

**РОЛЬ АПОПТОЗ ИНДУЦИРУЮЩЕГО ФАКТОРА И ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ**

Азербайджанский Медицинский Университет (г. Баку, Азербайджан)

arif.efendiyev70@gmail.com

Работа является частью диссертации на соискание ученой степени доктора философии по биологии «Диагностическое значение определения биомаркеров апоптоза при острой ишемической болезни сердца» (государственный регистрационный номер 01114090, УОТ 61: 577.1).

**Вступление.** В начале XXI века на первое место по актуальности среди всех причин заболеваемости и смертности вышла проблема сердечно-сосудистых заболеваний. Значительную роль в этом сыграло изменение образа жизни, связанное с ограничением физической активности, повышением калорийности пищевых продуктов и постоянным ростом эмоционально-стрессовых нагрузок. В результате наблюдается повышение артериального давления, дислипидемия, сахарный диабет и ожирение. С 1988 г. после Бантинговской лекции Джералд Ривена взаимосвязанное сочетание данных патологий принято обозначать единым термином «метаболический синдром X» [5]. Каждый из вышеперечисленных факторов, изолированно или в совокупности, инициирует процесс апоптоза.

Апоптоз — строго регулируемый процесс делеции клеток, который играет важную роль в различных сердечно-сосудистых заболеваниях, таких как инфаркт миокарда, реперфузионное повреждение и сердечная недостаточность. Поскольку потеря кардиомиоцитов является наиболее важным фактором, определяющим заболеваемость и смертность пациентов, крайне важно понимание механизмов регуляции апоптотической передачи сигналов [1].

Апоптоз охарактеризован рядом различных типов механизмов, таких как внутренний или внешний путь или каспаза-зависимый против каспаза-независимого апоптоза. Наилучшим примером независимого от каспазы апоптоза является апоптоз индуцирующего фактора (AIF).

В сердце AIF вовлечен в апоптоз, индуцированный окислительным стрессом, реперфузией ишемии и сердечной недостаточностью [13].

**Цель исследования.** Целью данной работы было изучение маркера апоптоза (AIF) и окислительного стресса (оксида азота, тиолового статуса), а также показателей повреждения эндотелия сосудов — цистатина С и липидного спектра у больных с ХСН и выявление взаимосвязи между этими показателями.

**Объект и методы исследования.** В исследование включены 114 больных (мужчин и женщин) с хронической формой стенокардии (ХСН). Больные были разделены на 3 группы: I группа — 39 больных

ХСН, II группа — 41 больных ХСН и СД-2, а в III группе — 34 больных ХСН с метаболическим синдромом. Контрольную группу составили 10 здоровых доноров.

В период пребывания в клинике всем больным были проведены лабораторные и функциональные исследования, назначена антиангиальная и антиагрегатная терапия.

Исследование проведено в соответствии с Хельсинской декларацией 1975 года, пересмотренной в 1989 году в Гонконге.

Из биохимических показателей в плазме крови определены концентрации: общего холестерина (ОХС), ХС  $\alpha$ -липопротеинов, ХС  $\beta$ -липопротеинов, гликолизированного гемоглобина (HbA1c), глюкозы и триглицеридов. Как маркеры оксидативного стресса исследовали содержание оксида азота и тиолового статуса. Помимо этого, определяли концентрацию апоптоз индуцирующего фактора и цистатина С.

Биохимические показатели определяли с использованием наборов реактивов фирмы «Human» (Германия), содержание апоптоз индуцирующего фактора и цистатина С — с помощью коммерческих наборов фирмы «USCN Life Science Inc» (Китай), концентрацию оксида азота — с использованием коммерческого набора «R&D System», а тиолового статуса — набором фирмы «Immunidiagnostik». Статистический анализ проводили с помощью непараметрического критерия Уилкинсона (Манна-Уитни), различия считали значимыми при  $p < 0,05$ ,  $p < 0,001$ ,  $p < 0,01$ .

**Результаты исследования и их обсуждение.**

Полученные данные свидетельствуют о различиях средних значений липидного обмена при ХСН (**таблица 1**).

