

# Кардиологический Вестник

---

**БЮЛЛЕТЕНЬ РОССИЙСКОГО КАРДИОЛОГИЧЕСКОГО НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННОГО КОМПЛЕКСА**

---



Том II (XIV)

№ 2

2007

# Зокардис®

зофеноприл таб. 7,5 мг; 30 мг №28

- Максимальное кардиопротективное действие
- Оптимальная антигипертензивная активность
- Максимальное снижение смертности при ОИМ



**МГНОВЕННОЕ РЕШЕНИЕ –  
СПАСЕННАЯ ЖИЗНЬ!**



БЕРЛИН-ХЕМИ  
МЕНАРИНИ

Российский кардиологический научно-производственный комплекс

---

# Кардиологический ВЕСТНИК

---

**БЮЛЛЕТЕНЬ РОССИЙСКОГО КАРДИОЛОГИЧЕСКОГО НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННОГО КОМПЛЕКСА**

---

Основан в 1987 году как БЮЛЛЕТЕНЬ ВКНЦ АМН СССР  
Возобновлен в 2006 году

---

№ 2

Том II (XIV)  
2007

*Редакционная коллегия:*

**Главный редактор Е.И. Чазов**

Ф.Т.Агеев, Р.С.Акчурин, Ю.Н.Беленков,  
С.А.Бойцов (заместитель главного редактора), С.П.Голицын,  
О.М.Елисеев (ответственный секретарь), В.И.Капелько, Ю.А.Карпов, В.В.Кухарчук,  
В.З.Ланкин, С.Н.Наконечников (ответственный секретарь), А.Н.Рогоза,  
Л.В.Розенштраух, М.Я.Руда, В.Е.Синицын, В.Н.Смирнов, И.Е.Чазова

**Передовая статья**

**Е.В.Парфенова, В.А.Ткачук.** Терапевтический ангиогенез: достижения, проблемы, перспективы **5**

**Оригинальные статьи**

**К.А.Рубина\*, Н.И.Калинина\*, Е.В.Семина, А.В.Потехина, А.Ю.Ефименко\*, Е.И.Ратнер, В.А.Ткачук, Е.В.Парфенова.** Роль Т-кадгерина в регуляции роста кровеносных сосудов **15**

**О.И.Писаренко, Л.И.Серебрякова, О.В.Цкитишвили, И.М.Студнева.** Реперфузия метаболическими протекторами уменьшает гибель кардиомиоцитов после окклюзии коронарной артерии у крыс **24**

**К.Б.Шумаев, А.Ф.Ванин\*, В.Л.Лакомкин, В.П.Мох, Л.И.Серебрякова, О.В.Цкитишвили, А.А.Тимошин, А.В.Максименко, О.И.Писаренко, Э.К.Рууге, В.И.Капелько, Е.И.Чазов.** Участие активных форм кислорода в модуляции гипотензивного эффекта динитрозильных комплексов железа **31**

**Н.В.Радюхина, П.Н.Руткевич, Т.И.Арефьева, А.В.Козлов, Т.Х.Гурская, А.Я.Шевелев, И.Н.Рыбалкин, Т.Н.Власик, О.П.Ильинская, Э.М.Тарарак.** Лентивирусная трансдукция малодифференцированных костно-мозговых клеток-предшественников in vivo **37**

**В.С.Жданов, М.М.Маревичев.** Проведение мониторинга атеросклероза аорты и коронарных артерий у практически здоровых людей **43**

**В.В.Кухарчук, К.А.Зыков, В.П.Масенко, Э.Ю.Нуралиев, Р.М.Шахнович, Е.Б.Ярочая.** Динамика воспалительного процесса у больных с острым коронарным синдромом и больных со стабильной стенокардией. Сообщение 1. Биохимические и иммунологические аспекты **48**

**В.А.Дмитриев, Е.В.Ощечкова, В.Н.Титов, А.Н.Рогоза, Т.В.Балахонова, О.А.Погорелова, В.П.Масенко, Д.М.Атауллаханова.** С-реактивный белок и интерлейкин-6 при поражении органов-мишеней на ранних стадиях у больных гипертонической болезнью **55**

**Обзоры**

**Ю.А.Романов, В.Н.Смирнов.** Стволовые клетки и регенерация сердца **61**

**А.Д.Турашев, Е.Г.Тищенко, А.В.Максименко.** Состояние, деструкция и реконструкция околочелочной углеводной оболочки люминальной сосудистой поверхности в атерогенезе **64**

**Е.Г.Тищенко, А.Д.Турашев, А.В.Максименко.** Регуляторные эффекты взаимодействия гликозаминогликанов углеводной выстилки люминальной сосудистой поверхности с низко- и высокомолекулярными лигандами **68**

**П.В.Галицин, А.Ю.Литвин, И.Е.Чазова.** Синдром обструктивного апноэ во время сна и дисфункция эндотелия **71**

**Исторические заметки**

**Е.И.Чазов.** Кардиология: ее официальное признание в Советском Союзе **76**

**Конференции, симпозиумы, образовательные курсы**

Образовательный Мастер-курс по артериальной гипертензии и сердечно-сосудистому риску **80**

**Хроника, информация, календарь проведения научных мероприятий**

Календарь проведения научных мероприятий  
Российские научные мероприятия 2007–2008 гг.  
Международные научные мероприятия 2007–2008 гг. **82**

**Editorial**

**E.V. Parfenova, V.A. Tkachuk.** Therapeutic angiogenesis: advances, problems, prospects **5**

**Original Articles**

**K.A. Rubina, N.I. Kalinina, E.V. Semina, A.V. Potekbina, A.Yu. Efimenko, E.I. Ratner, V.A. Tkachuk, E.V. Parfenova.** Роль Т-кадгерина в регуляции роста кровеносных сосудов **15**

**O.I. Pisarenko, L.I. Serebryakova, O.V. Tskitishvili, I.M. Studneva.** Reperfusion with metabolic protectors reduces cardiomyocytic death rates after coronary occlusion in rats **24**

**K.B. Shumayev, A.F. Vanin, V.L. Lakomkin, V.P. Mokh, L.I. Serebryakova, O.V. Tskitishvili, A.A. Timoshin, A.V. Maksimenko, O.I. Pisarenko, E.K. Ruuge, V.I. Kapelko, E.I. Chazov.** Involvement of active oxygen forms in the modulation of the antihypertensive effect of iron dinitrosyl complexes **31**

**N.V. Radyukbina, P.N. Rutkevich, T.I. Arefyeva, A.V. Kozlov, T.Kh. Gurskaya, A.Ya. Shevelev, I.N. Rybalkin, T.N. Vlasik, O.P. Ilyinskaya, E.M. Tararak.** IN vivo lentivirus transduction of low-differentiated bone marrow cell progenitors **37**

**V.S. Zhdanov, M.M. Marevichev.** Monitoring of aortic atherosclerosis and coronary arteries in apparently healthy individuals **43**

**V.V. Kukbarchuk, K.A. Zykov, V.P. Masenko, E.Yu. Nuraliyev, R.M. Shakhnovich, E.B. Yarovaya.** Time course of changes in an inflammatory process in patients with acute coronary syndrome and in those with stable angina pectoris. Communication 1. Biochemical and immunological aspects **48**

**V.A. Dmitriev, E.V. Oshchepkova, V.N. Titov, A.N. Rogoza, T.V. Balakbonova, O.A. Pogorelova, V.P. Masenko, D.M. Ataullakhanova.** C-reactive protein and interleukin-6 in target organ damage in early-stage hypertensive disease **55**

**Reviews**

**Ю.А.Романов, В.Н.Смирнов.** Стволовые клетки и регенерация сердца **61**

**A.D. Turashev, E.G. Tishchenko, A.V. Maksimenko.** The state, destruction, and reconstruction of pericellular carbohydrate-rich coating the luminal vascular surface in atherogenesis **64**

**E.G. Tishchenko, A.D. Turashev, A.V. Maksimenko.** Regulatory effects of the interactions of the glycosaminoglycans of the carbohydrate-rich lining of the luminal vascular surface with low and high molecular-weight ligands **68**

**P.V. Galitsin, A.Yu. Litvin, I.E. Chazova.** Sleep obstructive apnea and endothelial dysfunction **71**

**Historical Essay**

**E.I. Chazov.** Cardiology: official recognition in the Soviet Union **76**

**Conferences, Symposia, Postgraduate Courses**

Postgraduate Master Course in Arterial Hypertension and Cardiovascular Risk **80**

**Current Events, Information, Schedule of Scientific Measures**

Calendar of scientific congresses and conferences  
Russian scientific congresses and conferences in 2007–2008 **82**

Е.В.Парфенова, В.А.Ткачук

# Терапевтический ангиогенез: достижения, проблемы, перспективы

*E.V. Parfenova, V.A. Tkachuk*

***Therapeutic angiogenesis: advances, problems, prospects***

Ишемическая болезнь сердца (ИБС) и ее осложнения продолжают лидировать среди причин смерти в экономически развитых странах несмотря на значительный прогресс в контроле факторов риска и лечении, включая широкое распространение хирургических и эндоваскулярных методов реваскуляризации. В связи с этим разработка альтернативных методов улучшения кровоснабжения ишемизированных тканей остается актуальной. Терапевтический ангиогенез, который иногда называют биологическим шунтированием, представляет собой новую тактику улучшения перфузии ишемизированных тканей с помощью усиления естественных, но недостаточных процессов неоваскуляризации. Разработке этой лечебной тактики способствовало развитие современных представлений о молекулярных и клеточных механизмах регуляции роста и ремоделирования кровеносных сосудов. Толчок к интенсивному исследованию этих механизмов был дан более 30 лет назад Дж.Фолкнером, предложившим гипотезу о том, что прогрессирующее развитие злокачественных опухолей зависит от их васкуляризации [1]. Было показано, что опухоль продуцирует в большом количестве фактор, стимулирующий рост сосудов, который вскоре после этого Г.Д.Свет-Молдавский и К.Л.Чимишкян предложили использовать для реваскуляризации ишемизированного миокарда и лечения инфаркта миокарда (ИМ) [2]. Однако потребовалось около 20 лет интенсивных исследований, чтобы реализовать данное предложение. За эти годы были изучены молекулярные механизмы, регулирующие рост сосудов, выделены из опухоли основные ангиогенные факторы роста (ФР), выяснена их структура, получены рекомбинантные факторы и генетические конструкции с их генами. Со времени публикации первой работы по терапевтическому ангиогенезу в 1996 г. [3] прошло уже более 10 лет. За этот период времени было опубликовано более тысячи статей, посвященных данной проблеме. Огромный энтузиазм и надежды, вызванные многообещающими данными экспериментальных исследований и небольших, в основном неконтролируемых, клинических исследований, сменились разочарованием после получения результатов относительно больших двойных слепых плацебо-контролируемых клинических исследований, не подтвердивших однозначно эффективность этой тактики. В последние годы новые надежды были связаны с использованием стволовых клеток (СК) для терапевтического ангиогенеза и с данными экспериментальных исследований, свидетельствующими об ангиогенной эффективности различных ФР и их сочетаний, а также генетически модифицированных прогениторных клеток.

## Механизмы неоваскуляризации

Рост и образование сосудов в постнатальном периоде развития организма осуществляется через ангиогенез, артериогенез и васкулогенез. Ангиогенез представляет собой образование новых капилляров от посткапиллярных венул, которое осуществляется через активацию эндотелиальных клеток, экспрессию в них протеаз, деградацию внеклеточного матрикса, пролиферацию и миграцию этих клеток, образование ими первичных высокопроницаемых сосудистых структур, последующую стабилизацию и "взросление" этих структур за счет привлечения перидцитов и гладкомышечных клеток (ГМК) и организации их в сложную трехмерную сосудистую сеть [4]. Основным стимулом к ангиогенезу при физиологических и патологических состояниях является недостаток кислорода (гипоксия или ишемия), который через активатор транскрипции факторов ангиогенеза – индуцируемый гипоксией фактор-1 (HIF-1), индуцирует экспрессию многих ангиогенных факторов и прежде всего основного регулятора ангиогенеза как в эмбриональном, так и в постнатальном периоде развития организма – ФР эндотелия сосудов (VEGF) и его рецепторов. VEGF избирательно стимулирует пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток (ЭК), их предшественников и моноцитов, экспрессирующих рецепторы к нему, увеличивает сосудистую проницаемость, способствуя пропотеванию белков плазмы в околососудистое пространство, которое необходимо для миграции ЭК, индуцирует экспрессию эндотелиальной NO-синтазы и образование NO, что способствует вазодилатации и стимулирует экспрессию протеаз, разрушающих связи между ЭК и внеклеточным матриксом, что необходимо для направленной миграции клеток.

