке крови и инсулинстимулированной продукцией оксида азота моноцитами при концентрации гормона в среде культивирования 0,3 нМ ($r=0,78$, $p\leq 0,05$), (рис. 6). При низком уровне гормона в крови больных метаболическим синдромом, ответная реакция клеток на инсулин *in vitro* также уменьшается, что может косвенно указывать на нарушение рецепторных или пострецепторных механизмов. При сахарном диабете наблюдается снижение инсулинстимулированной продукции оксида азота эндотелиальными и гладкомышечными клетками [Forstermann U. et. al., 1991].

Возможно, повышение синтеза оксида азота моноцитами в случае инсулинорезистентности является компенсаторным физиологическим эффектом и, по-видимому, вклад мононуклеарных лейкоцитов в суммарную продукцию NO, важен для регуляции сосудистого тонуса. При исследовании синтеза оксида азота полиморфноядерными лейкоцитами больных сахарным метаболическим синдромом было обнаружено снижение базальной продукции NO клетками во всех трех группах больных по сравнению с контролем, данные представлены в таблице 7.

Таблица 7

Содержание стабильных метаболитов оксида азота в супернатанте клеточной культуры полиморфноядерных лейкоцитов здоровых доноров и больных метаболическим синдромом при культивировании клеток с различными концентрациями инсулина

Исследованные показатели	Концентрация стабильных метаболитов NO (нмоль NO ₂ ⁻ / мл /10 ⁶ клеток)			
	I группа (n=9)	II группа (n=17)	III группа (n=31)	Контроль (n=26)
Проба без инсулина	3,37±0,40	3,76±0,28	3,64±0,18	5,02±0,50
0,03	4,06±0,55	4,21±0,35	4,03±0,25	4,01±0,33
0,1	3,90±0,75	4,04±0,44 *	3,66±0,31	3,10±0,10
0,3	4,69±0,57	5,11±0,42 *	4,59±0,34	3,71±0,07
1	3,52±0,30	3,53±0,19	3,50±0,14	3,73±0,12
10	3,87±0,30	3,78±0,17	3,98±0,21 *	3,37±0,12

Примечание: приведены значения (M±m) * - $p\leq 0,05$ различия с контролем.

Увеличение длительности заболевания, ожирение могут приводить к нарушению базальной продукции NO полиморфноядерными лейкоцитами, действительно, при проведении корреляционного анализа в группах больных с метаболическим синдромом были получены отрицательные взаимосвязи между базальной продукцией оксида азота полиморфноядерными лейкоцитами и сроком сахарного диабета и индексом массы тела ($r=-0,68$ и $r=-0,89$, соответственно, $p\leq 0,05$), (рис. 7 и 8).

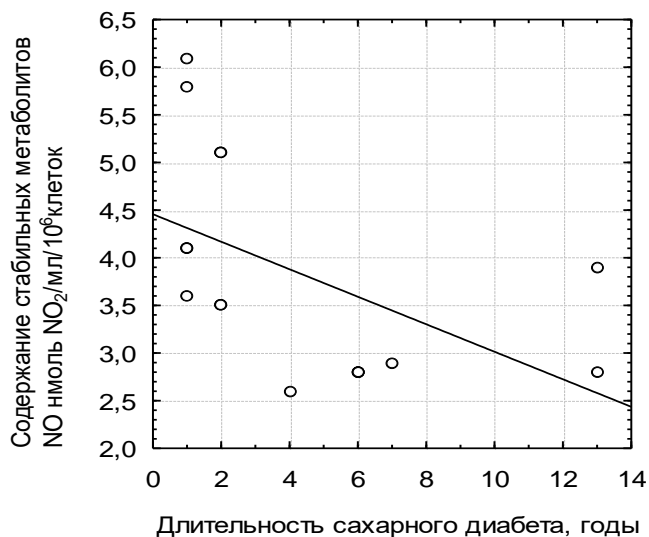


Рис.7. Зависимость между стажем сахарного диабета и базальной продукцией оксида азота полиморфноядерными лейкоцитами в группе субкомпенсированным течением сахарного диабета 2 типа

