



# Роля на хемоксигеназа-1 при пациенти с хронична сърдечна недостатъчност

Д-р Катерина Витлиянова

Катедра по пропедевтика на Вътрешните болести „Проф. д-р Ст. Киркович“, Клиника по кардиология, УМБАЛ „Александровска“, Медицински университет, София

Съвременните изследователски усилия са насочени към търсенето на нови и нестандартни методи и средства за лечение и подобряване на прогнозата на пациентите със сърдечно-съдови заболявания (ССЗ). В последните години усилено се разработват възможностите, свързани с промяна в генната активност на ключови от патогенетична гледна точка ензими. Водеща роля в тази насока от изследвания се заема от антиоксидантните ензими, участващи в предотвратяването на процесите на оксидативния стрес (ОС), и в частност антиоксидантният ензим хемоксигеназа-1. Хемоксигеназа-1 е индуцируема изоформа на контролиращия разграждането ензим на хем до желязо, въглероден оксид (СО) и биливердин, който от своя страна се метаболизира до билирубин (BR). Действието на HO-1 се осъществява чрез крайните продукти от индукцията на ензима. Механизмите на протекция се основават на антиоксидантна активност на билирубина, секвестрация на желязото от феритина и антифибринолитичен и вазодилаторен ефект на СО. Характеристиката на физиологична индукция на HO-1 при ХСН като общ краен патофизиологичен механизъм на всички сърдечно-съдови болести не е изследван и известен до момента. В публикуваните източници по проблема е налице изобилие от данни за генната експресия на ензима, при липса на данни за характеристиката на системната регулация, респективно плазмените нива на HO-1.<sup>1</sup>

**Целта** на проучването е да се установи връзката на HO-1 с определени параметри на левокамерна (ЛК) дисфункция и дилатация както и да се дефинират прогностичните фактори с определящ ефект върху плазмените нива на ензима при пациенти с ХСН.

## Материал и методи

Проучването е проведено върху 53 последователни пациенти с ХСН на възраст от 48 до 81 години, средна възраст  $69.3 \pm 7.9$  години, постъпили в Кардиологична клиника на Катедрата по пропедевтика на вътрешните болести, УМБАЛ „Александровска“, Медицински университет, София. Диагнозата ХСН се приема при типична симптоматика, рентгенологични данни за белодробен застои и/или значителен клиничен отговор на провежданата терапия в съответствие с дефиницията на Европейското кардиологично дружество, 2005 г.<sup>7</sup> Изразената систолната дисфункция на ЛК е дефинирана при стойности на левокамерната фракция на изтласкване (ЛКФИ) <40%.

### Контролна група

Контролната група се състои от лица, характеризиращи се с подобна на случаите възрастова характеристика: средна възраст  $68.7 \pm 7.9$  години. Всички контроли са разпитани и прегледани обстойно за изключване на патологични отклонения, имащи отношение към резултатите на проучването. Само лица без анамнестични данни за заболяване, отклонения в обективното състояние, с нормален електрокардио

графски образ, както и без каквато и да е медикация, са включени в контролната група. Общият брой контроли за анализ и сравнение със случаите е 24.

Всички включени в проучването пациенти са разпитани и прегледани по стандартизиран протокол, *включващ данни от анамнезата и обективния статус*. Продължителността на интервюто и клиничния преглед е  $60 \pm 30$  минути и включва въпроси относно:

1. *Демографски и биологични фактори*: възраст, пол, ръст/тегло,\* *индекс на телесна маса (ИТМ)*, систолно/диастолно артериално налягане (САН/ДАН); *сърдечно-съдови рискови фактори*: тютюнопушене (ТН), употреба на алкохол.

2. *Клинични характеристики и провеждана терапия*: етиология на сърдечната недостатъчност (исхемична, неисхемична), придружаващи заболявания [артериална хипертония (АХ), хронична обструктивна белодробна болест (ХОББ), захарен диабет (ЗД), периферна съдова болест (ПСБ)], функционален клас (ФК) по NYHA,\*\* *сърдечна честота, ритъмни нарушения, наличие на клинични белези на сърдечна недостатъчност*.