В процессе стабилизации и "взросления" вновь образованной незрелой сосудистой сети участвуют: 1) ангиопоэтин-1, подавляющий пролиферацию ЭК, уменьшающий сосудистую проницаемость, способствующий привлечению перидцитов; 2) тромбоцитарный ФР (PDGF), привлекающий перидциты и ГМК; 3) трансформирующий ФР-бета 1 (TGF-beta 1), стимулирующий синтез белков матрикса. Процесс ангиогенеза строго регулируется ФР во времени и пространстве, и это необходимо учитывать при планировании тактики терапевтического ангиогенеза. В постнатальном организме стабильное состояние сосудов поддерживается балансом между активаторами ангиогенеза (в основном ФР и цитокинами) и его ингибиторами (тромбоспондином, ингибиторами матриксных металлопротеаз и активаторов плазминогена, эндостатином и др.), и сдвиг этого баланса в сторону активаторов, как правило, кратковременный, при-

водит к активации ангиогенеза, например, при воспалении, заживлении ран, ишемии. Недостаточный физиологический ангиогенез, обусловленный недостаточной продукцией ФР или экспрессией их рецепторов, либо увеличенной продукцией его ингибиторов, может способствовать нарастанию тяжести ишемических заболеваний (ИБС, хронической ишемии нижних конечностей). Ангиогенез приводит к увеличению плотности капиллярной сети в ишемизированных тканях и уменьшению периферического сосудистого сопротивления, что необходимо для обеспечения перфузии тканей, однако без ангиогенеза он недостаточен для полноценной ревазуляризации. Артериогенез – формирование коллатеральных сосудов из нефункционирующих артериолярных соединений – представляет собой наиболее эффективный процесс ревазуляризации, обеспечивая кровоток в обход места окклюзии. Важнейшим стимулятором артериогенеза является увеличение напряжения сдвига выше места окклюзии, обусловленное увеличением кровотока, что способствует экспрессии молекул адгезии клетками эндотелия и последующей аккумуляции моноцитов в стенке сосуда, секретирующих большое количество ФР, из которых основными регуляторами артериогенеза являются ФР фибробластов (FGF), а также PDGF, VEGF и CXС-хемокины [5].

Только у 25% больных со стенозирующим атеросклерозом коронарных артерий при окклюзиях хорошо развиваются коллатеральные сосуды, что может быть обусловлено генетическими факторами [5]. Степень развития коллатеральных сосудов у больных ИБС тесно коррелирует с увеличением экспрессии HIF-1 $\alpha$  моноцитами, взятыми от этих больных и помещенными в гипоксические условия [6], а также с экспрессией моноцитарного антигена CD44 [7]. Больные ИБС с хорошо развитыми коллатеральными сосудами характеризуются определенным фенотипом гаптоглобина и имеют более низкий уровень ингибитора ангиогенеза эндостатина в перикардиальной жидкости, чем пациенты с плохо развитыми коллатеральными [8]. Все это указывает на индивидуальную вариабельность состояния естественных механизмов неоваскуляризации, вероятно, генетически детерминированных, что может влиять и на эффективность ангиогенной терапии.

Васкулогенез – это формирование *in situ* кровеносных сосудов из прогениторных ЭК (ПЭК). Первоначально полагали, что истинный васкулогенез происходит только в эмбриональный период. Недавно ПЭК были выделены из периферической крови и костного мозга и получены доказательства их участия в формировании новых сосудов во взрослом организме, что изменило взгляд на васкулогенез, как на процесс, относящийся только к эмбриональному развитию [9]. Васкулогенез тесно ассоциирован с ангиогенезом и является обязательным участником формирования новых сосудистых отростков и неоваскуляризации, как физиологической (в ишемизированных тканях), так и патологической (в опухолях) [10–11]. Механизмы участия ПЭК в формировании новых сосудов включают несколько последовательных процессов: мобилизацию из костного мозга под влиянием ФР и цитокинов, образующихся в зонах ишемии, воспаления, злокачественного роста (GM-CSF, G-CSF, SDF-1, VEGF, Ang-1), направленную миграцию и аккумуляцию в зоне ишемии–повреждения

и инкорпорирование в сосуды – "homing" [9, 11]. Функциональное значение васкулогенеза для восстановления коронарного или периферического кровоснабжения пока не определено, хотя имеется много экспериментальных доказательств участия ПЭК в процессах неоваскуляризации на моделях ишемии миокарда и скелетных мышц. По обобщенным данным, доля этого участия, определяемая по степени инкорпорирования ПЭК в сосуды в зоне ишемии, варьирует от 3 до 40% [9].

Цель терапевтического ангиогенеза – обеспечить ревазуляризацию ишемизированных тканей за счет стимуляции естественных процессов образования и роста сосудов. Стратегия ангиогенной терапии включает в себя снабжение этих тканей 1) экзогенными ФР в виде рекомбинантных белков или генетических конструкций, 2) стволовыми или прогениторными клетками, 3) мобилизацию эндогенных стволовых и прогениторных клеток из костного мозга или тканевого депо, а также сочетание этих воздействий.

### Терапевтический ангиогенез с факторами роста

В регуляции ангиогенеза участвует большое количество факторов. Ангиогенная эффективность многих из них показана на моделях ишемии миокарда и скелетных мышц у животных, однако в клинических исследованиях основная доля приходится на VEGF и ФР фибробластов (FGF), являющихся представителями больших семейств ФР. Так, семейство ФР эндотелия сосудов представлено шестью факторами: VEGF-A (VEGF-1), VEGF-B (VEGF-3), VEGF-C (VEGF-2), VEGF-D, VEGF-E и PlGF, которые являются секретируемыми белками и связываются с тремя типами рецепторов: Flt-1 (VEGFR-1), Flk-2 (VEGFR-2), Flt-4 (VEGFR-3). VEGF-A, представленный 5 изоформами, состоящими из 121, 145, 165, 189 и 206 аминокислот, был идентифицирован первым, и изоформы VEGF-121 и VEGF-165 изучены наиболее хорошо как в экспериментальных, так и в клинических исследованиях [12, 13].

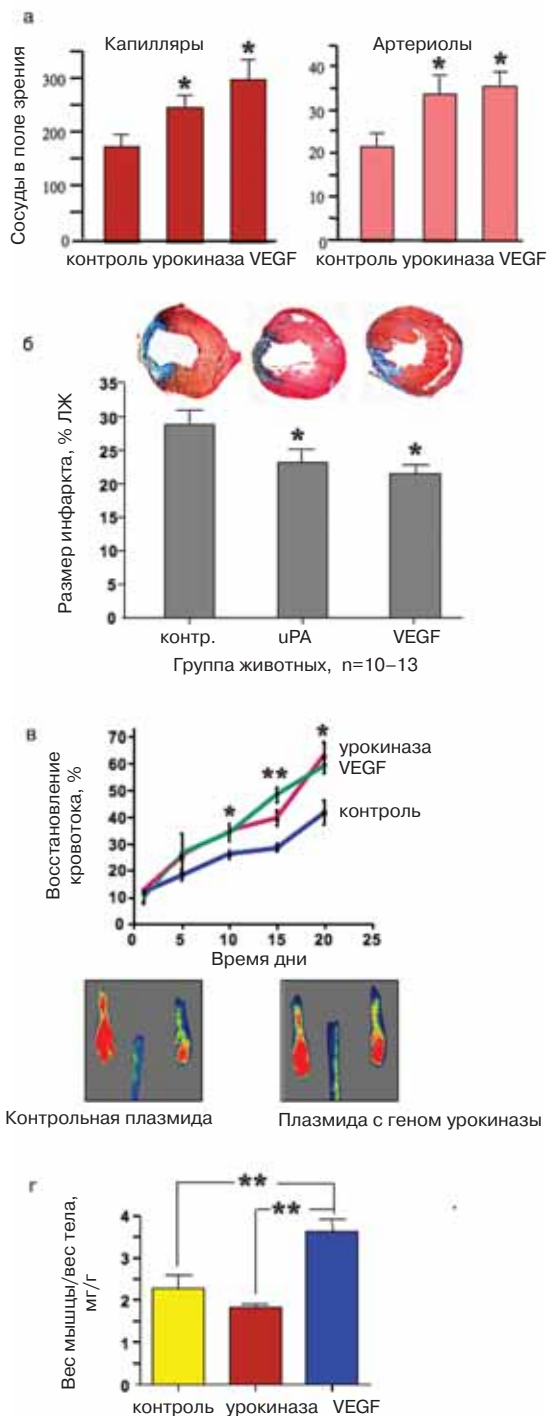
Из ФР фибробластов, представленных семейством, состоящим из 20 факторов, для терапевтического ангиогенеза использовали FGF-1 (aFGF), FGF-2 (bFGF) и FGF-4, связывающиеся гепаринсульфаты с высоким сродством и аккумулирующиеся во внеклеточном матриксе. FGF стимулируют пролиферацию и миграцию многих клеток, включая ГМК сосудов, и поэтому являются мощными индукторами артериогенеза. В экспериментальных исследованиях при введении FGF показан кардиопротективный эффект, связанный с подавлением апоптоза кардиомиоцитов (КМЦ), ангиогенный эффект, стимуляция ремоделирования сосудов и гипертрофии сердца [14–16].

Возможность неоваскуляризации ишемизированных тканей с помощью VEGF и FGF доказана в многочисленных экспериментальных работах с помощью гистологических, ангиографических, радионуклидных методов на моделях ишемии миокарда и скелетных мышц у грызунов (мыши, крысы, кролики), собак, свиней и овец [12–14]. Эти ФР использовали как в виде рекомбинантных белков, так и конструкций в плазмидном или аденовирусном векторе.

Первые неконтролируемые клинические исследования у больных ИБС и больных с критической ишемией нижних конечностей (КИНК), в которых

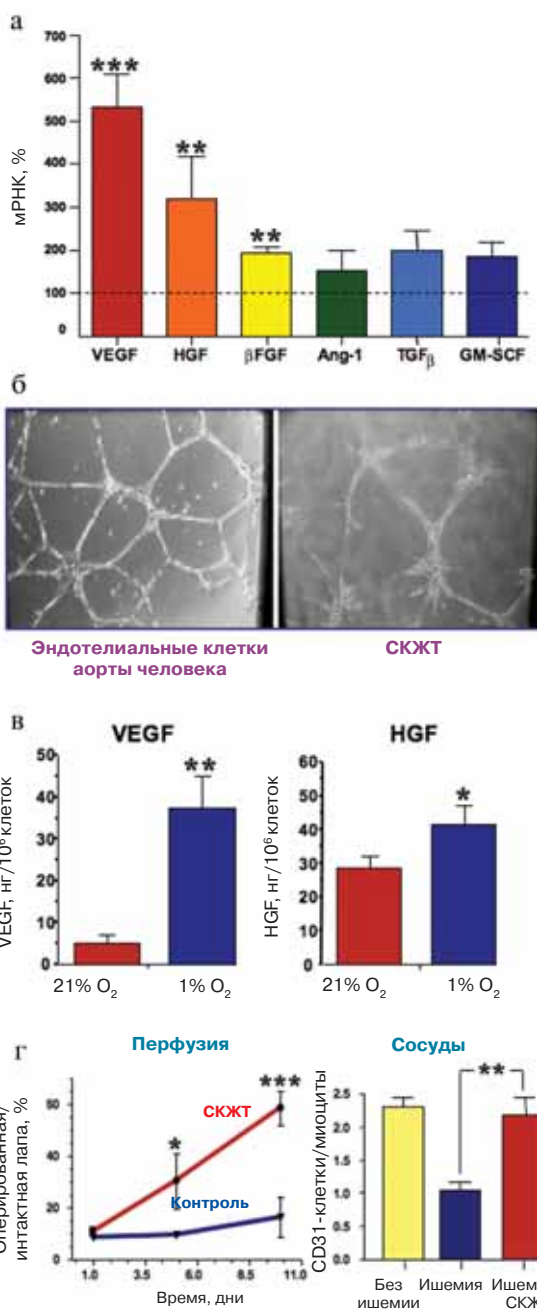
**Рис. 1. Влияние прямого введения плазмид с генами урокиназы и VEGF на ангиоартериогенез в сердце крысы и ишемизированной конечности мыши.**

*а* – количество капилляров и артериол в периинфарктной зоне на 14-й день после ИМ и введения плазмид (\* $p < 0,05$ ). *б* – размер формирующегося постинфарктного рубца на 14-е сут после перевязки ПНА и инъекции плазмид. Данные представлены в виде отношения площади рубца к площади ЛЖ на поперечных срезах сердца. *Вверху* – окраска срезов сердца по Маллори: богатая коллагеном область рубца окрашивается в синий цвет, а жизнеспособный миокард ЛЖ – в красный. *в* – восстановление перфузии подошвенной области ишемизированной левой конечности мыши (лазерное доплеровское сканирование, пример внизу) после введения плазмид. За 100% принят кровоток в неишемизированной правой конечности; *г* – оценка развития отека по изменению соотношения массы мышцы к массе тела мыши. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .



