

**УРОВНИ МАРКЕРНЫХ ЛИЗОСОМАЛЬНЫХ ГИДРОЛАЗ У МУЖЧИН
РАЗЛИЧНОГО ВОЗРАСТА С ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА
ЧЕРЕЗ ПРИЗМУ УРОВНЯ ПОЛОВЫХ СТЕРОИДОВ****О.В. Цыганкова¹, З.Г. Бондарева¹, Ю.И. Рагино², К.Ю. Николаев²,
Д.Ю. Платонов³, В.Н. Максимов², М.Г. Пустоветова¹**¹*ГБОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России
630091, г. Новосибирск, Красный просп., 52*²*ФГБНУ «НИИ терапии и профилактической медицины»
630089, г. Новосибирск, ул. Бориса Богаткова, 175/1*³*ГБОУ ВПО «Тверская государственная медицинская академия» Минздрава России
170100, г. Тверь, ул. Советская, 4*

Цель исследования: оценить сывороточные концентрации трех маркерных лизосомальных гидролаз (катепсина D, кислой фосфатазы (КФ) и кислой ДНКазы (кДНКазы)) у мужчин с ишемической болезнью сердца (ИБС) в зависимости от уровней тестостерона (Т), эстрадиола (Е2), возраста и изучить их ассоциации с антропометрическими, инсулин-глюкозными параметрами, липидными и нелипидными биомаркерами атеросклероза. В исследование включен 161 мужчина в возрасте 35–65 лет, перенесший инфаркт миокарда (ИМ) за не менее 30 дней до обследования. Медиана возраста составила 53,1 года (25 и 75 % процентиля: 40,1 и 59,4 года). Пациенты разделялись на возрастные группы: 35–55 и 56–65 лет (первая и вторая группы соответственно), а также на группы по уровням половых гормонов: $12 < T \leq 12$ нмоль/л и $0,194 \leq E2 < 0,194$ нмоль/л при двукратном определении. По результатам сравнительного и корреляционного анализов у мужчин 35–55 лет нормальные уровни Т и Е2 были сопряжены с более высокими сывороточными концентрациями лизосомальных ферментов, чем у пациентов с андропенией и гиперэстрогенией, а в более старшем возрасте, напротив, андропения и гиперэстрогения сопровождалась лабилизацией энзимов лизосом. У мужчин, больных ИБС, первой возрастной группы по данным многофакторного анализа три изучаемых лизосомальных фермента обратно зависели от Е2 ($p < 0,001$) и ряда проатерогенных параметров, в том числе общего холестерина (ОХС), холестерина липопротеидов низкой плотности (ХС ЛПНП), триглицеридов (ТГ), окружности бедер (ОБ), индекса массы тела (ИМТ), интерлейкина (ИЛ)-1 β ($p < 0,001-0,01$), а в 56–65 лет непосредственное влияние половых стероидов на уровни лизосомальных гидролаз отсутствовало, катепсин D и КФ прямо определялись липидными, нелипидными маркерами атерогенеза (ТГ, высокочувствительным С-реактивным белком (вчСРБ), малоновым диальдегидом (МДА-30), окружностью талии (ОТ), индексом НОМА-R, $p < 0,001-0,05$) и обратно – холестерином липопротеидов высокой плотности (ХС ЛПВП) ($p < 0,001$). Кислая ДНКазы в обеих возрастных группах зависела от параметров, вовлеченных в инсулин-глюкозный гомеостаз (ИМТ, ОТ, ТГ, индекс НОМА-R, $p < 0,001-0,05$), что может

Цыганкова Оксана Васильевна – канд. мед. наук, доцент кафедры неотложной терапии с эндокринологией и профпатологией ФПК и ППВ, e-mail: oksana_c.nsk@mail.ru

Бондарева Зоя Геннадьевна – д-р мед. наук, проф. кафедры неотложной терапии с эндокринологией и профпатологией ФПК и ППВ, e-mail: elena.fedor@mail.ru

Рагино Юлия Игоревна – д-р мед. наук, проф., зав. лабораторией клинических биохимических и гормональных исследований терапевтических заболеваний, e-mail: ragino@mail.ru

Николаев Константин Юрьевич – д-р мед. наук, проф., зав. лабораторией неотложной терапии, e-mail: nikolaevky@yandex.ru

Платонов Дмитрий Юрьевич – д-р мед. наук, проф. кафедры госпитальной терапии и профессиональных болезней, главный кардиолог Министерства здравоохранения Тверской области, e-mail: diplato64@mail.ru

Максимов Владимир Николаевич – д-р мед. наук, проф., зав. лабораторией молекулярно-генетических исследований терапевтических заболеваний, e-mail: medic11@mail.ru

Пустоветова Мария Геннадьевна – д-р мед. наук, проф., зав. центральной научно-исследовательской лабораторией, e-mail: patophysiol@mail.ru

© Цыганкова О.В., Бондарева З.Г., Рагино Ю.И., Николаев К.Ю., Платонов Д.Ю., Максимов В.Н.,
Пустоветова М.Г., 2015

отражать ключевую роль эндонуклеазы в акселерации процессов катаболизма, активизирующихся при различных вариантах нарушений углеводного обмена, вплоть до программируемой клеточной гибели. Подобная динамика трех маркерных лизосомальных энзимов демонстрирует различный вклад лизосомальной цитотоксичности в развитие ИБС у мужчин в возрастных группах 35–55 и 56–65 лет.

Ключевые слова: тестостерон, эстрадиол, мужчины, лизосомальные ферменты, ишемическая болезнь сердца.