\* Антропометричните измервания са взети при стартиране на проучването

\*\* Класификация на Ню Йоркската сърдечна асоциация

3. *Инструментални данни*

Инструменталните характеристики са изследвани при приемането и включват:

■ Стандартна електрокардиограма от 12 отвеждания.

■ Рентгенографско изследване за наличие на увеличени размери на леви сърдечни кухини, плеврален излив, съдов застой, кардио-торакално отношение (<0.6 / ≥0.6).

■ Ехокардиографско изследване с определяне на стойностите на левокамерната фракция на изтласкване (ЛКФИ) в проценти по метода на Simpson в стандартна дъвкухинна позиция или Teicholds при липса на сегментни ЛК нарушения.

**Статистически методи**

Количествените показатели са представени като средна величина със стандартно отклонение (SD) за количествените показатели и относителни дялове за качествени променливи. Сравнителният анализ по групи включва провеждането на непараметричен анализ – изчисляване на критерий Хи-квадрат за категоричните променливи и параметричен анализ – (ANOVA) анализ (за множествени сравнения на средните величини за даден фактор по категориите на груп фактор), t критерий на Student-Fisher и тест на Ман-Whitney за факторите с разпределение, различно от нормалното.

Оценката на корелационните зависимости между изследваните показатели е осъществена посредством линейно-регресионен анализ с логаритмична трансформация за зависимите променливи с разпределение, различаващо се от нормалното, включително и на зависимата променлива НО-1. От гледна точка на терапията в анализа са включени допълнително медикаменти, имащи отношение към експресията на НО-1, ацетилсалицилова киселина и липидопонижаващите медикаменти – статини. И за двата медикамента е установена повишена експресия на НО-1 при пациенти със ССЗ.

Показателите САН, ДАН, телесистолен обем (ТСО), теледиастолен обем (ТДО), телесистолен размер (ТСР), теледиастолен размер (ТДР) са изследвани като количествени променливи в линейно-регресионния анализ. Всички останали показатели са въведени като категорични фактори.

**Биохимични показатели**

На всички изследвани пациенти, както и на здравите контроли, е взета кръв за биохимичен анализ, включващ кръвна картина, серумни нива на електролити (натрий и калий), креатинин, ензими, липиден статус, серумно желязо, феритин и билирубин.

Кръвни проби за мозъчен натриуретичен пептид (BNP) и НО-1 са взети при изписването на пациентите от клиниката. Определянето на плазмената концентрация на BNP е извършено в лабораторията по Медико-биологични изследвания, Институт по молекулярна биология, Българска академия на науките, посредством ензим-свързан имуносорбентен метод (ELISA), чрез готов тест (BNP-32, IBL Hamburg). Анализът е проведен

на ELISA reader на Biolab. Съгласно протокола на производителя, чувствителността на метода за изследване на нивата на BNP, определена като минимална откриваема концентрация, е равна на 4 pg/ml. Възпроизводимостта на метода, изразена като вътреопитен коефициент на вариация, е оценен на 5% при коефициентът на вариация между различните опити <14%. Концентрациите на плазменния НО-1 и MMP-9 протеин са изследвани с ензимно-свързан имуносорбентен метод ELISA (EIA-ELISA assays, ELISA reader Trinitron) в Института по имунология и биология на размножаването – Българска академия на науките. Хемоксигеназа-1 е определена чрез тест Stressgen's StressXpres™, Canada. Чувствителността на метода е 0.78 ng/ml. Вътреопитният коефициент на вариация на Stressgen НО-1 ELISA е оценен <10%. Коефициентът на вариация между различните опити е <10%.