**Рис. 2. Ангиогенные свойства стромальных клеток ЖТ.**

*а* – увеличение экспрессии мРНК проангиогенных факторов СКЖТ в условиях гипоксии; *б* – влияние гипоксии на секрецию ангиогенных факторов (VEGF и HGF) стромальными клетками ЖТ; *в* – развитие капилляроподобных структур на поверхности матригеля ЭК аорты и стромальными клетками ЖТ человека; *г* – восстановление кровотока (перфузии) в ишемизированных конечностях иммунодефицитных мышей после введения СКЖТ человека (слева) и плотность капилляризации (CD31-позитивные клетки) в *m. tibialis anterior* мышцей, которым вводили контрольную среду (ишемия) и СКЖТ (ишемия+СКЖТ). Контроль – без ишемии. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .



данные двойных слепых плацебо-контролируемых исследований оказались менее оптимистичными [12, 13, 16]. В двух больших исследованиях, в которых тестировали внутрикoronарное введение рекомбинантных ФР (VEGF в исследовании VIVA у 178 больных ИБС, не являющихся оптимальными кандидатами для хирургической или эндоваскулярной реваскуляризации; FGF-2 в исследовании FIRST у 337 аналогичных больных) не удалось обнаружить различий с результатами в группах плацебо, так как и в контрольных, и в опытных группах отмечено

использовали рекомбинантные белки (VEGF-165, FGF-1 и FGF-2), дали весьма обнадеживающие предварительные результаты по эффективности. Однако

значительное повышение толерантности к физической нагрузке ТФН (VIVA, FIRST) и перфузии миокарда (FIRST) через несколько месяцев после процедуры. Похожая ситуация возникла и в исследовании TRAFFIC (FGF-2 двукратно вводили в бедренную артерию больным с КИНК), в котором более выраженное увеличение времени безболевой ходьбы у получавших FGF-2 в первые 3 мес нивелировалось через 6 мес за счет увеличения времени безболевой ходьбы в группе получавших плацебо. Тем не менее результаты этого исследования вселили некоторый оптимизм относительно возможности использования рекомбинантного FGF-2 при КИНК.

Внутримиокардиальное введение рекомбинантных FGF-1 и FGF-2 проводили во время аортокоронарного шунтирования (АКШ) [14, 15, 17]. Хотя оценка эффективности терапевтического ангиогенеза в сочетании с хирургической реваскуляризацией представляется очень сложной, а порой невозможной, исследование, в котором использовали FGF-2, заслуживает особого внимания. В этой работе (двойное слепое плацебо-контролируемое исследование) капсулы из гепариналгината, содержащие рекомбинантный FGF-2 или плацебо, вшивали под эпикард во время АКШ по ходу артерии, которую невозможно было шунтировать. Достоверно более выраженное улучшение перфузии миокарда в этой области зарегистрировано у больных, получивших капсулы с FGF-2. Причем положительный эффект этой процедуры регистрировался в течение 3 лет [17].

Возможно, неудачи контролируемых исследований по терапевтическому ангиогенезу с помощью рекомбинантных ФР были обусловлены неправильно выбранным способом введения фактора. Рекомбинантные белки имеют короткий период полужизни в кровотоке, к тому же показано, что при внутрисосудистом способе введения очень небольшая часть белка задерживается в миокарде: 0,1% при внутривенном введении и 5% при внутрикоронарном [18]. Для эффективного использования рекомбинантных ФР необходимо их локальное введение в миокард или скелетные мышцы в виде комплексов с матриксными белками, обеспечивающими длительное локальное высвобождение фактора.

Альтернативой терапии рекомбинантными белками может быть генная терапия. В отличие от рекомбинантных белков генетические конструкции работают в ткани-мишени от одной до нескольких недель и обеспечивают менее резкое и более длительное повышение содержания ангиогенного фактора, что позволяет избежать частых и многократных инъекций или инфузий. Однако генная терапия имеет и свои недостатки, связанные с введением чужеродного генетического материала и возможностью иммунного ответа при использовании для доставки генов аденовирусных векторов. В многочисленных экспериментальных работах, включая наши исследования [12–14, 19, 20], на моделях ишемии миокарда и ИМ как у мелких (мышь, крыса), так и у крупных (кролик, собака, свинья, овца) животных были получены бесспорные доказательства стимуляции как ангио-, так и артериогенеза, а также улучшения функции и перфузии миокарда или скелетных мышц при использовании плазмидных и аденовирусных конструкций, содержащих кодирующую часть генов ФР. В большинстве этих работ тестировали конструкции с VEGF и FGF (секретируе-

мый FGF-4), регулируемые цитомегаловирусным промотором.

Первые неконтролируемые клинические исследования по генной терапии ИБС и КИНК дали два важнейших результата. Во-первых, были доказаны хорошая переносимость, возможность выполнения и кратковременная безопасность введения в миокард и скелетные мышцы генетических конструкций, кодирующих ангиогенные факторы как при использовании плазмидных, так и аденовирусных векторов. Во-вторых, удалось апробировать разные способы введения генетических конструкций в сердце: 1) внутримыокардиальное, осуществляемое во время АКШ или через малую торакотомию, 2) трансэндокардиальное – с помощью катетера, имеющего специальное устройство для инъекций и датчик, сопряженный с системой электромеханического картирования полости левого желудочка (ЛЖ), позволяющей детектировать зоны гибернирующего миокарда и вводить препарат непосредственно в эту зону, 3) а также внутрикоронарное. Показаны возможность проведения и хорошая переносимость этих процедур. Практически во всех работах были получены положительные предварительные результаты их эффективности.

Однако двойные слепые плацебо-контролируемые исследования (фазы II/III) по генной терапии для стимуляции ангиогенеза дали смешанные результаты [13–16]. Так, в исследовании KAT (введение в коронарную артерию VEGF-165 в плазмидном и аденовирусном векторе с помощью инфузионно-перфузионного катетера после ангиопластики и стентирования) существенное улучшение перфузии миокарда отмечено только при использовании гена VEGF в аденовирусном векторе. В другом исследовании EVROINJECT-1 (плазмиду с VEGF-165 вводили в зону гибернирующего миокарда трансэндокардиально с помощью катетера NOGA под контролем электромеханического картирования полости ЛЖ у 80 больных ИБС с III–IV классом стенокардии) через 3 мес не было обнаружено различий с группой плацебо по величине дефекта перфузии, однако локальная сократимость стенки ЛЖ у получивших генную терапию значительно улучшилась. Эффективность трансэндокардиального способа введения генетических конструкций тестировали еще в двух работах – GENASIS и NOVA [14], которые были остановлены из-за осложнений, связанных с внутримыокардиальными инъекциями. Хотя трансэндокардиальный способ является наиболее привлекательным с точки зрения возможности точно локализованного и повторного введения, он сопряжен с высоким риском возникновения осложнений и требует специально обученного высокопрофессионального персонала.

В рандомизированном исследовании REVASC при внутримыокардиальном введении через малую торакотомию VEGF-121 в аденовирусном векторе повышалась толерантность к нагрузке и уменьшался класс стенокардии у 67 неоперабельных больных ИБС [13, 14]. Эти данные, с одной стороны, позволяют надеяться на то, что можно улучшить результаты лечения и прогноз у тяжело больных ИБС, которым невозможно провести реваскуляризацию, с другой стороны, к ним необходимо относиться осторожно, так как дизайн этого исследования исключал обследование адекватной контрольной группы больных. К тому же нельзя исключить, что торакотомия может стимулировать васкуляризацию миокарда.



Эффективность внутрикоронарного введения генетического материала – аденовирусной конструкции с геном FGF-4 – тестировали в серии контролируемых клинических исследований AGENT-1, 2, 3 и 4 [14, 15]. Хотя в первых работах (AGENT-1 – 79 больных, AGENT-2 – 85 неоперабельных больных ИБС) при использовании большой дозы аденовирусной конструкции отмечено увеличение ТФН и уменьшение дефектов перфузии, в следующем международном многоцентровом исследовании AGENT-4 (116 больных) различий с контрольной группой по увеличению ТФН не обнаружено, а аналогичное исследование AGENT-3 (416 больных) было остановлено из-за большого разброса значений ТФН в группах, что не позволяет получить достоверные различия. Однако при последующем анализе данных, полученных в разных подгруппах больных, было установлено, что генная терапия достоверно увеличивала ТФН в сравнении с контролем у пациентов старше 55 лет и с более тяжелой формой стенокардии (IV ФК).

Из трех завершенных рандомизированных двойных слепых клинических испытаний по генной терапии у неоперабельных больных с КИНК [13, 14] в одном (VEGF-165 вводили в плазмидном или аденовирусном векторе в бедренную артерию) получили положительный результат (увеличение числа коллатеральных сосудов), во втором (плазмидную ДНК VEGF-165 вводили внутримышечно) – смешанный (число ампутаций за 100 дней без изменений), но имело место улучшение по лодыжечно-плечевому индексу, заживлению трофических язв и уменьшению болей в покое), и в третьем (исследование RAVE: VEGF121 в аденовирусном векторе вводили внутримышечно в пораженную конечность) – отрицательный по всем конечным точкам. Введение VEGF не приводило к каким-либо серьезным осложнениям за исключением преходящих отеков, которые являлись следствием воздействия VEGF на проницаемость сосудов.

Почему же результаты контролируемых клинических исследований не оправдали ожиданий, которые были порождены данными экспериментальных и неконтролируемых клинических работ по терапевтическому ангиогенезу? Одна из причин – несоответствие многих экспериментальных моделей ишемии тканей и особенностей реваскуляризации миокарда и скелетных мышц у человека и животных, особенно у мелких животных, на которых выполняли большинство работ. Другой причиной может быть введение значительно меньших доз генно-терапевтических препаратов людям из-за опасения возможных осложнений. Так, крысам плазмиду с VEGF-165 вводили в дозах 125–500 мкг на животное массой 250–300 г, людям – в дозах 500–2000 мкг на человека, массой в среднем 75 кг. Осторожность в применении больших доз VEGF в клинических исследованиях связана с опасением возможной стимуляции латентных опухолей или развития ангиом, хотя ни в одном из завершенных контролируемых исследований подобных осложнений не отмечено. Поэтому генетические конструкции, в которых ген VEGF регулируется тканеспецифическим промотором, ограничивающим экспрессию ФР только тканью-мишенью, или промотором, регулируемым гипоксией, включающим экспрессию VEGF только в ишемизированной ткани, могут решить эту проблему.