В контрольной группе уровень ХС составил  $2,85 \pm 0,21$  ммоль/л, а триглицеридов (ТГ)  $1,01 \pm 0,14$  ммоль/л. При сравнении средних величин у больных ХСН и ХСН с метаболическим синдромом и сахарным диабетом типа 2 выявлен рост обоих показателей. Так, концентрация ХС возрастала в I группе до  $4,51 \pm 0,23$  ммоль/л ( $p < 0,001$ ), а во II и III группах до  $5,25 \pm 0,33$  ммоль/л и  $5,47 \pm 0,27$  ммоль/л соответственно. Вместе с тем, холестерин  $\alpha$ -ЛП снижался на 36 % у больных I группы, на 45% у больных II группы, а в III группе — на 61 % относительно контроля. Наряду с этим, тогда как ХС  $\beta$ -ЛП повышался у больных в I группе на 45 %, во II группе — на 64 %, в III — в среднем на 94 % относительно контрольной группы. Наблюдаемая нами гиперхолестеринемия и гипер-

Биохимические показатели больных ХСН

Показатели	Контрольная группа (n=10)	Группа I (n=39)	Группа II (n=41)	Группа III (n=34)
Холестерол, ммоль/л	2,85 ± 0,21	4,51 ± 0,23***	5,25 ± 0,33***	5,47 ± 0,27***
Триглицериды, ммоль/л	1,01 ± 0,14	3,74 ± 0,37***	4,66 ± 0,24***	4,19 ± 0,29***
α-ЛП, ммоль/л	1,29 ± 0,16	0,83 ± 0,11*	0,72 ± 0,08**	0,50 ± 0,03***
β-ЛП, ммоль/л	2,49 ± 0,21	3,60 ± 0,26**	4,06 ± 0,35**	4,83 ± 0,18***
Глюкоза, ммоль/л	4,2 ± 0,2	5,1 ± 1,28*	7,3 ± 1,1**	4,1 ± 0,1
HbA1, %	5,5 ± 0,08	5,3 ± 0,01	6,7 ± 0,07*	5,4 ± 0,01

Примечание. \*p < 0,05 \*\* p < 0,01 \*\*\* p < 0,001 по сравнению с контролем.

β-липопротеинемия способствуют повреждению эндотелия сосудов вследствие атерогенеза. Установлено, что липопротеины высокой плотности, основная антиатерогенная фракция липопротеинов, защищают эндотелиальные клетки от апоптоза, тем самым обеспечивая важный и новый аспект своей антиатерогенной активности [3].

Маркеры оксидативного стресса, апоптоза и цистатина С у больных с ХСН

Показатели	Контрольная группа (n=10)	Группа I (n=39)	Группа II (n=41)	Группа III (n=34)
NO, ммоль/л	10,2 ± 0,4	13,7 ± 0,4***	23,4 ± 0,5***	21,4 ± 0,5***
Тиоловый статус, мкмоль/л	563,3 ± 18,1	502,7 ± 13,1*	464,5 ± 10,7*	471,4 ± 8,7*
AIF, нг/мл	0,94 ± 0,15	1,64 ± 0,2*	6,35 ± 0,55***	2,9 ± 0,24***
Цистатин С, мг/л	0,8 ± 0,01	1,1 ± 0,04	1,4 ± 0,07*	1,2 ± 0,06

Примечание. \*p < 0,05 \*\* p < 0,01 \*\*\* p < 0,001 по сравнению с контролем.

Концентрация ТГ в I группе увеличивалась в 3,7 раза, во II группе – в 4,6 раз и в III группе – в 4,1 раза относительно контрольной группы и соответствовала изменениям углеводного обмена, а именно глюкозы и гликолизированного гемоглобина. При ХСН СД-2 содержание глюкозы достигает 7,3 ± 1,1 ммоль/л, в то время как в I группе 5,1 ± 1,28 ммоль/л, а в III группе 4,1 ± 0,1 ммоль/л. Уровень HbA1 при ХСН СД-2 составил 6,7 ± 0,07%, а в I и III группах почти одинаков и в среднем составлял 5,4 ± 0,01%.

Результаты средних значений апоптоз индуцирующего фактора, оксида азота, тиолового статуса и цистатина С у больных ХСН отображены в **таблице 2**.

Известно, что каспаза-независимый AIF-опосредованный путь играет критическую роль в гипертрофии кардиомиоцитов. Высокое содержание глюкозы увеличивает апоптоз-активность каспазы 3 и способствует высвобождению фактора апопто-

за (AIF) [10,12]. Так, в наших исследованиях в группе больных с сахарным диабетом уровень AIF увеличивался в 6,8 раз, а в I группе – в 1,7 раза и в III группе – в 3,1 раза соответственно по сравнению с контрольной группой.

Нарушение метаболизма NO играет главную роль в дисфункции эндотелия, являющейся неотъемлемой составляющей патогенетического механизма ХСН.

При контроле 10,2 ± 0,4 ммоль/л в исследуемых группах оксид азота увеличивался до следующих величин: 13,7 ± 0,4 ммоль/л в I группе, 23,4 ± 0,5 ммоль/л во II группе, 21,4 ± 0,5 ммоль/л в III группе.