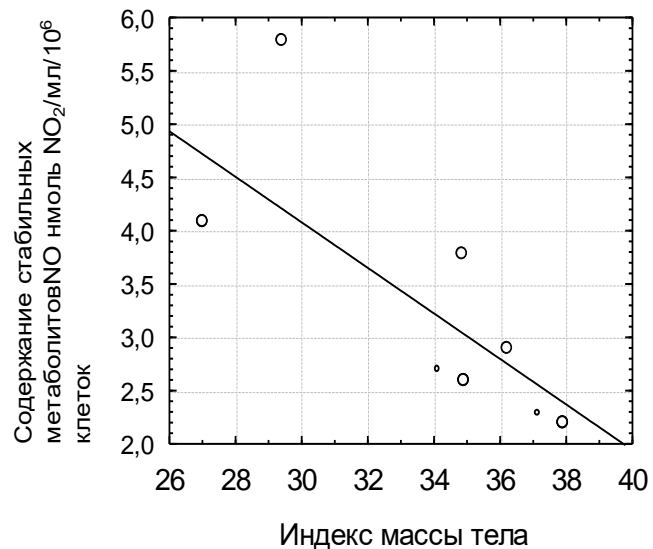


Рис.8. Зависимость между индексом массы тела и базальной продукцией оксида азота полиморфноядерными лейкоцитами в группе с компенсированным течением сахарного диабета 2 типа

Культивирование инсулина в диапазоне концентраций до 0,3 нМ приводило к максимальному увеличению содержания стабильных метаболитов оксида азота в супернатанте клеточной культуры полиморфноядерных лейкоцитов больных с метаболическим синдромом, дальнейшее увеличение концентрации гормона до 10 нМ приводило к снижению продукции оксида азота клетками. В контрольной группе было обнаружено, что культивирование ПМЛ с инсулином в различных концентрациях приводило к угнетению продукции оксида азота.

Возможно, при метаболическом синдроме гипергликемия и гипоинсулинемия могут являться факторами, усиливающими экспрессию индуцибельной формы NO-синтазы ПМЛ. Во II группе обнаружена положительная взаимосвязь между содержанием гликозилированного гемоглобина и продукцией NO, стимулированной инсулином в концентрации 0,3 нМ ($r=0,53$, $p \leq 0,05$), (рис. 9).

Таким образом, метаболические факторы могут вызывать модификацию рецепторного аппарата полиморфноядерных лейкоцитов, посредством механизмов праймирования и приводить к увеличению чувствительности клеток к инсулину *in vitro*

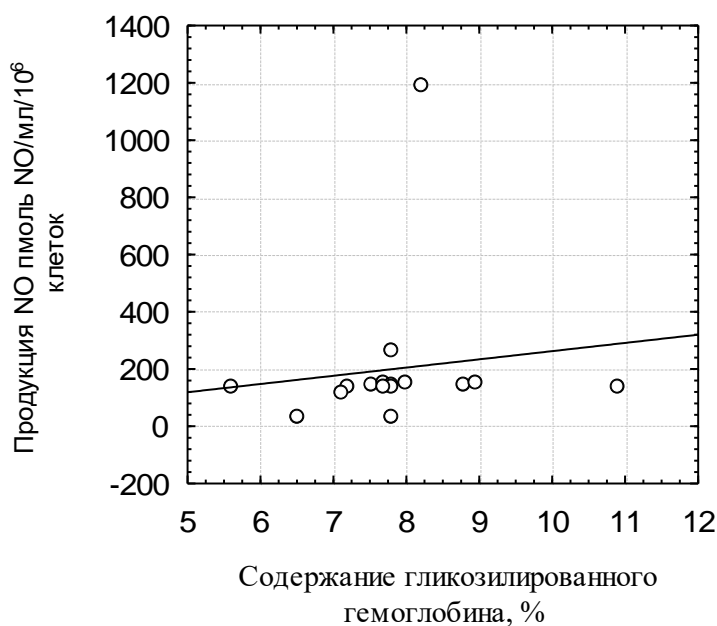


Рис.9. Зависимость между содержанием гликозилированного гемоглобина и продукцией оксида азота полиморфноядерными лейкоцитами, при культивировании клеток с инсулином в концентрации 0,3 нМ в группе с субкомпенсированным течением сахарного диабета 2 типа.