Важным фактором, определяющим эффективную стимуляцию роста новых сосудов, является длительность повышения продукции ангиогенных факторов в ишемизированных тканях. По нашим данным [19, 20] и данным других исследователей [13, 14], длительность экспрессии трансгена (ФР) при использовании плазмидных или аденовирусных векторов при введении в ткани не превышает 2 нед. На модели трансгенных мышей, у которых экспрессия VEGF регулируется тетрациклином, показано, что для того, чтобы вновь образованные сосуды в зоне ишемии дошли до той точки своего развития (стабилизации), в которой они уже не регрессируют при снижении уровня VEGF, необходимо повышение концентрации VEGF в ткани в течение не менее чем 4 нед [21]. Такая длительная экспрессия не обеспечивается плазмидными или аденовирусными векторами, а во всех клинических исследованиях однократно вводили именно эти генетические конструкции. Решение данной проблемы может быть найдено при повторном введении плазмидных конструкций или при использовании векторов на основе аденоассоциированных вирусов, эффективно переносящих генетический материал в миокард и скелетные мышцы, обеспечивающих более длительную экспрессию трансгенов, непатогенных и низкоиммуногенных для человека [13, 14]. Активация эндотелиальной NO-синтазы является важной составляющей механизмов действия VEGF и FGF, поэтому недостаточная эффективность генной терапии может быть обусловлена наличием эндотелиальной дисфункции у больных атеросклерозом. Совместное использование генов VEGF и эндотелиальной NO-синтазы или простаглицинсинтазы [22, 23], а также введение фермента (DDAH), подавляющего активность эндогенного ингибитора эндотелиальной NO-синтазы (ADMA), позволяют значительно усилить эффективность генной терапии VEGF у экспериментальных животных [24].

Ангиогенез – сложный процесс, осуществляемый путем строго скоординированной во времени и пространстве работы многих факторов. Расширение арсенала ангиогенных факторов, используемых для терапевтического ангиогенеза, а также подбор оптимальных сочетаний и режимов их введения могут способствовать повышению эффективности лечебной тактики. В экспериментальных работах совместное использование VEGF и фактора стабилизации сосудов ангиопоэтина-1, а также тромбоцитарного ФР (PDGF-BB) в сочетании с FGF-2 индуцирует образование сосудистой сети, которая остается стабильной даже через 1 год после прекращения действия этих факторов [25, 26]. Еще одним подходом к более сбалансированной стимуляции ангиогенеза может быть создание генетических конструкций на основе гибрида геномной ДНК и кДНК форм гена VEGF, которые содержат экзоны и интроны в различно сплайсирующейся области, что обеспечивает экспрессию нескольких изоформ VEGF, как это естественно происходит в тканях [27]. Большие возможности генной терапии ИБС связывают с использованием ФР гепатоцитов (HGF), который эффективно стимулирует ангиогенез и обладает кардиопротективными свойствами, обусловленными его способностью активировать миграцию и мобилизацию резидентных СК сердца и подавлять развитие фиброза миокарда [28]. Другая стратегия может быть основана на использовании генов, кодирующих факторы, активирующие вклю-

чение многих ангиогенных молекул. Например, введение генетической конструкции, конститутивно экспрессирующей HIF-1 $\alpha$ , активирующий экспрессию ангиогенных факторов, эффективно стимулировало ревазуляризацию ишемизированной конечности кролика и тестируется в исследовании WALK [14–16] у больных с КИНК.

Результаты наших исследований свидетельствуют о том, что фактором, обеспечивающим более генерализованные сигналы к запуску ангиогенеза, может быть активатор плазминогена урокиназного типа (урокиназа) – сериновая протеаза, ключевой регулятор внеклеточного протеолиза и ремоделирования тканей [29]. У мышей, нокаутированных по гену урокиназы, подавлен артериогенез в ишемизированной конечности и ангиогенез в сердце, а VEGF не способен стимулировать ангиогенез в перинфарктной зоне, в то время как у диких мышей он оказывает выраженный ангиогенный эффект [30]. Эти данные подтверждают, что урокиназа опосредует ангиогенные эффекты факторов роста. Мы изучали эффекты внутримышечного и внутримышечного введения плазмидной конструкции с комплементарной ДНК (кДНК) урокиназы (человека, крысы и мыши) на моделях ишемии задней конечности у мыши и крысы и ИМ у крысы [19, 20]. Было показано, что урокиназа стимулирует развитие капилляров и артериол и увеличивает аккумуляцию макрофагов в перинфарктной зоне, уменьшает размер формирующегося ИМ, увеличивает васкуляризацию, ускоряет восстановление перфузии и предотвращает развитие некроза в ишемизированной конечности (рис. 1, а–г). Эффективность плазмидной конструкции с геном урокиназы была близка к эффективности подобной конструкции, содержащей ген VEGF, при этом урокиназа не вызывала отек конечности. Следует особо подчеркнуть, что ни в одном из случаев введения плазмид при ИМ и ишемии конечности не было отмечено формирования ангиом. Полученные результаты свидетельствовали о том, что генная терапия путем прямых внутримышечных/внутримышечных инъекций раствора плазмиды с кДНК урокиназы может эффективно стимулировать ангио- и артериогенез и улучшать перфузию ишемизированных тканей. Мы предполагаем, что преходящее увеличение содержания урокиназы в ишемизированных тканях может привести к стимуляции ангио- и артериогенеза благодаря активации латентных и высвобождению связанных в матриксе ангиогенных ФР; активации матриксных металлопротеаз, стимуляции миграции и пролиферации ЭК и ГМК сосудов; потенцированию действия ангиогенных факторов; привлечению моноцитов в участок ишемии и последующей секреции ими ангиогенных факторов и цитокинов; предотвращению тромбоза сосудов, который служит дополнительным фактором, усугубляющим ишемию тканей при нарушениях магистрального кровотока. Использование комбинированной генной терапии VEGF с урокиназой позволяет в 2 раза снизить дозу плазмиды VEGF без потери эффективности и уменьшить побочное действие терапии VEGF, проявляющееся в развитии отеков. На основе плазмидных генетических конструкций с кДНК урокиназы и VEGF-165 созданы лекарственные препараты для генной терапии, которые прошли токсикологические исследования и планируются для клинических испытаний у больных с КИНК.

### **Стимуляция неоваскуляризации с помощью клеточной терапии**

В последние годы новые надежды в области терапевтического ангиогенеза связаны с разработкой технологии клеточной терапии. Стимуляция ангиогенеза наряду с восстановлением поврежденного миокарда и его функции – основные цели клеточной терапии ИБС и ее осложнений. Эффективный миогенез в миокарде и скелетных мышцах невозможен без ангиогенеза, а ангиогенез – без миогенеза. Именно СК и прогениторные клетки потенциально способны стимулировать оба процесса [31]. Механизмы репаративного действия СК, полученных из взрослого организма, включают паракринные эффекты, связанные с их секреторной активностью, дифференцировку в специфические клетки ткани и сосудов и слияние с клетками ткани, что позволяет придать им новые свойства [15, 32]. Удельный вес каждого из этих механизмов до конца не определен и экспериментальные данные довольно противоречивы. Не углубляясь в вопросы, связанные с дифференцировкой в КМЦ, отметим, что участие СК в построении новых сосудов путем дифференцировки в ЭК продемонстрировано в нескольких экспериментальных работах с помощью трансплантации меченых клеток костного мозга [9–11]. Однако в значительной степени стимуляция неоваскуляризации при введении СК осуществляется за счет их секреторной активности. Это подтверждается тем фактом, что увеличение количества сосудов в миокарде экспериментальных животных отмечалось при введении практически всех типов клеток, используемых для клеточной терапии: гематопоэтических и мезенхимальных клеток костного мозга, предшественников ЭК (циркулирующих и костно-мозговых), клеток, полученных из пуповинной крови и даже скелетных миобластов [15, 32–37]. Как и при использовании генной терапии или рекомбинантных ФР (РФР), результаты экспериментальных и первых клинических работ по клеточной терапии были очень оптимистичными и свидетельствовали о возможности улучшить неоваскуляризацию ишемизированного миокарда и скелетных мышц, о безопасности и хорошей переносимости клеточной терапии. Однако при оценке ее эффективности в первых двойных слепых плацебо-контролируемых исследованиях получены весьма неоднозначные данные [15, 32–34]. В исследованиях REPAIR-AMI, ASTEMI и BOOST изучали эффективность введения в предварительно стентированную ответственную за ИМ артерию аутологичных клеток костного мозга (моноклеарной фракции или фракции, обогащенной ПЭК, – CD133<sup>+</sup>-клетками) или моноклеарных клеток периферической крови для предотвращения неблагоприятного ремоделирования ЛЖ у больных с ИМ с подъемом сегмента ST. В исследовании REPAIR-AMI были получены положительные результаты, а в аналогичном по дизайну исследовании ASTEMI – отрицательные. В исследовании BOOST увеличение фракции выброса (ФВ) через 6 мес было достоверно большим в группе получавших клеточную терапию, но через 18 мес это различие исчезло за счет увеличения ФВ в контрольной группе, однако скорость восстановления ФВ на протяжении всего периода наблюдения оставалась более высокой у пациентов, получавших клеточную терапию. Внутрикоронарное введение моноклеарной фракции костного мозга больным с постинфарктной сердечной недостаточностью

(TOPCARE-CHD) позволило в течение 1,5-летнего наблюдения улучшить функцию ЛЖ, снизить уровни мозгового и предсердного натрийуретических пептидов в крови, а также смертность [32, 33]. Неоднородные результаты были получены и при мобилизации клеток костного мозга с помощью цитокинов. Так, в исследованиях STEMMI и REVIVAL-2 [32, 35] мобилизация клеток с помощью гранулоцитоколониестимулирующего фактора (G-CSF) у больных с ИМ и успешной эндоваскулярной реваскуляризацией не приводила к более выраженному увеличению глобальной или локальной сократимости ЛЖ, а в исследовании FIRSTLINE-AMI с аналогичным дизайном сопровождалась более выраженным увеличением региональной и общей сократительной функции, диастолической толщины стенки в области инфаркта и предотвращала неблагоприятное ремоделирование ЛЖ.

В последние годы особый интерес в плане терапевтического ангиогенеза вызывают ПЭК, которые могут быть выделены из костного мозга, периферической и пуповинной крови. Показано, что *in vitro* они могут дифференцироваться в ЭК и КМЦ, а при введении в зону инфаркта у экспериментальных животных стимулируют неоваскуляризацию и инкорпорируются в сосуды [9–11]. Однако в клинических работах наряду с положительным влиянием на функциональное состояние и перфузию миокарда была отмечена высокая частота рестенозов и нарастания тяжести атеросклероза при введении фракции клеток костного мозга, обогащенной ПЭК (CD133<sup>+</sup>-клетками), в стентированную ответственную за ИМ артерию [36]. Учитывая, что ПЭК могут участвовать в репарации поврежденного эндотелия и в ангиоваскулогенезе, эти эффекты могут быть обусловлены избыточной репаративной реакцией и стимуляцией неоваскуляризации стенки поврежденного сосуда при введении в него ПЭК. В то же время внутримиокардиальное введение ПЭК во время АКШ в рандомизированном исследовании не вызывало подобных осложнений и приводило к более выраженному увеличению ФВ в группе клеточной терапии, особенно у больных с низкими ее величинами (<35%) [37].

В настоящее время вопрос о том, что эффективнее может стимулировать ангиогенез – селективно-изолированная популяция ПЭК или смешанная популяция мононуклеарных или мезенхимальных клеток костного мозга, не имеет ответа. Учитывая, что сосуд формируется несколькими типами клеток, логично предположить, что смешанная популяция, содержащая предшественники ЭК и ГМК, может оказаться более эффективной. Однако это предположение нуждается в подтверждении.