В клеточном метаболизме лизосомам принадлежит центральное место, они участвуют в процессах фагоцитоза, иммуногенеза, реализации гормонального эффекта, репарации и реконструкции внутриклеточных структур, катаболизме вне- и внутриклеточных белков, биосинтезе и секреции ряда гормонов, в процессах воспаления, атерогенеза, метаморфоза, дифференцировки, деления и старения клеток [1, 2]. Существование постоянной связи лизосом с внутренней средой организма, опосредованной механизмами эндоцитоза, экзоцитоза и диацитоза, позволяет смотреть на лизосомально-вакюолярный аппарат клеток как на сложную высокоспециализированную систему организма, имеющую представительство во всех тканях.

Количество уже известных лизосомальных ферментов приближается к 100 при наличии определенной ферментной гетерогенности энзимов в клетках различных тканей. Так, в интерстициальных клетках, макрофагах и лейкоцитах крови преобладает кислая фосфатаза (КФ), катепсин D и другие окислительно-восстановительные ферменты лизосом, внося существенный вклад в их высокую бактерицидную активность. Катепсин D – основной, если не единственный энзим кардиомиоцитов, сконцентрированный в лизосомальном матриксе. Кислая дезоксирибонуклеаза (кДНКаза) также сосредоточена в матриксе лизосом и, частично, в ядре клетки [3, 4].

Значимость вклада лизосомальных энзимов в различные звенья патогенеза ишемической болезни сердца (ИБС) в свете метаболизма половых гормонов, а также с позиций возрастных отличий остаются неясными. Такие исследования в доступных нам литературных источниках единичны и результаты их весьма неоднозначны. Одни авторы обнаружили быстрый (1–5 мин) лизосомомобилизирующий эффект эстрадиола (E2) у лиц обоих полов [5–7], другие – усиление активности лизосом и процессов клеточной аутофагии на фоне тяжелого андропения [8, 9], третьи подтвердили противовоспалительное и мембраностабилизирующее действие физиологических концентраций тестостерона (Т) у самцов крыс; лизосомостабилизирующий эффект

андрогенов документирован также для мужчин [10]. Известно, что активность некоторых энзимов лизосом, в том числе катепсинов В и D, увеличивается с возрастом, что расценивается как физиологическая реакция, направленная на нейтрализацию накопления амилоида в тканях [11].

Ограниченное число публикаций, посвященных гендерным и возрастным аспектам метаболизма лизосом при сердечно-сосудистой патологии, в том числе у пациентов с ИБС, в свете литературных данных об их ключевой роли в ряде основополагающих процессов, результирующих в формирование атеросклеротической бляшки, определяет необходимость их детального изучения. Цель исследования: оценить сывороточные концентрации маркерных лизосомальных гидролаз (катепсина D, кислой фосфатазы и кислой ДНКазы) у мужчин с ИБС в зависимости от уровней тестостерона, эстрадиола, возраста и изучить их ассоциации с антропометрическими, инсулин-глюкозными параметрами, липидными и нелипидными биомаркерами атеросклероза.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследование включен 161 мужчина в возрасте 35–65 лет, медиана возраста составила 53,1 года (25 и 75 % процентиля: 40,1 и 59,4 года). Все пациенты перенесли инфаркт миокарда (ИМ) за не менее 30 дней до обследования. Диагноз ИМ верифицирован в соответствии с международными диагностическими критериями – Third Universal definition of myocardial infarction. ESC/ACCF/AHA/WHF Expert Consensus Document, 2012 [12]. Пациенты разделялись на возрастные группы согласно дизайну протокола GENESIS-PRACTY, 2012 [13]: 35–55 лет и 56–65 лет (первая и вторая возрастные группы соответственно), а также на группы по уровням половых гормонов: $12 \text{ нмоль/л} < T \leq 12 \text{ нмоль/л}$ и $0,194 \text{ нмоль} \leq E2 < 0,194 \text{ нмоль/л}$ при двукратном определении.

Критерии исключения: некоронарогенные заболевания миокарда, перенесенный острый коронарный синдром или операции по реваскуляризации миокарда менее четырех недель на-

зад до обследования, стенокардия напряжения IV функционального класса (ФК), вторичная артериальная гипертензия, сопутствующие хронические заболевания в фазе обострения, тяжелая печеночная или почечная недостаточность (хроническая болезнь почек 3Б-5 стадии), декомпенсированная хроническая сердечная недостаточность, злокачественные новообразования, эндокринные заболевания (кроме сахарного диабета (СД) 2 типа), инсулинотерапия, алкогольная и наркотическая зависимость, прием препаратов, содержащих половые гормоны или влияющих на их обмен. Дизайн исследования: наблюдательное одномоментное сравнительное исследование.

Перед включением в исследование каждый пациент подписывал информированное согласие. Дизайн исследования, информация для пациентов и информированное согласие прошли экспертизу и оформлены локальным комитетом по биомедицинской этике ФГБНУ «Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины» г. Новосибирска.

Медиана возраста для первого ИМ составила 46,1 года (25 и 75 % процентиля: 38,2 и 50,4 года), повторный ИМ верифицирован в 27,4 % случаев (43 человека), хирургическая реваскуляризация миокарда проводилась в 47,8 % случаев (77 человек). Длительность ИБС в среднем составила 7,8 года (25 и 75 % процентиля: 3,6 и 10,5 года): до 5 лет – у 42,5 % мужчин, от 5 до 10 лет – у 34,8 %, от 10 до 20 лет – у 15,1 %, более 20 лет – у 7,6 % включенных пациентов, что отражает преобладание давности заболевания до 10 лет более чем у 75 % мужчин. В клинической структуре ИБС превалировала стабильная стенокардия напряжения I–II ФК, которая имела место у 63,1 % пациентов 35–55 лет и 68,7 % в возрасте 56–65 лет, стенокардия напряжения III ФК встречалась в 4,4 % случаев в обеих возрастных группах и отсутствие ангинозных болей зарегистрировано в 32,5 и 26,9 % случаев.

