

## Метаболіти оксиду азоту – біомаркери «метаболическої пам'яті» у хворих на позагоспітальну пневмонію і діабетичну ангіопатію на тлі цукрового діабету 2 типу та у хворих на ревматоїдний артрит жінок постменопаузального періоду

Комаревцева І.О.<sup>\*</sup>, Ігнатова А.Ю., Журба О.А., Глебова Т.М.

ДЗ «Луганський державний медичний університет», м. Рубіжське, Україна

<sup>\*</sup>E-mail: kialdmu@ukr.net

### Ключові слова:

- метаболіти оксиду азоту
- ендокринна патологія

### Анотація

Метою дослідження було визначення рівню метаболітів оксиду азоту ( $\text{NO}_x$ ), як одного з показників «метаболическої пам'яті» у хворих на цукровий діабет 2 типу, позалікарняну пневмонію і позалікарняну пневмонію в поєднанні з цукровим діабетом 2 типу, діабетичну ангіопатію, ревматоїдний артрит у жінок постменопаузального періоду. Для визначення нітритів використовували діазотування з урахуванням реакції Гресса. Нітрати відновлювали до нітритів, з наступним діазотуванням. Таким чином, отримували сумарне значення  $\text{NO}_2^- \text{NO}_3^-$  в пробі ( $\text{NO}_x$ ). Встановлений нами рівень метаболітів оксиду азоту ( $\text{NO}_x$ ) в сировотці крові хворих на цукровий діабет 2 типу, позалікарняну пневмонію і позалікарняну пневмонію в поєднанні з цукровим діабетом 2 типу, діабетичну ангіопатію, ревматоїдний артрит у жінок постменопаузального періоду свідчить про те, що дерегуляція у системі оксиду азоту при вивчених захворюваннях є проявом та маркером «метаболическої пам'яті», а саме, довготривалого впливу не тільки гіперглікемії при цукровому діабеті, а і гіпоестрогенемії, дисбалансу естрогенів-андрогенів у жінок в умовах менопаузи.

## Вступ

Феномен гіперглікемічної «метаболическої пам'яті» ускладнень цукрового діабету відноситься до спостереження, що пацієнти з діабетом схильні до розвитку пов'язаних з діабетом ускладнень через ранню гіперглікемію, навіть якщо були вжиті ефективні заходи для контролю рівня глюкози в крові та підтримки його в межах нормального рівня на пізнішій стадії хвороби. Основні механізми «метаболическої пам'яті» включають ряд патогенних факторів, пов'язаних з діабетичними ускладненнями, таких як кінцеві продукти глікування, окислювальний стрес, запалення та епігенетичні модифікації [1]. Механізми, що лежать в основі клітинної «метаболическої пам'яті», викликані високим вмістом глюкози, залишаються незрозумілими. Велика кількість клінічних досліджень показали, що цукровий діабет пов'язаний із вищим, ніж зазвичай, окислювальним стресом. Теж саме спостерігається у жінок з віком, а саме у постменопаузальному періоду. У дослідженнях на людях було документально підтверджено, що ендотеліальні клітини при діабеті не здатні продукувати достатню кількість оксиду азоту ( $\text{NO}$ ) і не можуть розслабитися у відповідь на ендотелій-залежні вазорелаксанти (наприклад, ацетилхолін, брадикінін) [2].

Терміном «оксид азоту» позначається відновлена форма монооксиду азоту (NO) з періодом напіврозпаду від 2 до 30 с. Його стабільними кінцевими метаболітами є нітрити (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) та нітрати (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Сума нітриту та нітрату зазвичай використовується для кількісної оцінки біодоступності NO in vivo [3]. Його дефіцит призводить до гіперреактивності дихальних шляхів [4] та ендотеліальної дисфункції [5].

Метою дослідження було визначення рівню метаболітів оксиду азоту (NO<sub>x</sub>), як одного з показників «метаболічної пам'яті» у хворих на цукровий діабет 2 типу, позалікарняну пневмонію і позалікарняну пневмонію в поєднанні з цукровим діабетом 2 типу, діабетичну ангіопатію, ревматоїдний артрит у жінок постменопаузального періоду.