Поскольку не во всех контролируемых исследованиях по клеточной терапии оценивали перфузию миокарда, говорить о вкладе стимуляции ангиогенеза в улучшение функции сердца затруднительно. Однако результаты экспериментальных работ, которые явились основой для проведения этих клинических испытаний, позволяют утверждать, что стимуляция неоваскуляризации при введении клеток является одним из основных механизмов их терапевтического эффекта. Одной из причин недостаточной эффективности клеточной терапии может быть как раз снижение ангиогенной активности аутологичных прогениторных клеток у боль-

ных ИБС, особенно пожилого возраста. В наших исследованиях, проведенных совместно с отделением хронической ИБС и ангиологии, было показано, что общее содержание CD34<sup>+</sup>-клеток в периферической крови больных ИБС снижено вдвое по сравнению с таковым у людей того же возраста, но без ИБС\*. В других работах показано снижение ангиогенных свойств клеток костного мозга (способности формировать колонии, мигрировать в ответ на VEGF и SDF-1 и реваскуляризовать ишемизированную конечность иммунодефицитных мышей) у больных ИБС [38].

Учитывая весьма существенный вклад паракринных эффектов в неоваскуляризацию, возможно, что именно секреторная активность клеток, а не их дифференцировочные свойства, определяет ангиогенную и тканепротективную эффективность. Если это так, то усиление паракринных эффектов трансплантируемых клеток путем их генетической трансформации с помощью конструкций, содержащих гены ФР, может быть перспективным подходом к повышению эффективности клеточной терапии.

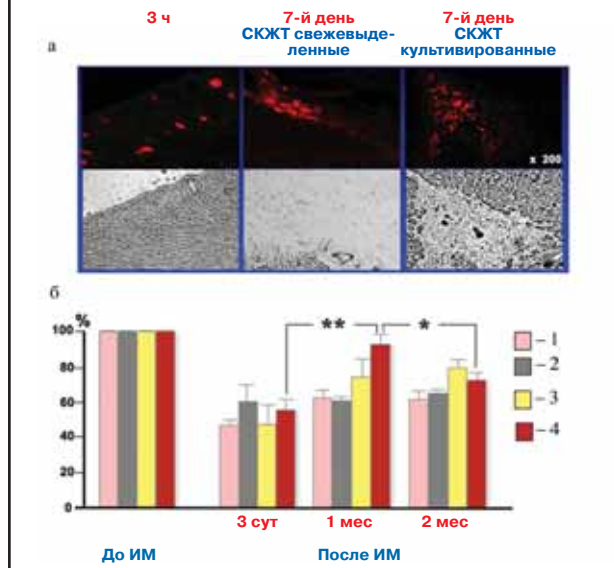
Использование генетически модифицированных СК и прогениторных клеток – сочетание генной и клеточной терапии – позволяет усилить положительные стороны каждого метода и нейтрализовать отрицательные. Введение в клетки генов ангиогенных и антиапоптотических факторов позволяет уменьшить гибель клеток после трансплантации, а также количество вводимых клеток, необходимое для достижения эффекта. Возможность *in vitro* помещать в клетки генетические конструкции, отбирать и вводить определенное количество модифицированных клеток позволяет преодолеть проблему низкой эффективности трансфекции при прямой генной терапии и проблему иммунного ответа при использовании аденовирусных векторов. Кроме того, появляется возможность относительно точно дозировать терапевтический эффект за счет определенного количества вводимых клеток.

Скелетные миоциты, трансдуцированные с помощью ретро- или аденовируса геном VEGF-165, более эффективно стимулировали ангиогенез и миогенез и улучшали сократительную функцию ЛЖ на моделях постинфарктной сердечной недостаточности, чем немодифицированные клетки [39], а использование модифицированных предшественников ЭК, гиперпродуцирующих VEGF, позволило в 30 раз сократить количество клеток, необходимое для достижения желаемого эффекта [40]. Наиболее впечатляющие результаты получены при введении в сердце мыши модифицированных ретровирусной конструкцией мезенхимальных клеток костного мозга, конститутивно экспрессирующих Akt-киназу – внутриклеточную сигнальную молекулу, опосредующую пролиферативные и антиапоптотические сигналы. Модифицированные клетки значительно лучше восстанавливали функцию сердца после инфаркта, чем немодифицированные [41]. Первоначально предполагали, что этот эффект обусловлен уменьшением апоптотической гибели введенных клеток; однако позднее было показано, что экспрессия Akt-киназы в несколько раз увеличивала экспрессию ФР клетками и, вероятнее всего, усиление паракринных влияний обусловило повышение терапевтической эффективности модифи-

\* Работа аспирантов О.Н.Выборова и М.М.Руда.

**Рис. 3. Влияние трансплантации СКЖТ на функцию сердца крысы после ИМ.**

а – DiI-меченные СКЖТ крысы визуализируются в перинфарктной зоне через 1 нед после введения (ув. 200); б – динамика ФВЛЖ сердца крыс (в % от исходных значений ФВ неповрежденного сердца крысы) в течение 2 мес после ИМ и внутримиокардиального введения физиологического раствора (1), летально облученных СКЖТ (2), свежеразделенных СКЖТ (3) и культивированных СКЖТ (4). \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .

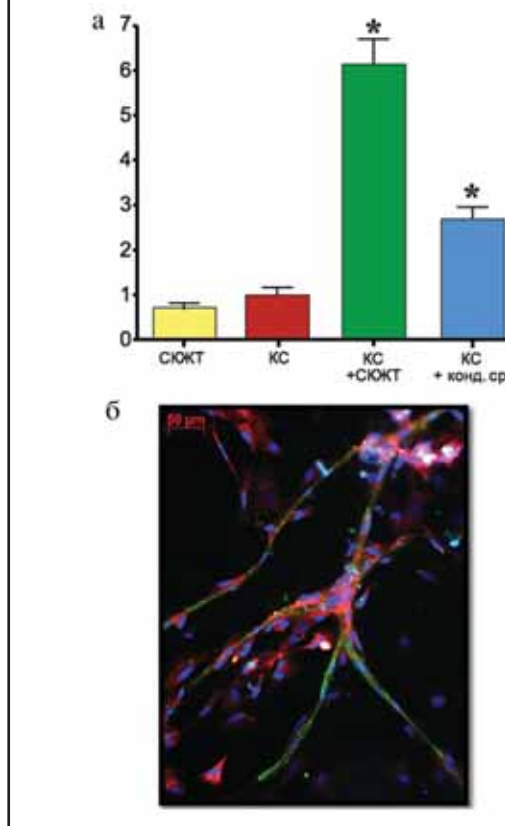


цированных клеток. Улучшить выживание клеток после введения в поврежденную и ишемизированную ткань и терапевтический эффект клеточной терапии позволяет предшествующая терапия ФР, стимулирующая ангиогенез [42].

В последние годы популяции мультипотентных клеток были выделены и из других соматических тканей. Особое внимание привлекает жировая ткань (ЖТ), доступная в большом количестве. Разные исследовательские группы продемонстрировали, что часть клеток, относящихся к стромальной, а не к адипоцитарной фракции ЖТ, при культивировании в специально подобранных условиях способна дифференцироваться в адипоциты, хондроциты, клетки костной и нервной тканей, ЭК и ряд других типов клеток [43]. Наши исследования были сосредоточены на оценке ангиогенных свойств и возможности стимулировать невазуляризацию с помощью этих клеток\*\* [20, 44]. Показано, что стромальные клетки ЖТ (СКЖТ), выделенные из продуктов липосакции человека или образцов ЖТ, полученных хирургическим путем, представляют собой гетерогенную популяцию клеток, содержащих более 25% CD34<sup>+</sup>-клеток. По мере культивирования клеток стромально-вазкулярной фракции ЖТ количество CD34<sup>+</sup>-клеток, ЭК и лейкоцитов постепенно уменьшается вплоть до полного исчезновения к 4-му пассажу и происходит обогащение популяции клетками, несущими маркеры мезенхимальных клеток костного мозга, до 98%. СКЖТ экспрессируют и секретируют широкий набор ангиогенных, кардиопротективных и антиапоптотических факторов, таких как VEGF, HGF, bFGF, TGF, GM-CSF и ангиопоэтин-2, причем в условиях гипоксии экспрессия и секреция этих факторов увеличивается в несколько раз (рис. 2, а, б). Среда культивирования СКЖТ значительно улучшает выживание микросудистых ЭК человека, культивируемых в обеднен-

**Рис. 4. Стимуляция ангиогенеза in vitro при сокультивировании популяции клеток, выделяемых из постнатальных сердец крыс, со стромальными клетками ЖТ.**

а – количество капилляроподобных структур, спонтанно формируемых СКЖТ, смешанной популяцией клеток, выделенных из сердец новорожденных крыс (КС), при сокультивировании СКЖТ и КС (КС+СКЖТ) и при добавлении к КС кондиционированной среды, собранной с СКЖТ (КС+конд. ср.); б – капилляроподобные структуры (КПС), образованные при сокультивировании клеток постнатальных сердец со СКЖТ. CD31-позитивные (зеленая флуоресценция) КПС происходят преимущественно из клеток сердца, CM-Dil-Cell Tracker-меченные СКЖТ (красная флуоресценция) не входят в состав КПС, а локализируются вдоль них. В отдельных случаях КПС демонстрируют смешанное происхождение, что, видимо, обусловлено плотным контактом CD31-позитивных клеток сердца с СКЖТ. \* $p < 0,01$ .

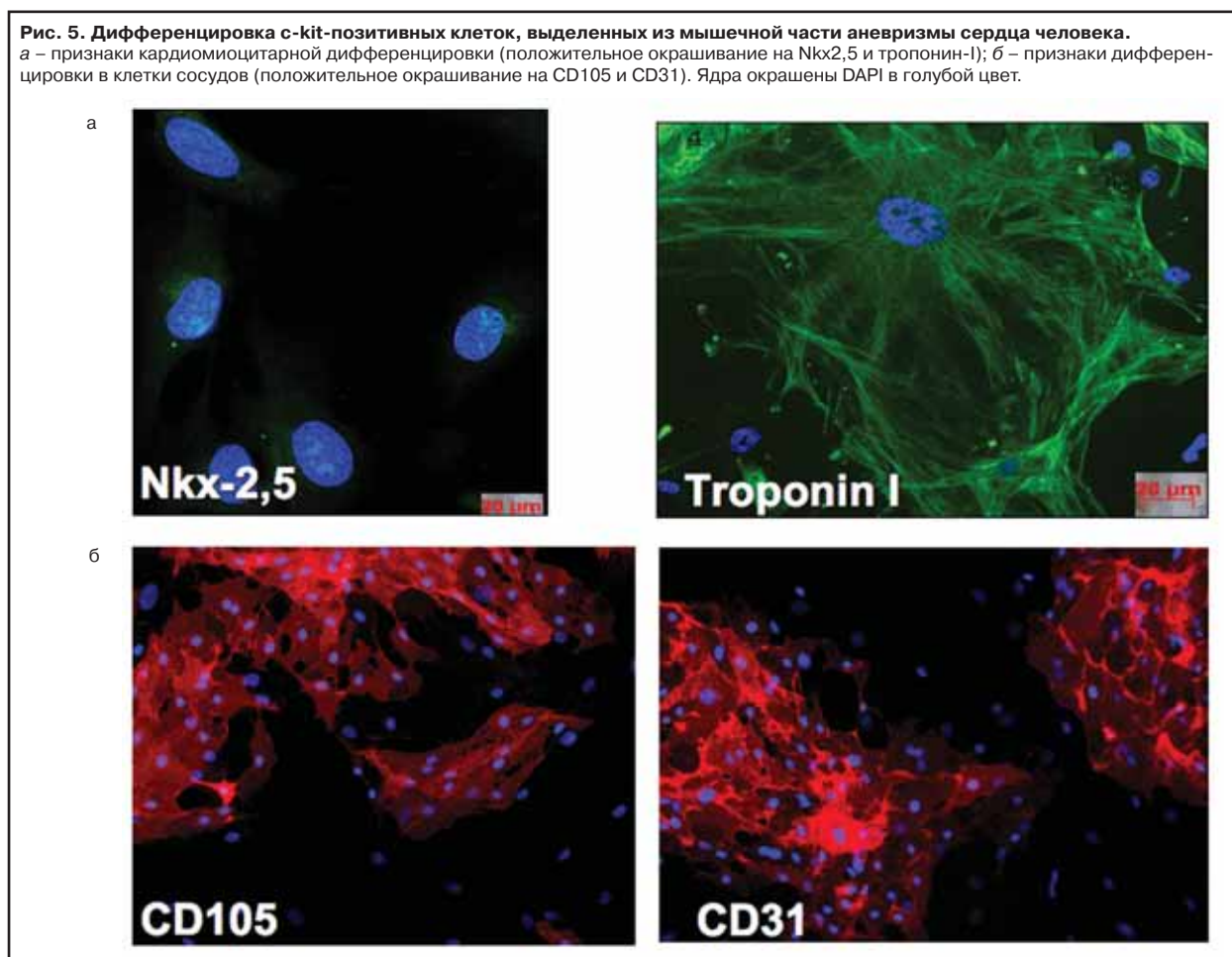


ной ростовыми факторами среде, а сами СКЖТ, как и ЭК, способны формировать капилляроподобные структуры на поверхности матрицеля (рис. 2, в). Имплантация под кожу мышам с иммунодефицитом матрицеля, в который помещены СКЖТ человека, приводила к значительной стимуляции прорастания в него сосудов мышцы, обусловленной паракринными эффектами СКЖТ, причем эта стимуляция была даже более выражена, чем эффект такого сильного стимулятора ангиогенеза, как bFGF. Введение СКЖТ человека в хвостовую вену или в мышцы конечности тимусдефицитных мышей линии NOD/SCID на следующий день после иссечения бедренной артерии предотвращало развитие некроза дистальных отделов лапы, стимулировало капилляризацию ишемизированных мышц, ускоряло восстановление кровотока в конечности (рис. 2, г).