Определение гормонов проводилось методом иммуноферментного анализа. Для определения Е2 использовалась тест-система Эстрадиол-ИФА, производитель ООО «Хема» (Россия) – нормальные значения для мужчин 0,029–0,194 нмоль/л; Т – тест-система Тестостерон-ИФА-Бест, производитель «Вектор-Бест» (Россия) – норма для мужчин составляет 4,5–35,4 нмоль/л. Деление по уровню Т у мужчин основывалось на определении андродифицита (гипогонадизма) при уровне Т сыворотки ≤ 12 нмоль/л (Investigation, treatment and monitoring of late onset hypogonadism in males.

Consensus statement ISA, ISSAM, EAU, EAA and ASA recommendation, 2008) [14]. Отрезной точкой для деления на группы с различным уровнем Е2 явилась верхняя граница нормы данного лабораторного набора. Учитывая известную вариабельность, половые гормоны определялись дважды с интервалом 20–30 дней. Для определения инсулина использовался набор Insulin Elisa EIA-2935 производства DRG Diagnostics (Германия), нормальные значения 2–15 мкЕд/мл [15]; С-пептида – тест-система Mercodia ELISA, производитель Mercodia (Швеция), нормальные значения 216–1025 пмоль/л.

Уровни гликемии определяли в плазме венозной крови глюкооксидазным методом на глюкометре «Энзискан» фирмы «Лабовэй» (Санкт-Петербург, Россия). Параметры липидного спектра сыворотки крови – общий холестерин (ОХС), ХС липопротеидов низкой плотности (ХС ЛПНП), ХС липопротеидов высокой плотности (ХС ЛПВП), триглицериды (ТГ) – определяли энзиматическим калориметрическим методом с использованием реактивов фирмы «Vital Diagnostics», г. Санкт-Петербург (Россия). Индекс НОМА-R вычислялся как уровень гликемии натощак (ммоль/л) \times базальный инсулин (мкЕд/мл) / 22,5; норма $< 2,5$ усл. ед. [16]. Степень окислительной модификации ЛПНП оценивалась посредством определения концентрации малонового диальдегида (МДА) в ЛПНП флуориметрическим методом на спектрофлуориметре «Hitachi F-300» при длине волны 553 нм [17] исходно и через 3, 6, 15 и 30 мин инкубации.

Степень цитокинового ответа оценивали методом иммуноферментного анализа на фотометре «Micro plate reader-680» («ВIO-RAD», США). Определяли уровни фибриногена – норма 1,8–4,0 г/л, фактора некроза опухолей α (ФНО- α) – норма 0–6,0 пг/мл, интерлейкина 1- β (ИЛ 1- β) – норма 0–11 пг/мл и интерлейкина 6 (ИЛ-6) – норма 0–10 пг/мл с помощью соответствующих наборов реагентов ЗАО «Вектор-Бест» (Россия). С-реактивный белок определялся с высокой чувствительностью (вчСРБ) иммунотурбидиметрическим методом при помощи реактивов Biomerica (Германия), за нормальные значения принималась величина этого показателя < 2 мг/л, согласно рекомендациям «Диагностика и коррекция нарушений липидного обмена с целью профилактики и лечения атеросклероза», V пересмотр, Москва, 2012 [18].

Активность маркерных лизосомальных гидролаз определялась в сыворотке крови, взятой из локтевой вены, в мкмоль/л/мин. В основу метода оценки активности КФ положено спект-

рфотометрическое определение количества неорганического фосфора (в присутствии молибдата аммония и аскорбиновой кислоты), выделившегося в результате энзиматического гидролиза β-глицерофосфата натрия (Merck, Германия). Интенсивность развившейся окраски измеряли на спектрофотометре Hitachi (Япония) при 700 нм. Активность фермента выражали в микромолях неорганического фосфора, освобожденного за 1 мин в 1 мл сыворотки. Активность катепсина D определялась с помощью спектрофотометрической экстинкции кислоторастворимых продуктов ферментного гидролиза гемоглобина (Sigma, США). Принцип метода оценки активности кДНКазы основан на спектрофотометрическом определении количества продуктов ферментативного гидролиза высокомолекулярной ДНК.

Анализ результатов исследования выполнен с использованием пакета программ SPSS (V.17.0). Описание количественных признаков при нормальном распределении значений выполнено с помощью среднего арифметического ± стандартное отклонение, при распределении, отличном от нормального, в виде медианы (25; 75 процентиля). Характер распределения количественных признаков оценивали с помощью критерия Колмогорова–Смирнова. Оценка значимости различий количественных признаков в сравниваемых группах проводилась с помощью *t*-критерия Стьюдента (при нормальном распределении) и *U*-критерия Манна–Уитни (при распределении, отличном от нормального). Ассоциации признаков оценивали с помощью корреляционного анализа (коэффициент корреляции Спирмена *r*), многофакторного ковариационного анализа. Учитывая существенное влияние антропометрических характеристик на сывороточные уровни лизосомальных гидролаз,

была проведена стандартизация по росту-весовым показателям (парциальный корреляционный анализ). Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При анализе соответствия вида распределения показателей лизосомальных энзимов у мужчин (критерий Колмогорова–Смирнова) обнаружено, что КФ и кДНКазы имели распределение, отличное от нормального, в связи с этим при статистической обработке этих переменных использовались непараметрические методы. Первоначально проводился сравнительный анализ уровней лизосомальных энзимов у мужчин, больных ИБС, в зависимости от возраста и уровня основного андрогена – Т (табл. 1).