**Резултати**

**Сравнителен анализ на показателите по групи**

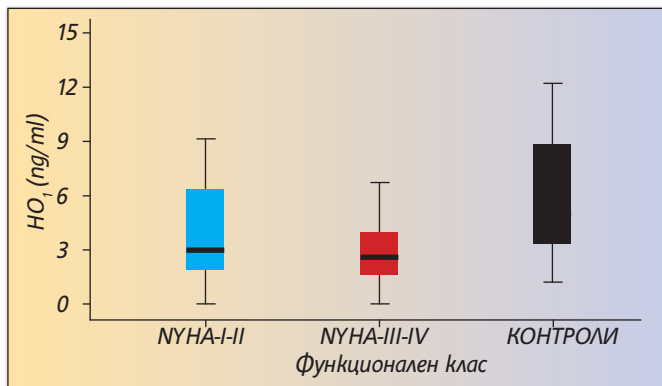
В табл. 1 са представени показателите на пациентите с ХСН, изследвани за НО-1. Групата на пациенти с

Характеристика	Брой (%) пациенти Медианни стойности
<i>Възраст ≥65 години</i>	36 (67.9)
<i>Жени</i>	23 (43.4)
<b>Придружаващи заболявания</b>	
<i>Артериална хипертония</i>	44 (83.0)
<i>Захарен диабет</i>	11 (20.8)
<i>Анамнеза за периферни съдови заболявания</i>	5 (9.4)
<i>ХОББ</i>	9 (17.0)
<i>Ишемична етиология на СН</i>	24 (45.3)
<i>Преживян миокарден инфаркт</i>	21 (39.6)
<b>Клинични белези</b>	
<i>Предсърдно мъждене (хронично)</i>	26 (49.1)
<i>САН (mmHg)</i>	130 (110–180)
<i>ДАН (mmHg)</i>	80 (50–100)
<i>Белодробен застой</i>	34 (64.2)
<i>Периферен застой</i>	28 (52.8)
<i>Функционален клас</i>	
<i>II</i>	18 (34.0)
<i>III</i>	20 (37.7)
<i>IV</i>	15 (28.3)
<b>Инструментални данни</b>	
<i>Рентгенологични данни за белодробен застой</i>	30 (56.6)
<b>Ехокардиография</b>	
<i>ТДО (ml)</i>	137 (58–456)
<i>ТСО (ml)</i>	88 (36–311)
<i>ЛКФИ &lt;40%</i>	24 (45.3)
<i>Систолено налягане в а. pulmonalis</i>	49 (30–90)
<b>Терапия при приемането</b>	
<i>АСЕ/АРВ*</i>	29 (54.7)
<i>β-блокери</i>	37 (69.8)
<i>Acetysal</i>	14 (26.4)
<i>Статини</i>	15 (28.3)

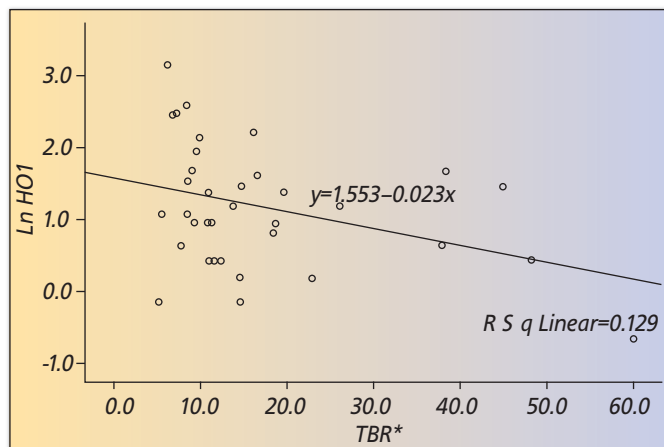
Табл. 1. Показатели при пациенти с ХСН, изследвани за НО-1  
\*Инхибитори на ангиотензин-конвертиращия ензим/ангиотензин-рецепторни блокери



ХСН и контролната група се различават статистически значимо по стойностите на хемоглобина, общия холестерол, кръвната захар, креатинина и серумните нива на натрий. Статистически сигнификантна разлика между групите се регистрира още за измерените нива на BNP и HO-1 (табл. 2). Медианната стойност на случаите (2.58 ng/ml, диапазон 0.5–7.3) е сигнификантно по-ниска в сравнение с установената медианна HO-1 стойност на контролната група (5.17 ng/ml, диапазон 1.2–12.2) при високо ниво на статистическа значимост (p=0.006).