На модели ишемии/реперфузии миокарда у крыс-самцов линии Lewis (модель, приближенная к клинической ситуации) внутримиокардиальное введение СКЖТ, полученных от крыс-самок той же линии, улучшало функцию ЛЖ и стимулировало

\*\* Работа выполнена в рамках гранта CRDF в сотрудничестве с Центром сосудистой биологии и медицины (дир. – проф. К.Марч) Университета Индианы (США) нашими сотрудниками Д.О.Тракуевым и З.И.Цоколаевой.

**Рис. 5. Дифференцировка c-kit-позитивных клеток, выделенных из мышечной части аневризмы сердца человека.**  
 а – признаки кардиомиоцитарной дифференцировки (положительное окрашивание на Nkx2,5 и тропонин-I); б – признаки дифференцировки в клетки сосудов (положительное окрашивание на CD105 и CD31). Ядра окрашены DAPI в голубой цвет.



ангиогенез в сердце через 1 мес после ИМ, однако через 2 мес этот эффект уменьшался (рис. 3) [45]. Доминирующая роль паракринных механизмов в кардиопротективном эффекте СКЖТ подтверждается тем, что именно культивированные клетки, показавшие наилучший эффект, секретируют значительно больше VEGF, чем свежeweделенные. По-видимому, при введении в ишемизированную ткань СКЖТ за счет высокой секреторной активности обеспечивают благоприятную среду для окружающих клеток, стимулирующую их выживание, активирующую пролиферацию сателлитных СК органа, подавляющую апоптоз клеток и усиливающую ангиогенез.

При исследовании эффектов сокультивирования СКЖТ крысы с клетками, выделенными из сердца новорожденных крысят\*\*\* [46], было обнаружено, что СКЖТ способствуют образованию большего количества более сложных (более ветвящихся) и стабильных сосудистых структур клетками постнатального сердца. Причем этот эффект обусловлен не только паракринными влияниями СКЖТ, а, возможно, и межклеточными взаимодействиями, так как при добавлении среды культивирования СКЖТ к клеткам, выделенным из сердца, наблюдался менее выраженный эффект (рис. 4, а). Сосудистые структуры, образованные эндотелиальными (CD31<sup>+</sup>) клетками сердца, были окружены СКЖТ, экспрессирующими маркер перикардиальных клеток NG2 (рис. 4, б). Наличие клеток, несущих маркеры перикардиальных клеток, в популяции СКЖТ было продемонстрировано и с помощью проточной цитофлуориметрии. Возмож-

но, что, помимо паракринных механизмов стимуляции неоваскуляризации, при введении СКЖТ они могут непосредственно участвовать в формировании сосудов и их стабилизации за счет перикардиальных клеток, имеющих в их составе.

Кроме того, нам удалось показать, что СКЖТ хорошо поддаются трансдукции аденовирусными, лентивирусными, ретровирусными и аденоассоциированными вирусными векторами. Генетически модифицированные клетки, в которых гиперэкспрессирован ген VEGF, секретируют в 10 раз больше этого фактора, чем немодифицированные клетки. Таким образом, СКЖТ представляют собой популяцию клеток, обладающих высокой степенью пластичности, высокой интенсивностью пролиферации, высоким ангиогенным потенциалом, обусловленным в значительной степени их способностью секретировать многие проангиогенные и антиапоптотические факторы, и могут быть эффективным клеточным вектором для переноса терапевтических генов. При достаточно высоком содержании данного типа клеток в ЖТ, относительной безопасности и низкой травматичности их получения СКЖТ являются перспективными кандидатами для терапевтического ангиогенеза.

Еще одним альтернативным источником аутологичных клеток для стимуляции неоваскуляризации миокарда могут быть резидентные СК сердца, существование которых и их репаративные свойства были показаны в работах группы П.Анверза [47]. Эти примитивные клетки характеризуются экспрессией антигена СК c-kit и рецептора к ФР-гепатоцитов,

\*\*\* Работа К.А.Рубиной, В.Ю.Сысоевой и З.И.Цоколаевой.

который является хемоаттрактантом для этих клеток. Показано, что в периинфарктной зоне количество этих клеток увеличивается, они пролиферируют и дифференцируются в КМЦ, ЭК и ГМК сосудов. Выделенные из образцов эндомикардиальной биопсии эти клетки хорошо пролиферируют и при введении в область постинфарктного рубца способны улучшать функцию сердца и увеличивать количество жизнеспособного миокарда у иммунодефицитных крыс с моделью постинфарктной сердечной недостаточности [48]. Возможность использования резидентных СК сердца для его регенерации и реваскуляризации является очень привлекательной, однако существенная проблема, ограничивающая перспективу их клинического применения, заключается в сложности их получения: для этого требуется биопсия миокарда. Нами исследована возможность выделения c-kit позитивных клеток из ткани аневризмы сердца, иссеченной в ходе хирургического вмешательства. Работа проведена совместно с отделом сердечно-сосудистой хирургии РКНПК и факультетом фундаментальной медицины МГУ им. М.В.Ломоносова [49]. В мышечной части аневризмы при иммуногистохимическом окрашивании обнаружены c-kit-позитивные клетки, располагающиеся кластерами между мышечными волокнами. Для получения из мышечной части аневризмы популяции клеток, обогащенных c-kit-позитивными клетками, мы использовали метод иммуномагнитной селекции. Последующее культивирование обогащенной популяции в дифференцировочных средах показало, что выделенные из аневризмы c-kit-позитивные клетки способны дифференцироваться в эндотелиальном, кардиомиоцитарном и нейрональном направлениях (рис. 5). Результаты этого пилотного исследования показывают, что из ткани аневризмы сердца, удаленной при ее хирургическом иссечении, можно выделить c-kit-позитивные клетки, вероятно, являющиеся резидентными СК сердца. Если это предположение подтвердится, то ткань аневризмы может стать источником аутологичных СК сердца для их изучения и, возможно, для клеточной терапии этой категории больных.

**Исследования авторов статьи выполнены при поддержке РФФИ (грант №06-04-081138-ОФИ) и CRDF (гранты №RB1-2454-МО-02 и RUB1-2869-МО-07).**

#### Литература

1. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971; 285: 1182–6.
2. Svet-Moldavsky GJ, Chmishkyan KL. Tumor angiogenesis factor for revascularization in ischemia and myocardial infarction. *Lancet* 1977; 1: 913–6.
3. Isner JM, Pieszek A, Schainfeld R et al. Clinical evidence of angiogenesis following gene transfer of pbVEGF165. *Lancet* 1996; 348: 370–4.
4. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 2000; 6 (4): 389–95.
5. Wustmann K, Zbinden S, Windecker S et al. Is there functional collateral flow during vascular occlusion in angiographically normal coronary arteries? *Circulation* 2003; 107: 2213–20.
6. Schultz A, Lavie L, Hochberg I et al. Interindividual heterogeneity in the hypoxic regulation of VEGF: Significance for the development of the coronary artery collateral circulation. *Circulation* 1999; 100: 547–52.
7. van Royen N, Voskuil M, Hoefer I et al. CD44 regulates arteriogenesis in mice and is differentially expressed in patients with poor and good collateralization. *Circulation* 2004; 109: 1647–52.
8. Panchal V, Rebman J, Nguyen A et al. Reduced pericardial levels of endostatin correlate with collateral development in patients with

ischemic heart disease. *J Am Coll Cardiol* 2004; 43: 1383–7.

9. Urbich C, Dimmler S. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circ Res* 2004; 95: 343–53.
10. Smadja DM, Cornet A, Emmerich J et al. Endothelial progenitor cells: characterization, in vitro expansion, and prospects for autologous cell therapy. *Cell Biol Toxicol* 2007; 23 (4): 223–39.
11. Dong C, Goldschmidt-Clermont PJ. Endothelial progenitor cells: a promising therapeutic alternative for cardiovascular disease. *J Interv Cardiol* 2007; 20 (2): 93–9.
12. Парфенова ЕВ, Ткачук ВА. Перспективы генной терапии сердечно-сосудистых заболеваний. *Вопр. мед. хим.* 2000; 46: 293–310.
13. Yla-Herttuala S, Rissanen TT, Vajanto I. Vascular endothelial growth factors: biology and current status of clinical application in cardiovascular medicine. *JMCC* 2007; 49: 1015–26.
14. Rissanen TT, Yla-Herttuala S. Current status of cardiovascular gene therapy. *Mol Ther* 2007; 15: 1233–47.
15. Tirziu D, Simons M. Angiogenesis in the human heart: Gene and cell therapy. *Angiogenesis* 2005; 8: 241–51.
16. Springer MA. Balancing act: Therapeutic approaches for the modulation of angiogenesis. *Curr Opin Invest Drugs* 2006; 7: 243–50.
17. Selke F, Labam R, Edelman E et al. Therapeutic angiogenesis with basic fibroblast growth factor: Technique and early results. *Ann Thorac Surg* 1998; 65: 1540–4.
18. Kornowski R, Fuchs S, Leon MB, Epstein SE. Delivery strategies to achieve therapeutic myocardial angiogenesis. *Circulation* 2000; 101: 454–8.
19. Tractuev D, Tsokolaeva Z, Shevelev A et al. Urokinase Gene Transfer Augments Angiogenesis In Ischemic Skeletal And Myocardial Muscle. *Mol Ther* 2007; 15 (in press).
20. Парфенова ЕВ, Цоколаева ЗИ, Трактюев Д.О. и др. Поиск новых "инструментов" для терапевтического ангиогенеза. *Мол. мед.* 2006; 2: 10–23.
21. Dor Y, Djonov V, Keshet E et al. Conditional switching of VEGF provides new insight into adult neovascularization and pro-angiogenic therapy. *EMBO J* 2002; 21: 1939–47.
22. Brevetti LS, Chang DS, Tang GL et al. Overexpression of endothelial nitric oxide synthase increases skeletal muscle blood flow and oxygenation in severe rat hind limb ischemia. *J Vasc Surg* 2003; 38: 820–6.
23. Hiraoka K, Koike H, Yamamoto S et al. Enhanced therapeutic angiogenesis by cotransfection of prostacyclin synthase gene or optimization of intramuscular injection of naked plasmid DNA. *Circulation* 2003; 108: 2689–96.
24. Jacobi J, Sydow K, von Degenfeld G et al. Overexpression of dimethylarginine dimethylaminohydrolase reduces tissue asymmetric dimethylarginine levels and enhances angiogenesis. *Circulation* 2005; 111: 1431–8.
25. Shyu K-G, Chang H, Isner JM. Synergistic effect of angiopoietin-1 and vascular endothelial growth factor on neoangiogenesis in hypercholesterolemic rabbit model with acute hind limb ischemia. *Life Sciences* 2003; 73: 563–79.
26. Cao R, Brakenbhiem E, Pauliuk R et al. Angiogenic synergism, vascular stability and improvement of hind-limb ischemia by a combination of PDGF-BB and FGF. *Nat Med* 2003; 9: 604–13.
27. Whitlock PR, Hackett NR, Leopold PL et al. Adenovirus-mediated transfer of a minigene expressing multiple isoforms of VEGF is more effective at inducing angiogenesis than comparable vectors expressing individual VEGF cDNAs. *Mol Ther* 2004; 9: 67–75.
28. Azuma J, Taniyama Y, Takeya Y et al. Angiogenic and antifibrotic actions of hepatocyte growth factor improve cardiac dysfunction in porcine ischemic cardiomyopathy. *Gene Therapy* 2006; 13: 1206–13.
29. Парфенова ЕВ, Плеханова ОС, Ткачук ВА. Активаторы плазминогена в ремоделировании сосудов и ангиогенезе. *Биохимия.* 2002; 6: 119–34.
30. Heymans S et al. Inhibition of plasminogen activators or matrix metalloproteinases prevents cardiac rupture but impairs therapeutic angiogenesis and causes cardiac failure. *Nat Med* 1999; 5: 1135–42.
31. Tomita S, Mickle DA, Weisel RD et al. Improved heart function with myogenesis and angiogenesis after autologous porcine bone marrow stromal cell transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002; 123: 1132–40.
32. Haider HK. Bone marrow cells for cardiac regeneration and repair: current status and issues. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2006; 4: 557–68.