У пациентов с ИБС 35–55 лет уровни всех изучаемых маркерных лизосомальных гидролаз – катепсина D, КФ и кДНКазы, были существенно выше при нормальных показателях Т, чем при $T \leq 12$ нмоль/л. Серия парциальных корреляционных анализов с контролем роста и массы тела продемонстрировала статистическую значимость этих ассоциаций ($p < 0,010$). Значения катепсина D в категории пациентов 56–65 лет были, в отличие от более молодой возрастной группы, выше при наличии андродифицита, чем при $T > 12$ нмоль/л. Эта ассоциация также не зависела от влияния роста и массы тела ($r = 0,566$, $p < 0,001$).

Среди пациентов с низким Т показатели катепсина D были ожидаемо выше у больных второй возрастной группы в сравнении с более молодыми. У пациентов с нормальным Т в возрастном интервале 35–55 лет уровни КФ были выше, чем у пациентов 56–65 лет. У мужчин с ИБС и гипоандрогенией прямая связь катепси-

Таблица 1

Сопоставление показателей лизосомальных ферментов у мужчин с ИБС в зависимости от возраста и уровней тестостерона

| Группа | Т, нмоль/л | Лизосомальные ферменты, мкмоль/л/ч | | |
|-----------|-----------------------|-------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| | | Катепсин D | Кислая фосфатаза | кДНКазы |
| 35–55 лет | >12 $n = 22$ | $1,76 \pm 0,28^*$ | 35,8 (30,4; 38,8) | 49,2 (47,8; 51,2) |
| | ≤ 12 $n = 24$ | $1,45 \pm 0,23^*$ $p_{1-2} = 0,032$ | 21,4 (19,4; 22,6) $p_{1-2} = 0,009$ | 45,2 (41,3; 48,5) $p_{1-2} = 0,043$ |
| 56–65 лет | >12 $n = 64$ | $1,62 \pm 0,28^*$ $p_{1-3} = 0,242$ | 25,8 (23,5; 31,5) $p_{1-3} = 0,018$ | 48,6 (44,5; 49,3) $p_{1-3} = 0,515$ |
| | ≤ 12 $n = 51$ | $2,03 \pm 0,40^*$ $p_{2-4} < 0,001$ $p_{3-4} < 0,001$ | 30,6 (23,0; 38,6) $p_{2-4} = 0,269$ $p_{3-4} = 0,160$ | 46,2 (39,8; 48,6) $p_{2-4} = 0,722$ $p_{3-4} = 0,318$ |

* Результаты представлены как $M \pm SD$.

Таблица 2

Показатели лизосомальных энзимов у мужчин с ИБС в зависимости от возраста и уровней эстрадиола

| Группа | E2, нмоль/л | Лизосомальные ферменты, мкмоль/л/ч | | |
|-----------|--------------------------|-------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| | | Катепсин D | Кислая фосфатаза | кДНКаза |
| 35–55 лет | $\geq 0,194$ $n = 12$ | $1,64 \pm 0,13^*$ | 28,0 (18,3; 37,8) | 22,1 (12,3; 30,5) |
| | $< 0,194$ $n = 34$ | $1,98 \pm 0,52^*$ $p_{1-2} = 0,006$ | 37,8 (21,4; 49,8) $p_{1-2} = 0,145$ | 49,7 (31,1; 55,1) $p_{1-2} = 0,004$ |
| 55–56 лет | $\geq 0,194$ $n = 37$ | $2,06 \pm 0,26^*$ $p_{1-3} < 0,001$ | 32,8 (27,7; 51,7) $p_{1-3} = 0,135$ | 46,8 (32,4; 56,5) $p_{1-3} = 0,002$ |
| | $< 0,194$ $n = 78$ | $1,79 \pm 0,47^*$ $p_{2-4} = 0,100$ $p_{3-4} = 0,005$ | 27,7 (21,4; 38,9) $p_{2-4} = 0,226$ $p_{3-4} = 0,030$ | 47,5 (39,8; 49,3) $p_{2-4} = 0,783$ $p_{3-4} = 0,931$ |

* Результаты представлены как $M \pm SD$.

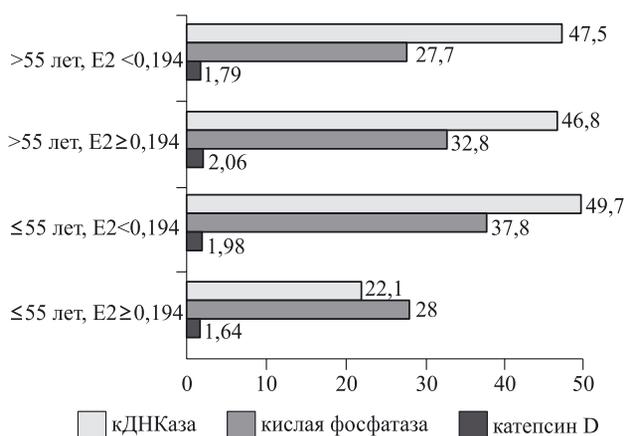
на D с возрастом 56–65 лет не зависела от влияния роста и массы тела ($r = 0,357$, $p = 0,028$), ровно как и прямая связь возраста 35–55 лет с КФ при нормоандрогении ($r = 0,831$, $p < 0,001$). Полученная нами противоположная динамика лизосомальных гидролаз, прежде всего катепсина D, при низких уровнях Т сыворотки в рассматриваемых возрастных группах мужчин с ИБС не отражена в литературе. Большинство авторов полагает, что физиологические концентрации андрогенов оказывают протекторное действие на лизосомальные мембраны и препятствуют процессам их деградации [19, 20]. Для объяснения полученных результатов, вероятно, необходима комплексная оценка уровней лизосомальных ферментов при различных уровнях эндогенного E2 (табл. 2).