Фиг. 1. Плазмени нива на HO-1 в зависимост от функционалния клас (p<0.01)



Фиг. 2. Връзка между HO-1 и стойностите на серумния билирубин; \*p<0.05

Показател	Пациенти, n=53	Здрави контроли, n=24	p*
BNP (pg/ml)	650 (401–5974)	57 (35–118)	<0.05
HO-1 (ng/ml)	2.58 (0.52–13.3)	5.1 (1.2–12.2)	<0.01
TSCN (mmol/l)	4.6 (0.7)	5.3 (0.6)	<0.05
Кръвна захар на гладно (mmol/l)	6.4 (2.3)	5.4 (0.8)	<0.05
Хемоглобин (g/l)	126.5 (19.7)	144 (19.4)	<0.05
Серумно желязо (μmol/l)	17.1 (8.8)	20.2 (8.1)	NS
Серумен феритин (μmol/l)	74.8 (67.8)	80.9 (42.8)	NS
Общ билирубин (μmol/l)	17.2 (13.5)	16.2 (9.0)	NS
Креатинин (μmol/l)	126.5 (45.7)	97.7 (35.4)	<0.05
Натрий (mmol/l)	140 (3.7)	144 (3)	<0.05

Табл. 2. Сравнителен анализ по изследваните показатели по групи: пациенти с ХСН и здрави контроли

Стойностите са представени като средна величина със SD, медиана с диапазон (IQR), в зависимост от вида на данните

\* Mann-Whitney U-test

### Връзка на HO-1 с изследваните демографски и клинични показатели

Не се установяват сигнификантни зависимости на HO-1 с изследваните демографски и клинични параметри, вероятно следствие от обстоятелството, че биологичната активност на HO-1 е подчинена изцяло на структурни и биохимични промени в миокарда, причина или следствие за нарушената сърдечна функция (табл. 3).

Регистрира се силна сигнификантна връзка между ензима и степента на ограничение на функционалния клас, като пациентите от III и IV ФК по NYHA са с по-ниски HO-1 нива (p=0.007) (фиг. 1).

### Връзка на хемоксигеназа-1 с елементите на хемоксигеназаната система

Липсата на данни за характеристиката на системната регулация на HO-1, както и съответстващата ѝ биологична активност, наложи изследването на взаимовръзката на HO-1 със серумните нива на елементите от хемоксигеназната система, включваща билирубин, феритин и желязо, както и BNP като маркер за неврохормонална активация при пациенти с ХСН (табл. 4 и 5).

Установява се значима негативна корелация със стойностите на серумния BR (фиг. 2) при липса на зависимост между HO-1 и останалите елементи на HO-1 системата, серумния феритин и желязо (табл. 4).

Липсва корелационна зависимост между плазмените нива на HO-1 и стойностите на BNP (табл. 4).

### Връзка на HO-1 с инструменталните параметри при ХСН

Липсват данни за линейно-регресионна зависимост между HO-1 и степента на систолна ЛК дисфункция, ко-

Характеристика	R2	F	B	P
Възраст >65 години	0.002	0.12	-0.08	NS
Жени	0.03	1.19	0.23	NS
<b>Придружаващи заболявания</b>				
Захарен диабет	0.01	0.353	0.15	NS
Артериална хипертония	0.01	0.046	-0.08	NS
<b>Етиология на СН</b>				
Ишемична	0.00	0.00	-0.001	NS
<b>Клинични белези</b>				
Предсърдно мъждене (хронично)	0.067	3.38	-0.379	0.072
САН (mmHg)	0.057	2.84	0.35	NS
ДАН (mmHg)	0.002	0.10	0.08	NS
Функционален клас: I-II, спрямо III-IV	0.072	3.62	-0.42	0.063
<b>Инструментални изследвания</b>				
Рентгенологични данни за белодробен застои	0.012	0.56	-0.172	NS
Ехокардиография				
ТДО (ml)	0.22	4.74	0.76	0.044
ТСО (ml)	0.22	4.87	0.77	0.041
ТСР (mm)	0.12	4.70	0.53	0.037
ТДР (mm)	0.12	4.52	0.52	0.041
ЛКФИ (%) (</>40%)	0.01	0.57	-0.16	NS