Эти изменения могут приводить к ухудшению тканевой перфузии миокарда, эндотелиальной дисфункции сосудов, их вазоконстрикции, повышению общего периферического сопротивления сосудов и дальнейшему прогрессированию ХСН.

Таблица 2.

По данным ряда исследований по изучению метаболизма NO при ХСН, отмечается, что высокие уровни нитритов-нитратов при тяжелой ХСН определялись одновременно с дефицитом эндотелиальная синтазы eNOS [8].

Излишнее количество NO вначале выполняет компенсаторную функцию, направленную на улучшение перфузии тканей. В дальнейшем происходит трансформация реакции в патологическую с индукцией апоптоза, активацией оксидативного стресса, деструктивными процессами, усилением дисфункции миокарда [4].

Выявленные нарушения тиолового статуса также отражают степень оксидативного стресса у больных ХСН. В I группе наблюдалось снижение на 11%, тогда как в II и III группах – на 17% по сравнению с контрольной группой.

Снижение уровня тиолового статуса было связано с наличием и тяжестью ХСН. Этот результат указывает на то, что уменьшение тиолов может быть важным фактором в развитии ХСН, так как они способны блокировать апоптоз [9,11].

Также для характеристики осложнений ХСН мы исследовали уровень цистатина С и обнаружили, что наибольшее увеличение отмечалось во II группе в 1,8 раза, в то время как в I и III группах показатель увеличился в 1,4 и 1,5 раза соответственно по сравнению с контрольной группой. В литературе показано, что повышенные уровни цистатина С независимо от других факторов связаны с тяжестью индуцируемой ишемии [2]. В норме именно цистатин С, будучи ингибитором цистеиновых протеиназ,

предотвращает развитие атеросклеротических повреждений.

Однако при атеросклерозе повышенный уровень цистатина С может свидетельствовать об атеросклеротических бляшках большего размера [6]. Цистатин С у пациентов с СД-2 может служить надежным предиктором развития сердечно-сосудистых осложнений. Например, он позволяет прогнозировать появление артериальной гипертензии у больных с СД-2 и, в какой-то мере и оценивать прогрессию коронарного атеросклероза у таких пациентов [7].

**Вывод.** Таким образом, мы предполагаем, что окислительный стресс и апоптоз тесно взаимосвязаны и оказывают влияние на прогрессирование ХСН и могут служить маркерами осложнений.

**Перспективы дальнейших исследований.** Считается возможным использование исследуемых показателей для возможного прогнозирования осложнения при ХСН у больных при СД-2 и метаболическом синдроме как маркера повреждения миокарда.