У пациентов с ИБС 35–55 лет при нормальном E2 сыворотки уровни катепсина D и кДНКаза были выше, чем у больных с $E2 \geq 0,194$ нмоль/л. Среди пациентов старше 55 лет отмечалась обратное – значения катепсина D и КФ были выше у больных ИБС мужчин с $E2 \geq 0,194$. Кроме этого выявлено, что у больных ИБС мужчин с $E2 \geq 0,194$ нмоль/л в возрасте 56–65 лет показатели катепсина D и кДНКаза были выше, чем у пациентов более молодой группы (рисунок).

Серия парциальных корреляционных анализов продемонстрировала, что у пациентов 35–55 лет обратные ассоциации $E2 \geq 0,194$ нмоль/л с катепсином D и кДНКазой не зависели от роста и массы тела ($r = -0,261$, $p = 0,039$ и $r = -0,354$, $p = 0,021$ соответственно). При этом среди пациентов 56–65 лет прямые связи $E2 \geq 0,194$ нмоль/л с катепсином D и кДНКазой также были независимы от влияния антропометрических показателей: $r = 0,326$, $p = 0,004$ и $r = 0,228$, $p = 0,036$ соответственно.

Таким образом, у мужчин 35–55 лет лабильное влияние на мембраны лизосом оказывают достаточная андрогенная насыщенность ($T > 12$ нмоль/л) и нормальные уровни E2 сыворотки ($< 0,194$ нмоль/л). Выявленные факты, на первый взгляд, противоречат полученным ранее данным о негативном влиянии андропениции и гиперэстрогении у мужчин с ИБС на антропометрические, инсулин-глюкозные, липидные, провоспалительные реакции [7], но могут отражать возможность комплементарного или антагонистического воздействия половых стероидов на различные механизмы развития ИБС. По всей видимости, у женщин и мужчин с различным уровнем половых гормонов в зависимости от возрастной категории атерогенез осуществляется посредством различных ключевых процессов.

Одной из важных патогенетических составляющих для мужчин, больных ИБС, 35–55 лет при нормальных уровнях E2 и Т, у которых в меньшей степени выражены неблагоприятные



Динамические изменения лизосомальных энзимов (мкмоль/л/ч) у мужчин с ИБС 35–65 лет в зависимости от уровня эстрадиола (нмоль/л)

Таблица 3

Ассоциации лизосомальных ферментов с половыми гормонами и метаболическими показателями, липидными и нелипидными маркерами атерогенеза у мужчин 35–55 лет, больных ИБС

| Корреляционная пара | Ассоциации, <i>r</i> | <i>p</i> |
|--------------------------|----------------------|----------|
| Катепсин D – ХС ЛПНП | -0,580 | <0,001 |
| Катепсин D – ОБ | -0,667 | <0,001 |
| Катепсин D – ИМТ | -0,361 | 0,039 |
| Катепсин D – фибриноген | -0,483 | <0,001 |
| Катепсин D – ИЛ-1β | -0,502 | <0,001 |
| Катепсин D – эстрадиол | -0,598 | <0,001 |
| Катепсин D – тестостерон | 0,614 | <0,001 |
| КФ – ИМТ | -0,366 | 0,029 |
| КФ – ОБ | -0,445 | 0,030 |
| КФ – ОХС | -0,408 | 0,013 |
| КФ – ХС ЛПНП | -0,527 | 0,001 |
| КФ – фибриноген | -0,473 | <0,001 |
| КФ – ИЛ-1β | -0,469 | <0,001 |
| КФ – тестостерон | 0,638 | <0,001 |
| КФ – эстрадиол | -0,677 | <0,001 |
| кДНКазы – ТГ | -0,900 | <0,001 |
| кДНКазы – ОХС | -0,730 | 0,004 |
| кДНКазы – ИМТ | -0,820 | <0,001 |

Примечание. ОБ – окружность бедер; ИМТ – индекс массы тела.

метаболические и проатерогенные сдвиги, является лизосомальная цитотоксичность, опосредованная потерей ферментной изоляции с потенциальной химической агрессией и апоптозным потенциалом. Данное предположение подтверждается результатами корреляционного анализа, отражающего негативные связи лизосомальных ферментов с компонентами классического кластера факторов риска ИБС у мужчин 35–55 лет (табл. 3).

Лизосомальные ферменты в данной категории больных ИБС мужчин были отрицательно связаны с липидными показателями (катепсин D и КФ ассоциированы с ХС ЛПНП, кДНКазы и КФ с ОХС, кДНКазы с ТГ), с антропометрическими параметрами (катепсин D и КФ с индексом массы тела (ИМТ) и окружностью бедер (ОБ), а кДНКазы с ИМТ и окружностью талии (ОТ)). Катепсин D и КФ также имеют аналогичные отрицательные взаимосвязи с фибриногеном и ИЛ-1β. Кроме этого у пациентов 35–55 лет все лизосомальные ферменты обратно ассоциированы с Е2, а катепсин D и КФ положительно с Т. Проведен ковариационный анализ

в выборке пациентов первой возрастной категории с ИБС для определения влияния полученных в корреляционном анализе независимых переменных на лизосомальные гидролазы. Наибольшее отрицательное влияние на катепсин D оказывали ХС ЛПНП ($F = 76,2; p < 0,001$), ОБ ($F = 13,6; p < 0,001$), Е2 ($F = 13,5; p < 0,001$) и ИМТ ($F = 13,0; p < 0,001$), также существенно определял значение катепсина ИЛ-1β ($F = 12,6; p = 0,008$). Кислая фосфатаза прежде всего обратно зависела от ОБ ($F = 76,0; p < 0,001$), кроме этого статистически значимо влияли на зависимую переменную ОХС ($F = 48,3; p < 0,001$), ИМТ ($F = 43,2; p < 0,001$), Е2 ($F = 12,6; p < 0,001$) и ИЛ-1β ($F = 10,8; p < 0,001$). Первостепенным фактором, отрицательно определяющим уровень кДНКазы, оказался Е2 ($F = 75,6; p < 0,001$), отмечено также влияние ТГ ($F = 21,1; p < 0,001$), ИМТ ($F = 16,2; p < 0,001$) и ОТ ($F = 8,8; p < 0,001$).