При изучении продукции оксида азота тромбоцитами больных с метаболическим синдромом было обнаружено, что как базальная, так и индуцированная инсулином в концентрации 0,3 нМ, АДФ - 5 мкг/мл, адреналином - 5 мкг/мл продукция оксида азота во всех группах больных была снижена по сравнению с контролем (табл. 8).

Таблица 8

Продукция оксида азота тромбоцитами здоровых и больных метаболическим синдромом при добавлении в реакционную среду АДФ, адреналина и инсулина

Исследованные показатели	Содержание оксида азота (пмоль NO/ мл /10 ⁸ клеток)			
	I группа (n=9)	II группа (n=17)	III группа(n=31)	Контроль(n=26)
Базальная продукция	112,56±12,50	119,12±15,06 *	85,97±9,38 *	230,57±15,47
Инсулин [0,3 нМ]	38,78±6,06* ***	48,53±6,67 *	54,19±9,38 *	230,01±14,03
АДФ [5 мкг/мл]	42,01±4,81* ***	63,53±6,93 *	63,94±13,26 *	244,29±15,67
Адреналин [5 мкг/мл]	105,01±13,42 * ***	121,06±15,43 *	124,03±13,02 *	180,01±19,72

Примечание: приведены значения (M±m)

* - p≤0,05 различия с контролем; ** - p≤0,05 различия между I и II группами;

***- p≤0,05 различия между I и III группами;

В тромбоцитах функционирует кальций-кальмодулинзависимая NO-синтаза, одной из причин снижения активности этого фермента считают гликозилирование кальмодулина, что возможно является причиной снижения базальной продукции оксида азота тромбоцитами больных с метаболическим синдромом. Кроме того, по мнению некоторых авторов, метаболические нарушения могут влиять на экспрессию NO-синтазы в мегакариocyтах, что

приводит к снижению её активности в тромбоцитах [Firkin B.G., 1984; Rabini R.A. et. al., 1998].

При изучении влияния инсулина на образование оксида азота тромбоцитами, было обнаружено подавление синтеза NO во всех группах больных с метаболическим синдромом, в то же время на продукцию оксида азота тромбоцитами здоровых доноров инсулин не оказывал ингибирующего действия. Можно предположить, что дислипидемия при метаболическом синдроме сопровождается увеличением микровязкости мембран тромбоцитов и нарушением функционирования мембранных рецепторов [Firkin B.G., 1984]. Подтверждением данного предположения могут служить данные, указывающие на существование отрицательной корреляционной зависимости между инсулинстимулированной продукцией оксида азота и уровнем триацилглицеролов и индекса атерогенности (рис. 10 и 11).