Табл. 3. Еднофакторен линейно-регресионен анализ за изследваните демографски, клинични и инструментални показатели\* HO-1 зависи променлива с ln трансформация



Показатели	R2	F	B	p
Кръвна картина				
Хемоглобин (g/l)	0.008	0.38	-0.003	NS
Хематокрит	0.009	0.37	-1.25	NS
Серумно желязо (μmol/l)	0.001	0.33	0.003	NS
Серумен феритин (μmol/l)	0.011	0.34	-0.001	NS
Чернодробни показатели				
ASAT (U/l)	0.001	0.56	0.001	NS
ALAT (U/l)	0.002	0.08	0.002	NS
Общ билирубин (μmol/l)	0.137	4.28	-0.023	0.048
Креатинин (μmol/l)	0.006	0.25	-0.001	NS
Натрий (mEq/L)	0.009	0.41	0.018	NS
Калий	0.008	0.38	-0.149	NS
BNP ng/ml	0.005	0.25	-0.049	NS

Табл. 4. Еднофакторен линейно регресионен анализ за изследваните лабораторни показатели

НО-1	ПМ	ФК	TBR	ТСО	ТДО	ТСР	ТДР
R*	-0.26	-0.27	-0.37	0.62	0.64	0.48	0.52
P	0.036	0.032	0.024	0.002	0.002	0.002	0.001

Табл. 5. Корелационни коефициенти на връзката между НО-1 и изследваните характеристики

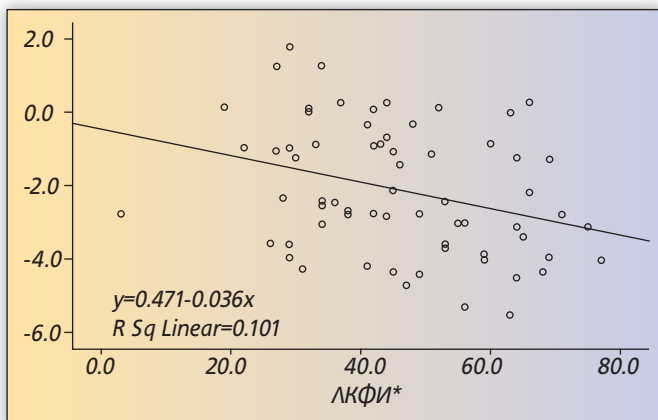
\*R корелационен коефициент – Спирман корелация

ето е в съответствие с установената слаба негативна корелация между НО-1 и BNP. За валидизация на резултата изследвахме връзката на BNP с ЛКФИ, посочваща силна зависимост между двата показателя (фиг. 3), изключваща евентуален проблем с BNP-анализа, съответно липсата на корелация между НО-1 и BNP. Отбелязва се статистически значим прогностичен ефект на показателите, определящи големината на ЛК, ЛК диаметри и обеми върху плазмената НО-1 (табл. 3 и 5, фиг. 4 и 5).

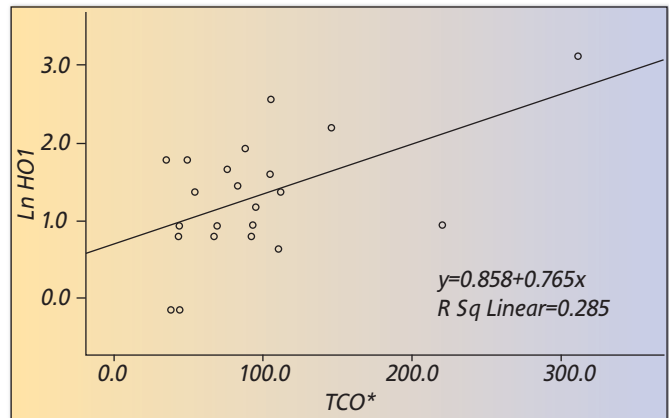
Провеждането на многофакторния линейно-регресионен анализ определи ТДО и ПМ като прогностични показатели с независим от останалите, изследвани и включени в анализа фактори, ефект върху плазмените нива на НО-1 (табл. 6).