### Литература

1. Berezikova E.N. Vliyanie apoptoza na techenie khronicheskoy serdechnoy nedostatochnosti / E.N. Berezikova, M.G. Pustovetova, S.N. Shilov [et al.] // Patologiya krovoobrashcheniya i kardiokhirurgiya. — 2012. — № 4. — S. 55-58.
2. Villeval'de S.V. Tsistatin С kak novyi marker narusheniya funktsii pochetk i serdechno-sosudistogo riska / S.V. Villeval'de, N.I. Gudgalis, Zh.D. Kobalava // Kardiologiya. — 2010. — № 6. — S. 78-82.
3. Gasanov A.G. Apoptoz i serdechnaya nedostatochnost' / A.G. Gasanov // Pediatricheskaya farmakologiya. — 2009. — V. 6, № 4. — S. 30-34.
4. Lapshina L.A. Znachenie opredeleniya nitritov – nitratov kak markerov disfunktsii endotelii pri serdechno-sosudistoy patologii / L.A. Lapshina, P.G. Kravchun, A.Yu. Titova, O.V. Glebov // UKR. MED. Chasopis. — 2009. — S. 1-5.
5. Mitchenko E.I. Metabolicheskii sindrom, diabet i serdechno-sosudistye zabolevaniya / E.I. Mitchenko // Rukovodstvo po kardiologii (pod red. V.N. Kovalenko). — K.: MORION, 2008. — S. 228-243.
6. Reznichenko N.E. Diagnosticheskoe i prognosticheskoe znachenie opredeleniya urovnya tsistatina С, mozgovogo natriyureticheskogo peptida i eritropoetina u bol'nykh s serdechno-sosudistoy patologiei: avtoreferat dissertatsii na soiskaniye uchenoy stepeni kandidata meditsinskikh nauk / N.E. Reznichenko. — Moskva, 2012.
7. Blok I.M. The role of cystatin C as a biomarker for prognosis in pulmonary arterial hypertension due to congenital heart disease / I.M. Blok, A.C. van Riel, M.J. Schuurin, R.H. de Bruin-Bon, A.P. van Dijk, E.S. Hoendermis [et al.] // Int J Cardiol. — 2016 Apr. — Vol. 209. — P. 242-247.
8. Chirinos J.A. Heart failure, left ventricular remodeling, and circulating Nitric Oxide metabolites / J.A. Chirinos, S.R. Akers, L. Trieu, H. Ischiropoulos, P.T. Doulias [et al.] // J Am Heart Assoc. — 2016 Oct. — Vol. 5 (10). — P. 1-8.
9. Comini M.A. Measurement and meaning of cellular thiol: disulfide redox status / M.A. Comini // Free Radic Res. — 2016. — Vol. 50 (2). — P. 246-271.
10. Feng B. Apoptosis of hypertrophic cardiomyocytes stimulated by hypoxia-reoxygenation is partially mediated by apoptosis-inducing factor / B. Feng, X.B. Zhou, X. Yang, Z.L. Ye, Z.Y. He // Sheng Li Xue Bao. — 2006 Dec. — № 25. — Vol. 58 (6). — P. 599-605.
11. Koning A.M. Serum free thiols in chronic heart failure / A.M. Koning, W.C. Meijers, A. Pasch, H.G. Leuvenink, A.R. Frenay, M.M. Dekker, M. Feelisch, R.A. de Boer, H. van Goor // Pharmacol Res. — 2016 Sep. — Vol. 111. — P. 452-458.
12. Mishiro K. Diabetes mellitus aggravates hemorrhagic transformation after ischemic stroke via mitochondrial defects leading to endothelial apoptosis / K. Mishiro, T. Imai, S. Sugitani, A. Kitashoji, Y. Suzuki, T. Takagi, H. Chen, Y. Oumi, K. Tsuruma, M. Shimazawa, H. Hara // LoS One. — 2014 Aug. — Vol. 9 (8). — P. 1-13.
13. Nam-Ho Kim Apoptosis in Cardiovascular Diseases: Mechanism and Clinical Implications / Nam-Ho Kim, Peter M. Kang // Korean Circ J. — 2010 Jul. — Vol. 40 (7). — P. 299-305.

УДК 61: 616, 616-005, 616-005.8

### РОЛЬ АПОПТОЗ ІНДУКУЮЧОГО ЧИННИКА І ОКИСНОГО СТРЕСУ ПРИ ХРОНІЧНІЙ СЕРЦЕВІЙ НЕДОСТАТНОСТІ

Мамедова Ф. І., Ефендієв А. М.

**Резюме.** Метою даної роботи є вивчення маркера апоптозу і окисного стресу, а також показників ушкодження ендотелію цистатина С і ліпідного обміну у хворих з ХСН і виявлення взаємозв'язку між цими показниками. У дослідження включені 114 хворих (чоловіків і жінок) з хронічною серцевою недостатністю (ХСН). Хворі були розділені на 3 групи: I група – 39 хворих ХСН, II група – 41 хворих ХСН і СД-2, а в III групі – 34 хворих ХСН з метаболічним синдромом.

Отримані нами результати дають можливість припускати, що окислювальний стрес і апоптоз тісно взаємопов'язані і впливають на прогресування ХСН і досліджувані показники можуть служити маркерами ускладнень.

**Ключові слова:** апоптоз, метаболічний синдром, цукровий діабет, апоптоз індукуючий фактор, цистатин С, оксид азоту, тиоловий статус.

УДК 61: 616, 616-005, 616-005.8

### РОЛЬ АПОПТОЗ ІНДУЦІРУЮЩОГО ФАКТОРА І ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА ПРИ ХРОНІЧЕСЬОЇ СЕРДЕЧНОЇ НЕДОСТАТНОСТІ

Мамедова Ф. І., Ефендієв А. М.

**Резюме.** Целью данной работы является изучение маркера апоптоза и окислительного стресса, а также показателей повреждения эндотелия цистатина С и липидного обмена у больных с ХСН и выявление взаимосвязи между этими показателями. В исследование включены 114 больных (мужчин и женщин) с хронической сердечной недостаточностью (ХСН). Больные были разделены на 3 группы: I группа – 39 больных ХСН, II группа – 41 больных ХСН и СД-2, а в III группе – 34 больных ХСН с метаболическим синдромом.

Полученные нами результаты дают возможность предполагать, что окислительный стресс и апоптоз тесно взаимосвязаны и оказывают влияние на прогрессирование ХСН и исследуемые показатели могут служить маркерами осложнений.