Полученные нами результаты могут отражать не только меньшую значимость лизосомальной биодисфункции в развитии ИБС у мужчин 35–55 лет с гипоандрогенией и/или гиперэстрогенией, что диссоциирует с динамикой других патофизиологических осей, нельзя также исключить у мужчин с ИМ в анамнезе феномен «псевдоэнзимопатии», связанный с истощением запасов лизосомальных гидролаз на более ранних, возможно, доклинических стадиях развития коронарного атеросклероза. Так, ряд авторов подтверждает развивающееся при атеросклерозе уменьшение активности лизосомальных протеиназ, фосфолипаз и холестерол-эстеразы в клетках интимы артерий и сыворотке, которое происходит на фоне значительного увеличения пиноцитоза специфических субстратов (ХС ЛПНП) и является ключевым звеном в процессе трансформации макрофагов в пенстые клетки [21].

Проведен анализ ассоциаций показателей лизосомальных ферментов с половыми гормонами и метаболическими характеристиками у больных ИБС мужчин второй возрастной группы (табл. 4).

Выявлены ассоциации изучаемых лизосомальных ферментов с рядом липидных и метаболических показателей: прямые связи катепсина D и КФ с ТГ и ОТ, отрицательные ассоциации с ХС ЛПНП, помимо этого катепсин D положительно ассоциирован с ОХС, а кДНКазы с ТГ, индексом НОМА-R, наличием СД 2 типа и инсулином. Из нелипидных биомаркеров атерогенеза выявлены позитивные ассоциации катепсина D с МДА-3, вСРБ, ИЛ-1β, при этом маркерный фермент полиморфно-ядерных лей-

Таблица 4

Ассоциации лизосомальных ферментов с половыми гормонами и метаболическими показателями у мужчин 56–65 лет, больных ИБС

| Корреляционная пара | Ассоциации, r | p |
|---------------------------|-----------------|--------|
| Катепсин D – ОХС | 0,239 | 0,032 |
| Катепсин D – ТГ | 0,409 | <0,001 |
| Катепсин D – ХС ЛПВП | -0,379 | <0,001 |
| Катепсин D – ОТ | 0,413 | <0,001 |
| Катепсин D – МДА-3 | 0,521 | <0,001 |
| Катепсин D – вчСРБ | 0,708 | <0,001 |
| Катепсин D – ИЛ-1 β | 0,525 | <0,001 |
| Катепсин D – тестостерон | -0,371 | 0,001 |
| Катепсин D – эстрадиол | 0,601 | 0,008 |
| КФ – ТГ | 0,296 | 0,005 |
| КФ – ХС ЛПВП | -0,275 | 0,009 |
| КФ – ОТ | 0,362 | <0,001 |
| КФ – МДА-30 | 0,742 | <0,001 |
| КФ – тестостерон | -0,223 | 0,035 |
| КФ – эстрадиол | 0,408 | <0,001 |
| кДНКазы – НОМА-R | 0,369 | 0,016 |
| кДНКазы – инсулин | 0,413 | 0,007 |
| кДНКазы – ТГ | 0,296 | 0,005 |
| кДНКазы – СД 2 тип | 0,210 | 0,047 |

Примечание. СД – сахарный диабет.

коцитов – КФ – связан с МДА-30. Представляются важными у мужчин с ИБС 56–65 лет, в отличие от более молодых пациентов, обратные корреляции катепсина D и КФ с Т и положительные с Е2.

Проведен ковариационный анализ в группе пациентов 56–65 лет с ИБС для определения влияния указанных выше независимых факторов на маркерные лизосомальные ферменты. На уровень катепсина D оказывали позитивное влияние две переменные: ТГ ($F = 17,2$; $p < 0,001$) и вчСРБ ($F = 8,6$; $p = 0,006$). Определяющее прямое влияние на уровень КФ имели ХС ЛПВП ($F = 11,7$; $p < 0,001$), ОТ ($F = 7,0$; $p = 0,013$) и МДА-30 ($F = 5,3$; $p = 0,039$). Переменными, положительно определяющими уровень кДНКазы, явились индекс НОМА-R ($F = 5,93$; $p = 0,020$) и ТГ ($F = 1,23$; $p = 0,024$).

Ассоциации лизосомальных ферментов с различными липидными и нелипидными маркерами атеросклероза у мужчин 56–65 лет обусловлены структурными изменениями в липидном компоненте мембран лизосом, увеличивающими их проницаемость на фоне проатерогенных сдвигов [21]. Зависимость КФ как маркерного

энзима полиморфно-ядерных лейкоцитов от МДА-30 обусловлена тем, что при ишемическом повреждении миокарда в патологический процесс вовлекается прежде всего не кардиомиоцит, а соединительнотканная структура сердца и клетки «первого эшелона» периферической крови – нейтрофилы, активно мигрирующие в миокард и являющиеся главным «действующим лицом» в воспалительном процессе любого генеза за счет своих мощных кислородзависимых и кислороднезависимых (лизосомальные ферменты) биоцидных механизмов, находящихся в тесном взаимодействии [21, 22].