### Дискусия

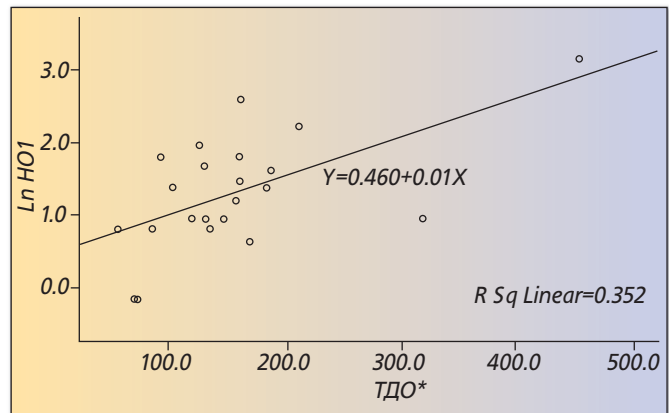
Въпреки вътреклетъчната локализация на ензима, включването му в патологичните процеси при паци-



Фиг. 3. Връзка между BNP и ЛКФИ: линейно-регресионен анализ; \*p>0.05



Фиг. 4. НО1 като функция на телесистолния обем; \*p<0.05



Фиг. 5. НО-1 като функция на теледиастолния обем; \*p<0.05

Характеристика	R2	F	B	p
Хронично ПМ	0.916	8.179	-1.985	0.04
Функционален клас			1.38	NS
Общ BR			0.046	NS
ТДО			0.006	0.04

Табл. 6. Многофакторен линейно-регресионен модел

енти с ХСН намира израз в установените различия в плазмените нива между случаи и контроли. Счита се, че високата генна експресия на ензима води до и/или е израз на самоограничителен патологичен процес. Експресията на НО-1 протеин е оценена от Li и сътр. в моноцити и лимфоцити от пациенти с миокарден инфаркт (МИ), нестабилна стенокардия (НАП) и стабилна стенокардия (САП).<sup>2</sup> Отчетени са били статистически значими различия в експресията на НО-1 както следва: най-висока експресия за групата с ОМИ, следвани от НАП и САП. При пациенти с ангиографски доказана коронарна болест експресията на НО-1 е била най-висока при пациенти с най-изразени коронарни промени.

Morsi и сътр. осигуряват надеждни данни чрез изследване на ендотелни клетки от пациенти с напреднали или начални коронарни лезии, както и от чисти коронарни съдове. Експресията на НО-1 и решаващо нейната биологична активност, изразена като количество билирубин на тг протеин, са били установени само в клетки от напреднали атеросклеротични лезии.<sup>3</sup> Понижената експресия на НО-1, генетично опреде-



лена като дълги (>29 повторения) полиморфни алели на HO-1 ген промотер, са независим прогностичен маркер за стеноза след перкутанна коронарна интервенция и стентирание.<sup>4</sup> Този резултат, установен от Gulesserian T и сътр., води до заключението, че хемоксигеназната система е с хетерогенен ефект по отношение на различните групи ССЗ, което не позволява механичното прехвърляне на резултатите по отношение на HO-1 от една нозологична единица към друга и обратно.

Резултатите позволяват да се направи извода, че ефектът на системната хемоксигеназна протекция при пациенти с ХСН се осъществява само от един от трите елемента, продукти от експресията на HO-1. Наличието на значима негативна линейна зависимост със стойностите на серумния билирубин доказва водещата роля на този елемент при пациенти с ХСН. Ангажирането основно на този компонент на системата е вероятно следствие от включването предимно на антиоксидантния потенциал на HO-1. Счита се също, че потенциално протективният ефект на билирубина надхвърля неблагоприятните ефекти на желязото, също продукт от действието на хемоксигеназната система. В потвърждение на описания начин на действие на HO-1 е липсата на зависимост между стойностите на HO-1 и стойностите на серумния феритин, хемоглобин и желязо, както и липсата на значима зависимост със стойностите на пулмоналното налягане, таргетна точка за действието на въглеродния оксид, другият също важен продукт от действието на HO-1.