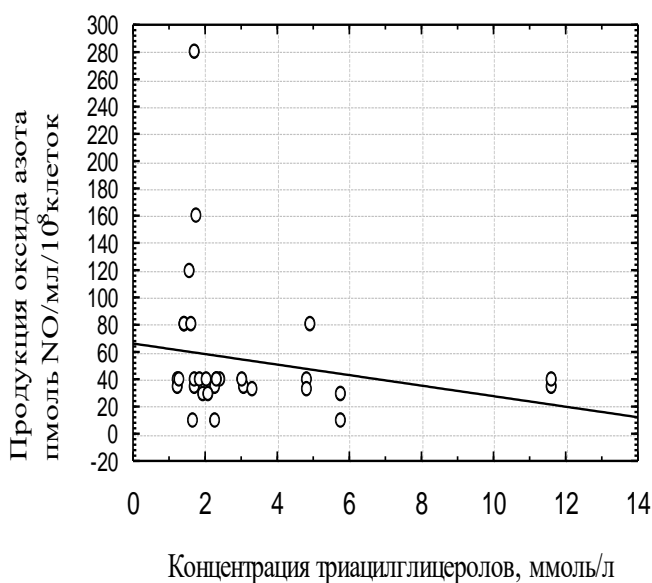
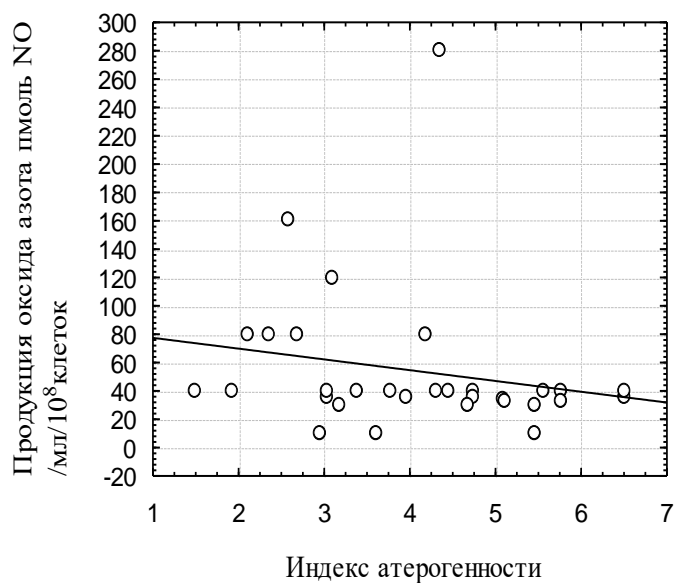
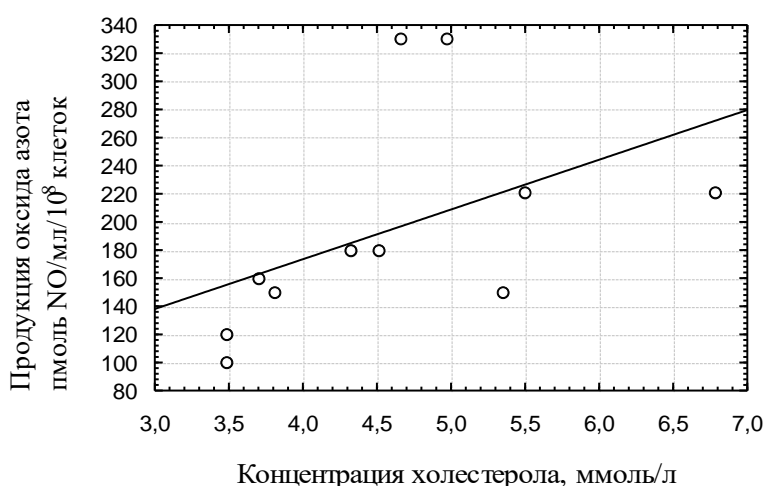


Рис.10. Взаимосвязь между содержанием триацилглицеролов в сыворотке крови и продукцией оксида азота тромбоцитами при добавлении в реакцию среду инсулина в концентрации 0,3 нМ в группе больных с декомпенсированным течением сахарного диабета 2 типа

Рис.11. Взаимосвязь между индексом атерогенности и продукцией оксида азота тромбоцитами при добавлении в реакцию среду инсулина в концентрации 0,3 нМ в группе больных с декомпенсированным течением сахарного диабета 2 типа



Адреналин увеличивает продукцию оксида азота в группе больных с декомпенсированным течением сахарного диабета 2 типа. Можно предположить, что при метаболическом синдроме адреналин, посредством стимуляции α -2-адренорецепторов включает компенсаторный механизм, контролирующей гиперагрегацию тромбоцитов. При этом, стимуляция адренергических рецепторов, приводит к увеличению концентрации ионов кальция в цитоплазме и активации конститутивной NO-синтазы и увеличению синтеза оксида азота. В ряде исследований продемонстрировано, что увеличение уровня холестерина в сыворотке крови, приводит к увеличению плотности α -2-адренорецепторов на мембране тромбоцитов [Firkin B.G., 1984; Шитикова А.С., 2000]. В нашем исследовании подтверждением этого может быть положительная взаимосвязь между уровнем холестерина в сыворотке крови и образованием оксида азота тромбоцитами в ответ на добавление адреналина ($r=0,70$, $p\leq 0,05$), (рис.12). Таким образом, приведенные данные свидетельствуют



о существовании тесной взаимосвязи между изменением продукции оксида азота и основными проявлениями метаболического синдрома.