Продемонстрированное в многофакторном анализе прямое влияние на уровни кДНКазы клинико-лабораторных характеристик, сопряженных с наличием инсулинорезистентности, можно объяснить активным участием этого энзима в процессах клеточного апоптоза, сопровождающего прогрессивное клеточное «старение» и процессы атерогенеза при нарушениях углеводного обмена [23]. До недавних пор считалось, что причиной гибели клеток внутри атеросклеротической бляшки является прямое токсическое воздействие на клетки, например, свободных радикалов, образующихся при перекисном окислении липидов (ПОЛ), однако в настоящее время можно с определенной уверенностью утверждать, что основной вклад в суммарную клеточную гибель при атеросклерозе вносит апоптоз. Все клеточные элементы, обнаруживаемые в атеросклеротических бляшках, подвергаются запрограммированной гибели [24].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Суммируя полученные результаты, можно заключить, что по результатам сравнительного и корреляционного анализов у мужчин 35–55 лет нормальные уровни Т и Е2 сопряжены с более высокими сывороточными концентрациями лизосомальных ферментов, чем при наличии андродифицита и гиперэстрогении, а в более старшем возрасте, напротив, андродифицит и гиперэстрогения сопровождалась повышением уровней ферментов лизосом. У мужчин, больных ИБС, первой возрастной группы по данным многофакторного анализа три изучаемых лизосомальных фермента обратно зависели от Е2 ($p < 0,001$) и ряда проатерогенных параметров, в том числе ОХС, ХС ЛПНП, ТГ, ОБ, ИМТ, ИЛ-1 ν ($p < 0,001-0,01$), а в 56–65 лет непосредственное влияние половых стероидов на уровни лизосомальных гидролаз отсутствовало, катепсин D и КФ прямо определялись липидными, нелипидными маркерами атерогенеза

(ТГ, вчСРБ, МДА-30, ОТ, индексом НОМА-R, $p < 0,001-0,05$) и обратно ХС ЛПВП ($p < 0,001$). Кислая ДНКазы в обеих возрастных группах зависела от параметров, вовлеченных в инсулин-глюкозный гомеостаз (ИМТ, ОТ, ТГ, индекс НОМА-R, $p < 0,001-0,05$), что может отражать ключевую роль эндонуклеазы в акселерации процессов катаболизма, активизирующихся при различных вариантах нарушения углеводного обмена (НУО), вплоть до программируемой клеточной гибели. Подобная динамика трех маркерных лизосомальных энзимов, возможно, демонстрирует различный вклад лизосомальной цитотоксичности в развитие ИБС у мужчин в возрастных группах 35–55 и 56–65 лет.

ЛИТЕРАТУРА

1. **Totta P., Pesiri V., Marino M., Acconcia F.** Lysosomal function is involved in 17β -estradiol-induced estrogen receptor- α degradation and cell proliferation // *PLoS One*. 2014. Vol. 9, N 4. P. e94880.
2. **Nagoor Meeran M.F., Jagadeesh G.S., Selvaraj P.** Thymol attenuates inflammation in isoproterenol induced myocardial infarcted rats by inhibiting the release of lysosomal enzymes and downregulating the expressions of proinflammatory cytokine // *Eur. J. Pharmacol.* 2015. Vol. 754, N 5. P. 153–161.
3. **Цыганкова О.В., Руюткина Л.А., Бондарева З.Г.** Лизосомальные ферменты. Новый взгляд на фундаментальные материи с позиций кардиолога // *Цитокины и воспаление*. 2009. Т. 8, № 4. С. 11–17.
4. **Лугай М.И., Голикова И.П.** Кальциноз венечных артерий, аорты, клапанов сердца и ишемическая болезнь сердца: патофизиология, взаимосвязь, прогноз, стратификация риска, часть 1 // *Укр. кардиол. журн.* 2014. № 6. С. 92–100.
5. **Ganesan K., Balachandran C., Manohar V.M., Puvanakrishnan R.** Comparative studies on the interplay of testosterone, estrogen and progesterone in collagen induced arthritis in rats // *Bone*. 2008. Vol. 43, N 4. С. 758–765.
6. **Valor L., Teijeiro R., Aristimuco C. et al.** Estradiol-dependent perforin expression by human regulatory T-cells // *Eur. J. Clin. Invest.* 2011. Vol. 41, N 4. P. 357–364.
7. **Scott A.P.** Do mollusks use vertebrate sex steroids as reproductive hormones? II. Critical review of the evidence that steroids have biological effects // *Steroids*. 2013. Vol. 78, N 2. P. 268–281.
8. **Serra C., Sandor N.L., Jang H.** The effects of testosterone deprivation and supplementation on proteasomal and autophagy activity in the skeletal muscle of the male mouse: differential effects on high-androgen responder and low-androgen responder muscle groups // *Endocrinology*. 2013. Vol. 154, N 12. P. 4594–4560.
9. **Carvelli L., Bannoud N., Aguilera A.C.** Testosterone influences the expression and distribution of the cation-dependent mannose-6-phosphate receptor in rat epididymis. Implications in the distribution of enzymes // *Andrologia*. 2014. Vol. 46, N 3. P. 224–230.
10. **Chou Y.W., Zhang L., Muniyan S.** Androgens upregulate Cdc25C protein by inhibiting its proteasomal and lysosomal degradation pathways // *PLoS One*. 2013. Vol. 8, N 4. P. e61934.
11. **Malik M., Fenko M.D., Sheikh A.M. et al.** A Novel approach for characterization of cathepsin D protease and its effect on tau and amyloid proteins // *Neurochem. Res.* 2011. Vol. 36, N 5. P. 754–760.
12. **Thygesen K., Alpert J.S., Jaffe A.S. et al.** Third Universal definition of myocardial infarction. ESC/ACC/AHA/WHF Expert Consensus Document, 2012 // *Circulation*. 2012. Vol. 126. P. 2020–2035.
13. **Pilote L., Karp I.** GENESIS-PRAXY (GENdEr and Sex determInantS of cardiovascular disease: From bench to beyond PRemature Acute Coronary SYndrome) // *Am. Heart J.* 2012. Vol. 163, N 5. P. 741–746.
14. **Wang C., Nieschlag E., Swerdloff R. et al.** Investigation, treatment and monitoring of late onset hypogonadism in males. Consensus statement ISA, ISSAM, EAU, EAA and ASA recommendation, 2008 // *Eur. J. Endocrinol.* 2008. Vol. 159 (5). P. 507–514.
15. **Эндокринология.** Национальное руководство. Краткое издание / Под ред. И.И. Дедова, Г.А. Мельниченко М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. 752 с.
16. **Campanati A., Ganzetti G., di Sario A. et al.** Insulin resistance, serum insulin and НОМА-R // *J. Gastroenterol.* 2013. Vol. 48, N 5. P. 673.
17. **Рагино Ю.И., Душкин М.И.** Простой метод исследования резистентности к окислению гепарин-осажденных β -липопротеинов сыворотки крови // *Клин. лабораторная диагностика*. 1998. № 3. С. 6–9.
18. **Аронов Д.М., Ахмеджанов Н.М., Балахонова Т.В. и др.** Диагностика и коррекция нарушений липидного обмена с целью профилактики и лечения атеросклероза, V пересмотр, Москва, 2012. <http://athero.ru/Lipids-rus-2009.pdf> (дата обращения 3.10.2015).
19. **Балаболкин М.И., Клебанова Е.М., Кремнистая В.М.** Дифференциальная диагностика и лечение эндокринных заболеваний. М.: Медицина, 2002. 752 с.
20. **Serra C., Sandor N.L., Jang H.** The effects of testosterone deprivation and supplementation on proteasomal and autophagy activity in the skeletal muscle of the male mouse: differential effects on high-androgen responder and low-androgen responder muscle groups // *Endocrinology*. 2013. Vol. 154, N 12. P. 4594–4606.
21. **Альбертс Б., Джонсон А., Льюис Д. и др.** Молекулярная биология клетки: в 3-х т. М. – Ижевск: НИЦ «Регулярная и хаотическая динамика»; Ин-т компьютерных исследований, 2013. Т. II. 992 с.
22. **Рагино Ю.И., Чернявский А.М., Волков А.М. и др.** Факторы и механизмы развития коронарного атеросклероза. Новосибирск: Наука, 2011. 168 с.
23. **Dodson M., Darley-Usmar V., Zhang J.** Cellular metabolic and autophagic pathways: traffic control by redox signaling // *Free Radic. Biol. Med.* 2013. Vol. 63. P. 207–221.
24. **Chang C., Yang H., Xin S.L. et al.** The inhibition of oxidised low-density lipoprotein-induced apoptosis of macrophages by recombinant human brain natriuretic peptide and the underlying mechanism // *Cardiology*. 2015. Vol. 132, N 3. P. 137–146.