**Ключевые слова:** апоптоз, метаболический синдром, сахарный диабет, апоптоз индуцирующий фактор, цистатин С, оксид азота, тиоловый статус.

UDC 61: 616, 616-005, 616-005.8

### THE ROLE OF APOPTOSIS INDUCING FACTOR AND OXIDATIVE STRESS IN CHRONIC CARDIAC DISEASE

Mamedova F. I., Efendiyev A. M.

**Abstract.** The purpose of this work is to study the marker of apoptosis and oxidative stress, as well as indicators of endothelial damage – cystatin C and lipid metabolism in patients with congestive heart failure (CHF), and to identify the relationship between these indicators. The study included 114 patients (men and women) with CHF. Patients were divided into 3 groups: group I – 39 patients with CHF, group II – 41 patients with CHF and DM-2, and group III – 34 patients with CHF with metabolic syndrome. The control group consisted of 10 healthy donors.

The research was conducted in compliance with the Declaration of Helsinki (1975) which was revised in 1989 in Hong Kong.

In all patients biochemical parameters of blood plasma were determined, as well as markers of oxidative stress and cystatin C. From biochemical indicators, the concentrations of total cholesterol (TC),  $\alpha$ -lipoprotein cholesterol,  $\beta$ -lipoprotein cholesterol, glycosylated hemoglobin (HbA1c), glucose and triglycerides were measured. The content of nitric oxide and thiol status was investigated as markers of oxidative stress. In addition, concentrations of apoptosis inducing factor and cystatin C were determined.

Biochemical indicators of total cholesterol (TC),  $\alpha$ -lipoprotein cholesterol,  $\beta$ -lipoprotein cholesterol, glycosylated hemoglobin (HbA1c), glucose and triglycerides were determined using "Human" reagent kits (Germany). Concentrations of apoptosis inducing factor and cystatin C were measured with commercial sets from "USCN Life Science Inc" (China), nitric oxide concentration – using "R&D System" kit, and thiol status – with the help of kit from "Immunodiagnostik" company. Statistical analysis was performed using the Wilcoxon non-parametric criterion (Mann-Whitney test), the differences were considered significant at  $p < 0,05$ ,  $p < 0,001$ ,  $p < 0,01$ .

When comparing the average values in patients with CHF and CHF with metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus, concentrations of cholesterol and triglycerides were found to increase in all studied groups relative to control group. At the same time,  $\alpha$ -LP cholesterol decreased in all groups with respect to control. An increase in all groups relative to control was observed for  $\beta$ -LP cholesterol. The hypercholesterolemia and hyper- $\beta$ -lipoproteinemia observed by us contribute to damage of the vascular endothelium due to atherogenesis. It has been established that high-density lipoproteins, the main anti-atherogenic fraction of lipoproteins, protect endothelial cells from apoptosis, thereby providing an important and new aspect of their anti-atherogenic activity.

Caspase-independent AIF-mediated pathway plays a critical role in the hypertrophy of cardiomyocytes. A high concentration of glucose increases the apoptosis activity of caspase 3 and promotes the release of the apoptosis factor (AIF). In our studies, the AIF level increased in all groups compared with the control group.

The disturbance of NO metabolism plays a major role in endothelial dysfunction, which is an integral part of the pathogenetic mechanism of CHF. The nitric oxide increased in all studied groups relative to control. Excessive amounts of NO initially perform a compensatory function aimed at improving tissue perfusion. Further it leads to activation of oxidative stress, apoptosis and increased myocardial dysfunction.

The revealed violations of thiol status also reflect the degree of oxidative stress in patients with CHF. In all studied groups, there was a decrease in this indicator compared to the control group. The decrease in the level of thiol status was due to the presence and severity of CHF. This result indicates that a decrease in thiols can be an important factor in the development of CHF, since they are capable of blocking apoptosis.

To characterize the complications of CHF, the level of cystatin C was examined. An increase in this indicator was revealed in all studied groups, compared to control. Elevated levels of cystatin C, independently of other factors, are associated with the severity of induced ischemia. Normally, cystatin C, an inhibitor of cysteine proteinases, prevents the development of atherosclerotic lesions. Cystatin C in patients with diabetes mellitus-2 can serve as a reliable predictor of the development of cardiovascular complications.

Our data allow to assume that oxidative stress and apoptosis are closely interrelated and influence the progression of CHF and that the studied indicators can serve as markers of complications.

**Keywords:** apoptosis, metabolic syndrome, diabetes mellitus, apoptosis inducing factor, cystatin C, nitric oxide, thiol status.

*Рецензент – проф. Скрипник І. М.*

*Стаття надійшла 10.06.2017 року*