33. Jolicoeur EM, Granger CB, Fakunding JL et al. Bringing cardiovascular cell-based therapy to clinical application: perspectives based on a National Heart, Lung, and Blood Institute Cell Therapy Working Group meeting. *Am Heart J* 2007; 153: 732–42.
34. Cho HJ, Lee J, Wecker A, Yoon YS. Bone marrow-derived stem cell therapy in ischemic heart disease. *Regen Med* 2006; 1: 337–45.
35. Kasrup J, Ripa RS, Wang Y, Jorgensen E. Myocardial regeneration induced by granulocyte-colony-stimulating factor mobilization of stem cells in patients with acute or chronic ischaemic heart disease: a non-invasive alternative for clinical stem cell therapy? *Eur Heart J* 2006; 27: 2748–54.
36. Bartunek J, Vanderbeyden M, Vanderkerckhove B et al. Intracoronary injection of CD133-positive enriched bone marrow progenitor cells promotes cardiac recovery after recent myocardial infarction. *Circulation* 2005; 112 (suppl. I): I-178–I-183.
37. Stamm C, Kleine HD, Choi YH et al. Intramyocardial delivery of CD133+ bone marrow cells and coronary artery bypass grafting for chronic ischemic heart disease: safety and efficacy studies. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2007; 133: 717–25.
38. Heesch C, Lehmman R, Honold J et al. Profoundly reduced neovascularisation capacity of bone marrow mononuclear cells derived from patients with chronic ischemic heart disease. *Circulation* 2004; 109: 1615–22.
39. von Degenfeld G, Banfi A, Springer ML, Blau HM. Myoblast-mediated gene transfer for therapeutic angiogenesis and arteriogenesis. *Br J Pharmacol* 2003; 140: 620–6.
40. Iwaguro H, Yamaguchi J, Kalka C et al. Endothelial progenitor cell vascular endothelial growth factor gene transfer for vascular regeneration. *Circulation* 2002; 105: 732–8.
41. Noiseux N, Gnechchi M, Lopez-Illasaca M et al. Mesenchymal stem cells overexpressing akt dramatically repair infarcted myocardium and improve cardiac function despite infrequent cellular fusion or differentiation. *Mol Ther* 2006; 14: 840–50.
42. Retuerto MA, Beckmann JT, Carbray J et al. Angiogenic pretreatment to enhance myocardial function after cellular cardiomyoplasty with skeletal myoblasts. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2007; 133: 478–84.
43. Zuk PA, Zhu M. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002; 13: 4279–85.
44. Трактуйев Д.О., Ткачук В.А., Марч К.Л., Парфенова Е.В. Стромальные клетки жировой ткани – мультипотентные клетки с терапевтическим потенциалом для стимуляции ангиогенеза при ишемии тканей. *Кардиология*. 2006; 46: 53–63.
45. Brian J, Tsokolaeva Z, Tractuev D et al. Preservation of heart function following myocardial infarction using abundant source of autologous stem cells derived from adipose tissue. *Circulation* 2005; 112 [suppl. II]: II-149.
46. Rubina KA, Tsokolaeva ZI, Melikbova VS et al. Stromal Vascular Cells stabilize vessel-like structures in vitro through cell-cell contacts and secreted angiogenic factors. *Proceedings of the Third International Meeting on Angiogenesis*. March 1–3, 2007. Amsterdam, the Netherlands. p. 69.
47. Leri A, Kajstura J, Anversa P. Cardiac stem cells and mechanisms of myocardial regeneration. *Physiol Rev* 2005; 85: 1373–416.
48. Smith RR, Barile L, Cho HC et al. Regenerative potential of cardiosphere-derived cells expanded from percutaneous endomyocardial biopsy specimens. *Circulation* 2007; 115: 896–908.
49. Рубина КА, Цоколаева З.И., Рахмат-Заде Т.М. и др. Аневризма сердца – новый источник мультипотентных клеток-предшественников. *Материалы XX съезда Физиологического общества им. И.П.Павлова, Москва, 4–8 июня 2007. Изд. дом "Русский врач": 80.*

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

К.А.Рубина\*, Н.И.Калинина\*, Е.В.Семина, А.В.Потехина, А.Ю.Ефименко\*, Е.И.Ратнер, В.А.Ткачук, Е.В.Парфенова

## Роль Т-кадгерина в регуляции роста кровеносных сосудов

Институт экспериментальной кардиологии,

\* Факультет фундаментальной медицины МГУ им. М.В.Ломоносова

**Цель исследования.** Выявление роли Т-кадгерина в регуляции роста кровеносных сосудов.

**Материалы и методы.** Исследование проводили на модели ангиогенеза в подкожном имплантате матригеля у мышей.

**Результаты.** Введение в бляшку матригеля клеток, гиперэкспрессирующих Т-кадгерин, достоверно подавляет рост новых сосудов в матригель по сравнению с контролем, но не влияет на созревание сосудов. Результаты экспериментов *in vitro* позволяют предположить, что механизм подавления роста сосудов заключается в подавлении миграции эндотелиальных клеток в результате гомофильного взаимодействия между молекулами Т-кадгерина на поверхности эндотелиальных клеток и клеток стромы матригеля.

**Заключение.** Т-кадгерин является ингибитором роста кровеносных сосудов.

**Ключевые слова:** ангиогенез, Т-кадгерин, миграция, эндотелий.

K.A. Rubina\*, N.I. Kalinina\*, E.V. Semina, A.V. Potekhina, A.Yu. Efimenko\*, E.I. Ratner, V.A. Tkachuk, E.V. Parfenova

Institute of Experimental Cardiology;

\* Faculty of Fundamental Medicine, M.V. Lomonosov Moscow State University

### ROLE OF T-CADGERIN IN THE GROWTH REGULATION OF BLOOD VESSELS

**Aim.** To elucidate a role of T-cadgerin in the growth regulation of blood vessels

**Materials and methods.** The investigation was performed on a murine model of the subcutaneous implant matrigel.

**Results.** Inserting into the matrigel plaque the cells that hyperexpress T-cadgerin significantly inhibits the growth of new vessels into the matrigel, as compared with the control, but it does not affect the maturation of the vessels. The results of *in vitro* experiments suggest that the mechanism responsible for inhibited vascular growth is to suppress endothelial cell migration due to the homophilic interaction between the molecules of T-cadgerin onto the surface of endotheliocytes and the matrigel stromal cells.

**Conclusion.** T-cadgerin is a blood vascular growth inhibitor.

**Key words:** angiogenesis, T-cadgerin, migration, endothelium.

Формирование и нарастание тяжести атеросклеротических поражений обусловлено интенсивным ростом кровеносных сосудов в адвентиции и самих поражениях. Ключевыми регуляторами роста и созревания сосудов являются кадгерин [1, 2], которые представляют собой семейство трансмембранных рецепторов, опосредующих зависимое от  $Ca^{2+}$  гомофильное узнавание и межклеточное взаимодействие. Клетки сердечно-сосудистой системы, включая эндотелий, перициты и гладкомышечные клетки (ГМК), содержат VE-кадгерин и N (R)-кадгерин [1–3], которые обеспечивают взаимодействие клеток сосудистой стенки друг с другом и поддерживают ее целостности [4, 5].

Клетки артериальной стенки, помимо известных кадгеринов, содержат нетипичный представитель кадгеринового семейства – T-кадгерин, который в отличие от “классических” кадгеринов закреплен в плазматической мембране посредством гликозилфосфатидилинозитольного (ГФИ) якоря и не имеет трансмембранный и цитоплазматический домен [6]. Такая структурная особенность свидетельствует о том, что T-кадгерин не участвует в межклеточной адгезии, а, по-видимому, играет роль сигнального рецептора на поверхности клетки [5, 7, 8]. Нами установлено, что в ГМК артериальной стенки T-кадгерин опосредует гормоноподобные сигнальные эффекты липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) [9, 10]. Кроме того, на клетках сосудистой стенки T-кадгерин также является рецептором высокомолекулярных комплексов адипонектина [11]. Этот белок представляет собой уникальный адипоцитарный гормон, который участвует в регуляции обмена липидов и глюкозы [12]. Адипонектин также способен подавлять рост клеток артериальной стенки и препятствовать ее ремоделированию при формировании атеросклеротических поражений или после баллонной ангиопластики. Гиперэкспрессия T-кадгерина в эндотелиальных клетках вены пуповины человека (HUVEC) вызывает изменения цитоскелета в этих клетках и повышает их миграционную активность [13, 14]. При исследовании каскадов внутриклеточной сигнализации, опосредующих эффекты T-кадгерина, обнаружено, что гомофильное взаимодействие между молекулами этого белка, располагающихся на соседних эндотелиальных клетках, приводит к активации малых связывающих GTP белков, RhoA/ROCK и Rac, с последующей реорганизацией актинового цитоскелета и формированием стресс-фибрилл [13].

Экспрессия T-кадгерина в эндотелиальных клетках, ГМК и перицитах артериальной стенки увеличивается при нарастании тяжести атеросклеротических поражений [15]. Кроме того, на модели баллонной ангиопластики сонной артерии крысы было установлено, что поздние стадии формирования неоинтимы также сопровождаются повышением экспрессии T-кадгерина клетками сосудистой стенки. Увеличение экспрессии T-кад-

герина в *vasa vasorum* адвентиции поврежденных сосудов при рестенозе и атеросклерозе, а также при неоангиогенезе, сопровождающем опухолевый рост, свидетельствует о том, что T-кадгерин может являться одним из регуляторов патологического ангиогенеза [16, 17].

Данное исследование было посвящено выяснению роли T-кадгерина в регуляции роста кровеносных сосудов. На модели ангиогенеза в подкожном имплантате матригеля было установлено, что T-кадгерин подавляет рост кровеносных сосудов. Результаты экспериментов *in vitro* позволяют предположить, что этот эффект обусловлен гомофильным взаимодействием молекул T-кадгерина на поверхности эндотелиальных клеток и строме матригеля, вызывающим торможение миграции этих клеток.