## Матеріали та методи

Дослідження проводилися на базі міської та районної лікарні м. Рубіжне, м. Кременна, м. Біловодськ Луганської області. У дослідження були включені: 82 – здорових донора (47 жінок і 35 чоловіків); 70 хворих на цукровий діабет 2 типу (37 жінок і 33 чоловіка); 60 хворих на позалікарняну пневмонію (30 жінок і 30 чоловіків); 36 хворих на позалікарняну пневмонію в поєднанні з цукровим діабетом 2 типу (27 жінок і 15 чоловіків); 13 хворих жінок на ревматоїдний артрит (АЦЦП+) постменопаузального періоду; 26 хворих на діабетичну ангіопатію нижніх кінцівок.

Відповідно до положень Гельсінської декларації Всесвітньої медичної асоціації останнього перегляду, у всіх хворих до моменту включення в дослідження було отримано інформована згода.

Матеріалом для дослідження стала периферична кров з ліктьової вени пацієнтів та здорових донорів. Для проведення аналізу метаболітів оксиду азоту ми розробили методику, що дозволяє визначати вміст нітрит- та нітрат-іонів в одній і тій же пробі [7]. Для визначення нітритів використовували діазотування з урахуванням реакції Гресса. Нітрати відновлювали до нітритів, з наступним діазотуванням. Таким чином, отримували сумарне значення NO<sub>2</sub><sup>-</sup> NO<sub>3</sub><sup>-</sup> в пробі (NO<sub>x</sub>). Нітрити визначали спектрофотометрично.

Статистичний та графічний аналіз проводили за допомогою STATISTICA 7.0 (програму забезпечення StatSoft, trial period) та за допомогою GraphPad Prism version 9.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA, trial period). У разі підпорядкування розподілу ознаки закону нормального розподілу дані безперервні параметричних змінних представляли у вигляді середньої величини (M) і стандартного відхилення (SD). Статистично значуща відмінність між альтернативними кількісними параметрами з розподілом, відповідним нормальному закону, оцінювали за допомогою t-критерію Стьюдента для непарних вибірок, який призначений для порівняння середніх величин кількісних ознак в двох незалежних групах. Відмінності в усі випадках вважали статистично значущими при  $p < 0,05$ .

## Результати та обговорення

Рівень метаболітів оксиду азоту (NO<sub>x</sub>) в сировотці крові (NO<sub>3</sub> + NO<sub>2</sub>) у пацієнтів з позалікарняною пневмонією і жінок, і чоловіків був вищим (M ± SD 45,1 ± 4,66; 50,44 ± 5,52 відповідно) мкмоль/л порівняно з тотожними групами здорових донорів (M ± SD 23,11 ± 4,45; 26,91 ± 2,92 відповідно) мкмоль/л, той час як у пацієнтів з позалікарняною пневмонією, асоційованою з цукровим діабетом 2 типу, він був значно вище (M ± SD 42,65 ± 4,02; 42,78 ± 3,81 відповідно) мкмоль/л, але різниці у показниках жінок і чоловіків у цих групах не спостерігалось. При цьому у хворих на цукровий діабет 2 типу і жінок, і чоловіків показник NO<sub>x</sub> був значно нижче, ніж у хворих на позалікарняну пневмонію і позалікарняну пневмонію, асоційовану з цукровим діабетом 2 типу і не мав гендерної різниці (M ± SD 32,35 ± 4,6; 33,52 ± 3,91 відповідно) мкмоль/л (Таблиця 5.1).

В умовах гіперглікемії знижується швидкість дифузії NO до нижчих гладком'язових клітин, зменшується доступність L-аргініну – попередника NO, посилюється вільнорадикальна деструкція NO та підвищується інактивація інших вазодилататорів. Його дефіцит призводить до гіперреактивності дихальних шляхів та ендотеліальної дисфункції [6]. Але дослідження останніх двох десятиліть, в тому числі і наші попередні, показують, що NO може мати протилежні біологічні ефекти в залежності від рівня індукції NO, просторово-часового режиму дії NO, внутрішньоклітинних мішеней NO та інших екологічних та патофізіологічних умов [6, 7]. Навіть це ми спостерігаємо у хворих на позалікарняну пневмонію і позалікарняну пневмонію в поєднанні з цукровим діабетом 2, де провідну роль, поряд із ендотеліальною дисфункцією, грає запалення, на що і реагує система оксиду азоту.