Въпреки липсата на достатъчно данни за ефекта на HO-1, Yache и сътр. установяват, че понижена или липсваща експресия на HO-1 води до силно понижение на серумния билирубин и повишение на феритина. Пример в тази насока е клиничен случай, описващ 6-годишно момче с тежка HO-1 недостатъчност, водеща до хематурия, протеинурия, микроцитна хемолитична анемия, повишено отлагане на желязото, повишен феритин и фактор на von Willebrand, маркиращ ендотелна увреда.<sup>5</sup>

Данните на Yache A и сътр. контрастират с установената от нас негативна корелационна зависимост между HO-1 и билирубина. Възможните обяснения са в следните насоки:

1. При пациенти с ХСН експресията на HO-1 е компенсаторно повишена, предвид съществуващите до момента данни за повишена експресия при патологични състояния. Ниските плазмени нива на ензима са резултат от изчерпване в интензивните патологични процеси на ХСН, свидетелство за което е силната зависимост между HO-1 и ЛК размери и обеми, съответ-

но симптоми на ХСН, изразено като сигнификантна разлика между нивата на HO-1 в различните категории на ФК, както и при сравнение със здрави контроли.

2. Второто възможно обяснение включва генетично заложен дефицитна експресия на HO-1 при пациенти с ХСН, което е малко вероятно в конкретния случай, тъй като би съответствало на ниска биологична активност на ензима с ниски стойности на билирубина, при липса на описаната от нас негативна корелационна зависимост между HO-1 и BR.

Стойностите на HO-1 са в значима позитивна връзка със ЛК размери, отнасящо се както до телесистолните и теледиастолни диаметри, така и до ЛК обеми, маркирайки тежка кардиодилатация. Наличието на позитивна корелационна зависимост между размерите на ЛК и HO-1 доказва допълнително тезата за изчерпване на ензима в патологичните процеси при ХСН.

Основният проблем по отношение на връзката между повишената генна, ензимна активност и продуктите от HO-1 се отнася до възможното съществуване на феномена „причина или ефект“. Спорен остава и въпросът дали повишените нива и активност се отнасят до наличието на по-напреднало и сериозно заболяване, израз на опита на организма да ограничи болестния процес. Съществуващите до момента данни сочат, че активността на HO-1 води до протекция, насочена срещу патологичния процес. Независимо от огромния интерес към ензима, точната взаимовръзка на HO-1 и сърдечно-съдовите заболявания остават неизяснени.

### Перспективи за бъдещи научни изследвания

Перспективите за бъдещи проучвания изискват паралелно на периферните HO-1 нива, изследване на генната HO-1 експресия. Отправна точка за бъдещи проучвания е и динамичното проследяване на стойностите на HO-1 за регистриране на промените в хода на преход от асимптоматична ЛК дисфункция към тежка систолна дисфункция и дилатация.

Необходими са допълнителни изследвания върху по-голям брой пациенти с по-дълъг период на проследяване.

**В заключение**, плазмените HO-1 нива са понижени при пациенти с ХСН. Плазмената HO-1 корелира независимо със степента на ЛК дилатация, посредством наблюдаваната силна и независима линейно-регресионна зависимост с ТДО. Ефектът на HO-1 при пациенти с ХСН е независим от промените в неврохормоналната активация и действа по различен механизъм. Необходими са допълнителни изследвания върху конкретните механизми на нарушената регулация на HO-1 при пациенти с ХСН.

### Книзони

1. Stocker R, Perrella MA. Heme Oxygenase-1. A Novel Drug Target for Atherosclerotic Diseases? *Circulation* 2006; 114:2178–2189.
2. Idriss NK, Blann AD, and Lip G YH. Hemoxygenase-1 in Cardiovascular Disease. *J Am Coll Cardiol* 2008; 52 (12):971–978.

Пълната библиографска справка е на разположение в издателството и може да бъде представена при поискване.