Рис. 12. Взаимосвязь между содержанием холестерина в сыворотке крови и образованием оксида азота тромбоцитами при добавлении в реакционную среду 5 мкг/мл адреналина в группе здоровых доноров

Резюмируя данные литературы и результаты собственного исследования, мы предполагаем, что в стенке сосуда функционирует сложная межклеточная кооперация, включающая эндотелиальные и гладкомышечные клетки, моноциты, полиморфноядерные лейкоциты и тромбоциты. Главной целью этой кооперации является регуляция метаболизма гладкомышечной клетки. Известно, что инсулин усиливает образование оксида азота эндотелиальными и гладкомышечными клетками, а увеличение тонуса гладкомышечных клеток и артериальная гипертензия тесно связаны с инсулинорезистентностью. Можно предположить, что инсулинстимулированная продукция оксида азота моноцитами, обнаруженная в наших экспериментах, может вносить существенный вклад в баланс оксида азота, продуцируемого этой клеточной кооперацией. Таким образом, эндотелий, лейкоциты и тромбоциты могут участвовать в регуляции тонуса сосудов за счет формирования сложного механизма пара- и аутокринной продукции оксида азота в субэндотелиальном пространстве.

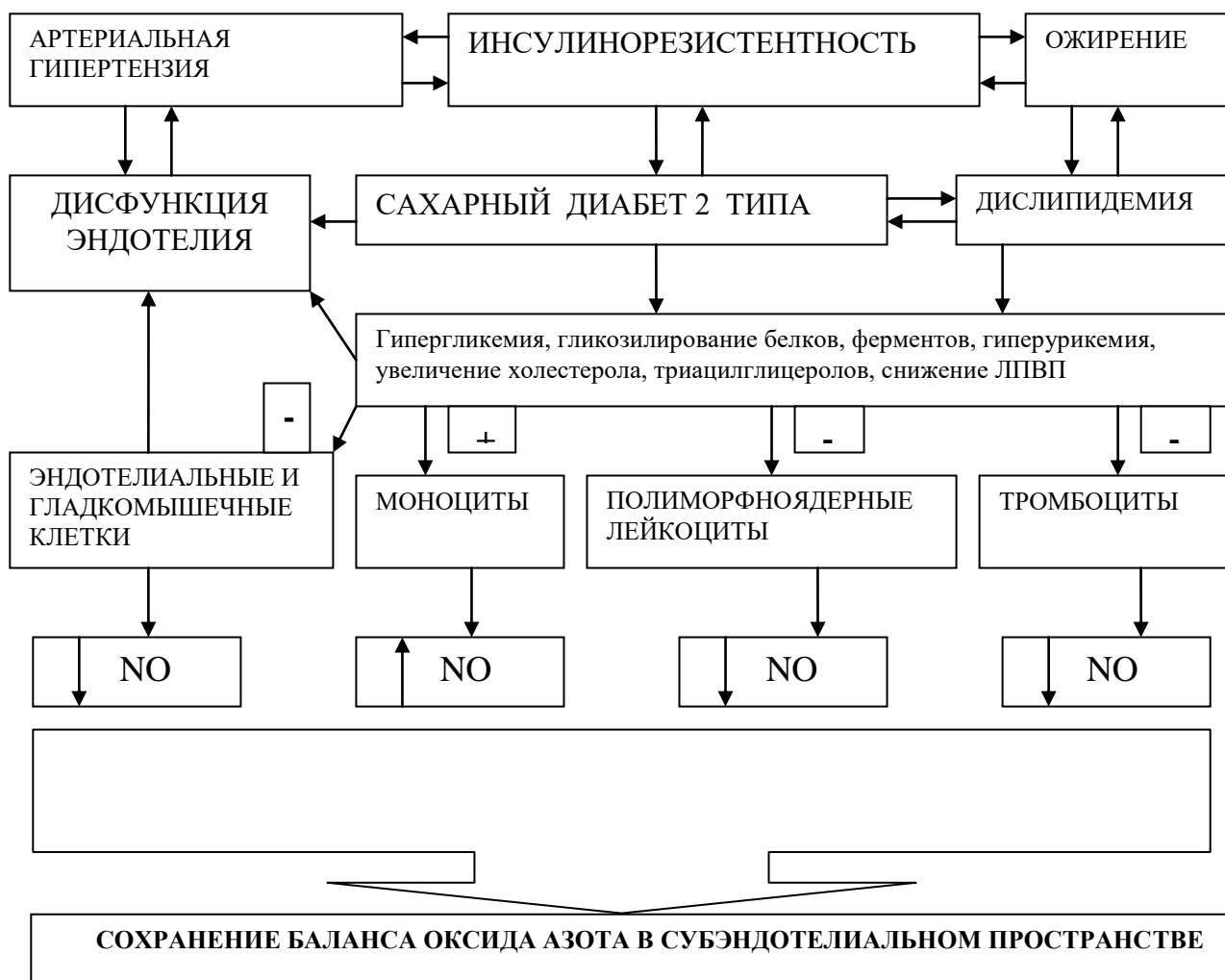


Рис.13. Гипотетическая схема взаимосвязи основных компонентов метаболического синдрома и изменения продукции оксида азота участниками клеточной кооперации (по данным литературы и результатам собственных исследований).

ВЫВОДЫ

1. Культивирование с инсулином моноцитов здоровых доноров и больных с метаболическим синдромом приводит к увеличению продукции оксида азота. Базальная и инсулининдуцированная продукция оксида азота культивируемыми моноцитами больных с метаболическим синдромом увеличена по сравнению с продукцией оксида азота клетками здоровых доноров.
2. Инсулин *in vitro* увеличивает продукцию оксида азота полиморфноядерными лейкоцитами больных с метаболическим синдромом и подавляет образование оксида азота клетками здоровых доноров.
3. Инсулин и АДФ *in vitro* вызывают подавление, а адреналин приводит к увеличению продукции оксида азота тромбоцитами больных с метаболическим синдромом.
4. Базальная и индуцированная инсулином, АДФ и адреналином продукция оксида азота тромбоцитами больных с метаболическим синдромом снижена по сравнению с продукцией оксида азота клетками здоровых доноров.