LEVELS OF MARKER LYSOSOMAL HYDROLASES IN MEN OF DIFFERENT AGE WITH ISCHEMIC HEART DISEASE THROUGH LEVELS OF SEX STEROIDS

O.V. Tsygankova¹, Z.G. Bondareva¹, Yu.I. Ragino², K.Yu. Nikolaev²,
D.Yu. Platonov³, V.N. Maksimov², M.G. Pustovetova¹

¹Novosibirsk State Medical University
630091, Novosibirsk, Krasny av., 52

²FSBSI «Institute of Internal and Preventive Medicine»
630089, Novosibirsk, Boris Bogatkov str., 175/1

³Tver State Medical Academy
170100, Tver, Sovetskaya str., 4

Objective: To evaluate the serum concentrations of the three markers of lysosomal hydrolases (cathepsin D, acid phosphatase (AP) and acid DNase (aDNAase) in men with coronary heart disease (CHD), depending on the levels of testosterone (T), estradiol (E2) and age, examine their association with anthropometric, insulin-glucose parameters of lipid and non-lipid biomarkers of atherosclerosis. The study included 161 women aged 35–65 years, myocardial infarction (MI) is not less than 30 days before the survey. The median age was 53.1 years (25 % 75 % percentage: 40.1 and 59.4 years). The patients were divided into age groups: 35–55 years and 56–65 years (first and second groups, respectively), as well as in groups by levels of sex hormones: T > and ≤ 12 nmol / l and ≥ E2 and < 0.194 nmol / l at twofold determination. The results of a comparative analysis and correlation in males 35–55 years of normal T and E2 levels were associated with higher serum concentrations of lysosomal enzymes than those with androdefitsitom and giperestrogeniy and at an older age, on the contrary, androdefitsit and hyperestrogenia lysosomal enzymes accompanied labilization of lysosomal enzymes. In men, CHD patients first age group according to the multivariate analysis three studied lysosomal enzyme inversely dependent on E2 ($p < 0.001$) and a number of pro-atherogenic parameters including total cholesterol (TC), low density lipoprotein (LDL) cholesterol, triglycerides (TG), hip circumference (ON), body mass index (BMI), interleukin (IL) -1 β ($p < 0.001$ –0.01), and in 56–65 years a direct impact on the levels of sex steroids lysosomal hydrolases missing, cathepsin D and EC is directly determined by the lipid, non-lipid markers of atherogenesis (TG, high-sensitivity C-reactive protein (hsCRP), malondialdehyde (MDA-30), waist circumference (WC), the index of HOMA-R, $p < 0.001$ –0.05) and back high-density lipoprotein (HDL) cholesterol ($p < 0.001$). Acid DNase in both age groups dependent on the parameters involved in the insulin-glucose homeostasis (BMI, ON, TG, index HOMA-R, $p < 0.001$ –0.05), which may reflect a key role in endonuclease accelerated catabolism activatable for various violations of carbohydrate metabolism, up to programmed cell death. Such dynamics of the three markers of lysosomal enzymes demonstrates the different contributions to the development of lysosomal cytotoxicity of CHD in men in the age groups 35–55 and 56–65 years

Keywords: estradiol, testosterone, women, coronary heart disease, lysosomal enzymes.

Статья поступила 24 сентября 2015 г.