Табл. 5.1.: Рівень метаболітів оксиду азоту (NO<sub>x</sub>) в сировотці крові обстежених хворих.

Групи обстежених	Valid N	NO <sup>x</sup> , мкмоль/л			p-value
		Mean	Std.Dev.	Std. Error	
здорові жінки	47	23,11	4,45	0,65	
здорові чоловіки	35	26,91	2,92	0,49	p = 0,0000001 <sup>7</sup>
жінки хворі на Т2ЦД	37	32,35	4,6	0,76	p = 0,0000001 <sup>1</sup>
чоловіки хворі на Т2ЦД	33	33,52	3,91	0,9	p = 0,0000001 <sup>3</sup> p > 0,05 <sup>7</sup>
жінки хворі на пневмонію	30	45,1	4,66	0,85	p = 0,0000001 <sup>1</sup>
чоловіки хворі на пневмонію	30	50,44	5,52	1,01	p = 0,0000001 <sup>3</sup> p = 0,0000001 <sup>7</sup>
жінки хворі на пневмонію+Т2ЦД	27	42,65	4,02	0,77	p = 0,0000001 <sup>1</sup> p = 0,038654 <sup>2</sup> p = 0,0000001 <sup>5</sup> p = 0,0000001 <sup>3</sup>
чоловіки хворі на пневмонію +Т2ЦД	15	42,78	3,81	0,98	p = 0,000019 <sup>4</sup> p = 0,0000001 <sup>6</sup> p > 0,05 <sup>7</sup>
чоловіки хворі на діабетичну ангіопатію	26	54,32	6,7	1,76	p = 0,0000001 <sup>3</sup> p = 0,0000001 <sup>6</sup>
жінки у постменопаузальному періоді хворі ревматоїдний артрит (АЦЦП+)	13	67,13	7,43	1,86	p = 0,0000001 <sup>1</sup> p = 0,0000001 <sup>5</sup>

<sup>1</sup> - p - за t-критерієм Стьюдента - значні відмінності між контрольною (здорові жінки) та групами хворих (жінки)

<sup>2</sup> - p - між групою пневмонії (жінки) та іншими групами випробувань (жінки)

<sup>3</sup> - p - між контрольною (здорові чоловіки) та групами хворих (чоловіки)

<sup>4</sup> - p - між групою пневмонії (чоловіки) та іншими групами випробувань (чоловіки)

<sup>5</sup> - p - між групами жінок хворих на Т2ЦД та іншими групами випробувань (жінки)

<sup>6</sup> - p - між групами чоловіків хворих на Т2ЦД та іншими групами випробувань (чоловіки)

<sup>7</sup> - p - між групами жінок та групами чоловіків

У хворих чоловіків на діабетичну ангіопатію нижніх кінцівок рівень метаболітів оксиду азоту (NO<sub>x</sub>) в сировотці крові (NO<sub>3</sub> + NO<sub>2</sub>) був вищим майже у 2 рази (M ± SD 54,32 ± 6,7) мкмоль/л порівняно з групою здорових чоловіків (M ± SD 26,91 ± 2,92) мкмоль/л (Таблиця 5.1).

Отримані результати показують, що високий рівень NO у плазмі у пацієнтів із діабетичною ангіопатією нижніх кінцівок пов'язаний зі зниженням ендотелій-залежного та незалежного збільшення кровотоку в мікросудинному руслі. При діагностичних та терапевтичних підходах до діабетичної ангіопатії нижніх кінцівок слід враховувати надмірну кількість NO-індукованого нітрозативного стресу при запальному стані, що може бути причиною судинної дисфункції [8].

Значне збільшення ендогенного синтезу NO, яке ми встановили у хворих жінок на ревматоїдний артрит в активній фазі (АЦЦП+) у постменопаузальному періоді (M ± SD 67,13 ± 7,43) мкмоль/л порівняно з групою здорових жінок (M ± SD 23,11 ± 4,45) мкмоль/л (Таблиця), пов'язано не тільки з тим, що запалений суглоб при ревматоїдному артриті є переважним джерелом NO, а й з патогенетичним фоном постменопаузальному періоду – зниження секреції естрогенів у жіночому організмі. Або одним із важливих негеномних ефектів естрогенів є активація під їх впливом NO-синтетази та утворення оксиду азоту в коронарних судинах, різних типів клітин організму (кісткові, м'язові, секреторні, нервові, сполучної тканини та крові), що забезпечує профілактику розвитку у жінок різноманітних захворювань [9, 10].