5. Базальная продукция оксида азота моноцитами и полиморфноядерными лейкоцитами больных с метаболическим синдромом снижается по мере прогрессирования сахарного диабета 2 типа, артериальной гипертензии и увеличения индекса массы тела. Инсулинстимулированная продукция оксида азота моноцитами больных с метаболическим синдромом возрастает при усилении гиперурикемии и дислипидемии.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Продукция супероксидного аниона и оксида азота полиморфноядерными лейкоцитами больных инсулиннезависимым сахарным диабетом в сочетании с ишемической болезнью сердца / А.В. Ситожевский, Т.Е. Сулова, И.В. Луста, О.В. Груздева, О.Н. Огуркова, Д.А. Измайлов, Т.С. Федорова // Сборник тезисов II Всероссийского симпозиума “Хроническое воспаление”. – Новосибирск. – 4-6 октября 2000. – С. 100.
2. Огуркова О.Н. Продукция оксида азота полиморфноядерными лейкоцитами больных инсулиннезависимым сахарным диабетом / О.Н. Огуркова // Сб. Статей по результатам студен. науч. конференции им.Н.И. Пирогова. – Томск. – 2000. – С. 65.
3. Оксидативный стресс и его компоненты при инсулиннезависимом сахарном диабете: вклад в процессы атерогенеза / И.В. Луста, А.В. Ситожевский, О.В. Груздева, Т.Е. Сулова, Е.А. Ивановская, О.Н. Огуркова // Сборник тезисов докладов “Актуальные вопросы кардиологии”. – Томск. – 2000. – С.86-87.
4. Способность липопротеинов низкой плотности к окислению и продукция $O_2 \cdot^-$ и NO мононуклеарными лейкоцитами больных инсулиннезависимым сахарным диабетом / О.В. Груздева, И.В. Луста, Т.Е. Сулова, А.В. Ситожевский, Т.С. Федорова, О.Н. Огуркова, А.Ю. Тарбокова, Д.А. Измайлов // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2001. – приложение 1. – С.21-22.
5. Огуркова О.Н. Влияние инсулина на продукцию оксида азота полиморфноядерными лейкоцитами больных инсулиннезависимым сахарным диабетом в сочетании с ишемической болезнью сердца и артериальной гипертензией / О.Н. Огуркова // Сборник статей семинара молодых ученых “Актуальные вопросы клинической и экспериментальной кардиологии”. – Томск. – 2001. – С.18-19.
6. Хемилюминесцентные технологии в биохимической диагностике острого инфаркта миокарда / А.В. Ситожевский А.В., О.В. Груздева, О.Н. Огуркова, Т.Е. Сулова // Сборник тезисов “Острый коронарный синдром: проблемы патогенеза, профилактики, диагностики, классификации, терапии”. – Томск. – 22-23 марта 2001. – С.113.
7. Значение соотношения содержания С-пептида и инсулина при кардиоваскулярном дисметаболическом синдроме / Т.Е. Сулова, О.В. Груздева, Д.А. Измайлов, О.Н. Огуркова, Т.С. Федорова // Сборник тезисов “Актуальные вопросы клинической медицины”. – Северск – ноябрь 2001. – С.18
8. Огуркова О.Н. Взаимосвязь содержания С-пептида и инсулина с инсулинстимулированной продукцией NO моноцитами и полиморфноядерными лейкоцитами больных СД 2 типа в сочетании с ИБС и артериальной гипертензией / О.Н.