## Висновки.

Встановлений нами рівень метаболітів оксиду азоту (NO<sub>x</sub>) в сировотці крові хворих на цукровий діабет 2 типу, позалікарняну пневмонію і позалікарняну пневмонію в поєднанні з цукровим діабетом 2 типу, діабетичну ангіопатію, ревматоїдний артрит у жінок постменопаузального періоду свідчить про те, що:

1. підвищений рівень NO<sub>x</sub> не є тимчасовим показником реакції системи оксиду азоту на запале-

ння, оксидативний стрес, або резорбцію тканин суглобу, які характерні для досліджених нами нозологій;

2. дерегуляція у системі оксиду азоту при вивчених захворюваннях є проявою та маркером «метаболічної пам'яті», а саме, довготривалого впливу не тільки гіперглікемії при цукровому діабеті, а і гіпоестрогенемії, дисбалансу естрогенів-андрогенів у жінок в умовах менопаузи.

## Література

- [1] Zheng W, Guo J, Liu Z-S. Effects of metabolic memory on inflammation and fibrosis associated with diabetic kidney disease: an epigenetic perspective. *Clinical Epigenetics* [Internet]. 2021 Apr 21;13(1). Available from: <https://doi.org/10.1186/s13148-021-01079-5>
- [2] Avogaro A, Fadini GP, Gallo A, Pagnin E, de Kreutzenberg S. Endothelial dysfunction in type 2 diabetes mellitus. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* [Internet]. 2006 Mar;16:S39–S45. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2005.10.015>
- [3] Pitocco D, Zaccardi F, Di Stasio E, Romitelli F, Santini SA, Zuppi C, et al. Oxidative Stress, Nitric Oxide, and Diabetes. *The Review of Diabetic Studies* [Internet]. 2010;7(1):15–25. Available from: <https://doi.org/10.1900/RDS.2010.7.15>
- [4] Scott J, Duong M, Young A, Subbarao P, Gauvreau G, Grasemann H. Asymmetric Dimethylarginine in Chronic Obstructive Pulmonary Disease (ADMA in COPD). *International Journal of Molecular Sciences* [Internet]. 2014 Apr 10;15(4):6062–6071. Available from: <https://doi.org/10.3390/ijms15046062>
- [5] Shivkar RR. Ratio Of Serum Asymmetric Dimethyl Arginine (ADMA)/ Nitric Oxide in Coronary Artery Disease patients. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* [Internet]. 2014; Available from: <https://doi.org/10.7860/JCDR/2014/7849.4665>
- [6] Бондаренко ОН, Галстян ГР, Анциферов МБ. Биологическая роль оксида азота при сахарном диабете. *Сахарний діабет*. 2002;2:56-63.
- [7] Комаревцева ИА, Орлова ЕА, Благодаренко ЕА. Бифункциональный характер действия оксида азота в ткани почек при активации апоптоза. *Укр. біохім. ж.* 2002;74(4а, додаток 1):47.
- [8] Akkoca M, Usanmaz SE, Koksoy C, Bengisun U, Demirel-Yilmaz E. Plasma nitric oxide level is correlated with microvascular functions in the peripheral arterial disease. *CH* [Internet]. 2017 Feb 27;65(2):151–62. Available from: <https://doi.org/10.3233/CH-16143>
- [9] Li H, Wan A. Apoptosis of Rheumatoid Arthritis Fibroblast-Like Synoviocytes: Possible Roles of Nitric Oxide and the Thioredoxin 1. *Mediators of Inflammation* [Internet]. 2013;2013:1–8. Available from: <https://doi.org/10.1155/2013/953462>
- [10] Perl A. Review: Metabolic Control of Immune System Activation in Rheumatic Diseases. *Arthritis & Rheumatology* [Internet]. 2017 Nov 8;69(12):2259–2270. Available from: <https://doi.org/10.1002/art.40223>