- Огуркова // Сборник статей семинара молодых ученых “Актуальные вопросы клинической и экспериментальной кардиологии”. – Томск. – 2002. – С.10-11.
9. Влияние нарушения липидного обмена на продукцию оксида азота моноцитами больных сахарным диабетом 2 типа в сочетании с ИБС и АГ / Т.Е. Сусллова, О.Н. Огуркова, А.В. Ситожевский, Т.С. Федорова // Сборник тезисов “Российский национальный конгресс кардиологов”. – Санкт-Петербург. – 8-11 октября 2002. – С.400.
10. Исследование влияния инсулина на продукцию оксида азота моноцитами больных с метаболическим сердечно-сосудистым синдромом / Т.Е. Сусллова, А.В. Ситожевский, О.Н. Огуркова, О.В. Груздева, Т.С. Федорова, Р.С. Карпов // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины – 2005. – Т.139, № 4. – С. 380-383.
11. Окислительная резистентность липопротеинов низкой плотности и ксилородзависимые процессы в моноцитах у больных с сочетанием артериальной гипертензии, сахарного диабета 2 типа и атеросклероза / Т.Е. Сусллова, О.В. Груздева, О.Н. Огуркова, О.А. Кошельская, Т.С. Федорова // Сборник тезисов первого съезда кардиологов Сибирского федерального округа – Томск. – 8-9 июня 2005. – С. 211.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АГ – артериальная гипертензия

АФК – активные формы кислорода

ИБС - ишемическая болезнь сердца

ИР – инсулинорезистентность

ИА – индекс атерогенности

МС – метаболический синдром

ПМЛ – полиморфноядерные лейкоциты

СД 2 типа – сахарный диабет 2 типа

ТАГ - триацилглицеролы

ХС-ЛПВП - холестерол липопротеинов высокой плотности

ХС-ЛПНП - холестерол липопротеинов низкой плотности

eNOS –конститутивная синтаза оксида азота

iNOS –индуцибельная синтаза оксида азота

NO - оксид азота

Автор выражает благодарность директору ГУ НИИ кардиологии Томского научного центра Сибирского отделения РАМН, академику РАМН Р.С. Карпову; с.н.с., к.м.н. Т.Е. Сусловой; н.с., к.м.н. О.В. Груздевой; н.с., к.м.н. С.В. Кремено; гл.специалисту Н.М. Желтоноговой за содействие в проведении настоящего исследования.