#### Материалы и методы

**Подкожная имплантация матригеля мышам.** Для исследования влияния T-кадгерина на рост кровеносных сосудов *in vivo* нами была создана модель локальной сверхэкспрессии T-кадгерина. Для имплантации использовали клетки линии L929, стабильно экспрессирующие T-кадгерин человека или контрольную плазмиду (pcDNA 3.1, "Invitrogen") [10, 14]. Клетки L929 культивировали на среде ДМЕМ, содержащей 10% фетальной телячьей сыворотки (ФТС), 100 Ед/мл пенициллина и 100 Ед/мл стрептомицина в инкубаторе при 37°C, 95% воздуха и 5% CO<sub>2</sub>.

Мышам линии NUDE под авертиновым наркозом (2,5% раствор авергина интраперитонеально) подкожно вводили  $1,7 \times 10^6$  клеток, смешанных с 400 мкл холодного (4°C) матригеля (BD Biosciences). Животных умерщвляли через 3, 7, 10 и 14 дней после имплантации и извлекали матригели для последующего анализа. Бляшки матригеля взвешивали, разделяли на две части, в одной из которых оценивали содержание гемоглобина, а вторую замораживали в жидком азоте в среде для замораживания образцов O.C.T. Compound (“Sakura Inc.”, Япония) для последующего иммунофлуоресцентного анализа.

**Оценка содержания гемоглобина.** Содержание гемоглобина в имплантатах матригеля оценивали с помощью метода Драбкина, модифицированного для тканей. Для этого фрагменты матригеля гомогенизировали в 200 мкл 0,9% раствора NaCl и центрифугировали при 5000 rpm в течение 7 мин. К полученному супернатанту добавляли хлороформ (100 мкл на 50 мкг матригеля) и центрифугировали при 13 000 rpm в течение 3 мин. К супернатанту добавляли 150 мкл гемолитика – концентрированного раствора Драбкина, и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин. Затем раствор центрифугировали в течение 2 мин при 13 000 rpm, объем полученного раствора гемцианида доводили до 0,5 мл с помощью 0,9% раствора NaCl и измеряли поглощение в нем при длине волны ( $\lambda$ ), равной 594 нм.



*Выявление сосудов с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания.* Кровеносные сосуды выявляли с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания замороженных срезов матригеля (толщиной 6 мкм), используя моноклональные антитела крысы, узнающие маркерный антиген эндотелия сосудов мыши, CD31 ("BD Pharmigen") и вторичные антитела осли против крысы, конъюгированные с флуорохромом Alexa595 ("Molecular Probes"), как описано ранее [18, 19]. Зрелые сосуды оценивали с помощью двойного иммунофлуоресцентного окрашивания срезов матригеля антителами против CD31 мыши и антителами против гладкомышечного актина ( $\alpha$ SMA) ("Epitomics") или маркера перicyтов NG2 ("Chemicon"). В этом случае использовали вторичные антитела осли против IgG крысы, конъюгированные с флуорохромом Alexa595 ("Molecular Probes"), и антитела осли против IgG кролика, конъюгированные с флуорохромом Alexa488 ("Molecular Probes"). Полученные препараты анализировали при помощи флуоресцентного микроскопа "ZeissAxiovert 200M". Документирование изображений проводили с помощью цифровой видеокамеры AxioCam HRC и обработки в программе "Axiovision" ("Zeiss", Германия).

*Подсчет сосудов и статистический анализ.* Размер сосудов и их плотность оценивали с помощью программного обеспечения "MetaMorph 5.0" ("Universal Imaging") и "ClickCounter". Плотность сосудов подсчитывали на срезах в 4–5 полях зрения (площадь поля зрения – 1,107 мм<sup>2</sup>) на трех случайных срезах для каждой бляшки матригеля при увеличении 100. При этом выделяли капилляры (CD31-положительные образования без просвета или длиной менее 20 мкм), сосуды среднего диаметра (CD31-положительные образования длиной 20–40 мкм) и крупные сосуды (диаметром более 40 мкм); число сосудов в каждой группе подсчитывали отдельно. Полученное число сосудов в каждом поле зрения нормировали на единицу площади среза.

*Оценка пролиферация эндотелиальных клеток (HUVES).* Влияние Т-кадгерина на пролиферацию HUVES изучали с помощью сокультивирования эндотелиальных клеток с клетками, экспрессирующими Т-кадгерин, взятыми в соотношениях 5:1, 2:1 или 1:1, на стеклах, покрытых фибронектином ("Sigma") в CO<sub>2</sub>-инкубаторе в течение 48 ч. Число делящихся клеток определяли с помощью подсчета клеток, содержащих ядерный антиген пролиферирующих клеток (PCNA), который выявляли с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания антителами мыши против PCNA человека ("DakoCytomation") в сочетании со вторыми антителами против мыши, конъюгированными с флуорохромом Alexa594 ("Molecular Probes"). Число PCNA-позитивных эндотелиальных клеток подсчитывали в 4–5 полях зрения на каждом стекле при увеличении 200. Полученное число клеток нормировали на общее количество HUVES в каждом поле зрения.

*Адгезия HUVES.* Влияние Т-кадгерина на адгезию изучали на модели прикрепления HUVES к пластике, покрытому растворами EC1 или EC5 рекомбинантных доменов Т-кадгерина, полученных ранее [20], бычьим сывороточным альбумином (BSA), или к монослою клеток, экспрессирующих Т-кадгерин. Для этого HUVES метили ацетилированными ЛППП, конъюгированными с флуоро-

хромом Alexa488 ("Invitrogen"). Далее 8×10<sup>4</sup> HUVES высевали в лунки 24-луночных планшетов, покрытых 0,2% раствором желатина, содержащим 0,1 мг/мл рекомбинантных доменов Т-кадгерина или BSA, и инкубировали в течение 2 ч. По окончании инкубации клетки промывали фосфатно-солевым буфером и подсчитывали их число.

*Апоптоз.* Влияние Т-кадгерина на апоптоз эндотелиальных клеток оценивали по активности каспазы-3 в этих клетках с помощью набора реагентов для колориметрического измерения активности каспазы-3 ("Caspase-3 Colorimetric Assay", "R&D Systems", "CN BF3100") согласно инструкциям производителя. В качестве положительного контроля для индукции апоптоза в культуру эндотелиальных клеток добавляли 1 нМ стауроспорина ("Sigma") и культивировали в течение 18 ч, после чего готовили клеточные лизаты, как описано ранее. Измерение поглощения в полученных растворах проводили при  $\lambda$ , равной 405 нм. Эксперименты проводили в трех параллелях и повторяли 3 раза.

*Формирование капилляроподобных структур.* Для оценки формирования капилляроподобных структур 5×10<sup>4</sup> HUVES высевали на 24-луночный планшет, покрытый матригелем без факторов роста (BD Biosciences), и инкубировали в среде культивирования для эндотелиальных клеток, как указано ранее, при 37°C в течение 24 ч [21]. Для определения влияния иммобилизованного Т-кадгерина на формирование капилляров, матригель в течение 12 ч пропитывали 0,1 мг/мл растворами доменов EC1 или EC5. Суммарную длину формирующихся капилляроподобных структур оценивали в 5 случайных полях зрения в каждой лунке, используя программу "MetaMorph 5.0" ("Universal Imaging"). Эксперименты повторяли трижды в 3 параллелях.

*Отрастание сосудов от экспланта аорты крысы.* Влияние Т-кадгерина на ангиогенез *in vitro* изучали на модели органной культуры сосудистого колечка крыс в матригеле [22]. Для этого грудную часть аорты самцов крыс тщательно очищали от окружающих тканей, нарезали на колечки длиной 3 мм и полимеризовали в матригеле без факторов роста ("BD Biosciences"), содержащем EC1 или EC5-домены Т-кадгерина в концентрации 0,0004–0,02 мг/мл. Экспланты инкубировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37°C в течение 14 дней, регистрируя образование капилляроподобных структур через 1 день. Эксперименты повторяли 4 раза в трех параллелях. Зону, занимаемую ветвящимися капиллярами, а также среднюю длину отрастающих капилляров анализировали с помощью программ "MetaMorph 5.0" ("Universal Imaging") и нормировали на единицу (1 мм) боковой поверхности аорты.

*Миграция HUVES в камере Бойдена.* Влияние Т-кадгерина на миграцию HUVES изучали в камере Бойдена с использованием мембраны с размером пор 8 мкм ("NeuroProbe, Inc."), как описано ранее [23]. Для этого верхнюю часть мембраны инкубировали в 0,2% растворе желатина, содержащем 0,1 мг/мл рекомбинантных EC1- или EC5-доменов. После инкубации мембраны в течение 12 ч при 37°C на нее высаживали HUVES (1×10<sup>5</sup> на лунку). Миграцию HUVES проводили в течение 4 ч при 37°C, используя в качестве аттрактанта среду ДМЕМ с ФТС в концентрации 1–10%. По оконча-

нии миграции мембрану с промигрировавшими клетками окрашивали красителем DIFF-QUICK, сканировали и анализировали полученные изображения с помощью программы “Image-J” (“National Institute of Health”). Эксперименты проводили в 5–6 параллелях и повторяли 3 раза.

*Статистический анализ всех данных* проводили с помощью критерия Манна–Уитни (Statistica 6.0).

## Результаты

*Модель локальной сверхэкспрессии Т-кадгерина.* Для исследования влияния Т-кадгерина на рост кровеносных сосудов *in vivo* мы создали модель локальной сверхэкспрессии Т-кадгерина. Для этого клетки линии L939, экспрессирующие Т-кадгерин, были имплантированы в матригеле мышам линии NUDE. Имплантированные клетки сохраняли жизнеспособность и экспрессировали Т-кадгерин на протяжении всего эксперимента. Бляшки матригеля извлекали через 3, 7, 10 или 14 сут после инъекции и оценивали степень васкуляризации матригеля сосудами, отрастающими от *a. subclavia*. Во всех случаях имплантаты матригеля с клетками линии L939, гиперэкспрессирующими Т-кадгерин, макроскопически отличались от контрольных (были меньшего размера, веса, а также имели более желтый оттенок).

Через 14 дней после имплантации масса бляшек, содержащих клетки, сверхэкспрессировавшие Т-кадгерин, была достоверно меньше контрольных ( $0,28 \pm 0,02$  и  $0,45 \pm 0,02$  г соответственно,  $p < 0,01$ ). Это различие было обусловлено, по-видимому, значительно меньшей васкуляризацией опытных имплантатов матригеля. Действительно, бляшки с клетками, экспрессирующими Т-кадгерин, содержали достоверно меньше гемоглобина ( $0,74 \pm 0,04$  единиц оптической плотности – ед. опт. пл.) на 1 г матригеля по сравнению с  $1,17 \pm 0,08$  в контроле;  $p < 0,05$ . Разница в содержании гемоглобина, отражающая уровень кровоснабжения бляшек, стала очевидной к 10-му дню, что соответствует времени, необходимому для прорастания сосудов и образования сосудистой сети в матригеле [18, 24]. По данным анализа динамики прорастания сосудов с 3-го по 14-й день после имплантации, содержание гемоглобина в бляшках матригеля с клетками, сверхэкспрессирующими Т-кадгерин, было ниже контрольных на всех этапах исследования (рис. 1). Это свидетельствует о том, что гиперэкспрессия Т-кадгерина подавляет прорастание сосудов в матригеле.

*Экспрессия Т-кадгерина подавляет образование капилляров, но не влияет на формирование зрелых сосудов.* Для выяснения, на какую стадию формирования сосудов (образование и рост или на созревание сосудов) влияет присутствующий в окружающей ткани Т-кадгерин, нами проанализированы плотность сосудов, их размер и качественный состав на срезах матригеля методом иммунофлуоресцентного окрашивания на разные маркеры сосудов. Срезы матригеля с разных частей бляшки окрашивали антителами против маркера эндотелиальных клеток CD31 (рис. 2, а, б, в, г, д). В зависимости от размера все сосуды были условно разделены на три группы: крупные сосуды диаметром более 40 мкм и/или просветом, сосуды среднего размера с диаметром от 20 до 40 мкм и капилляры диаметром менее 20 мкм. Разницы по

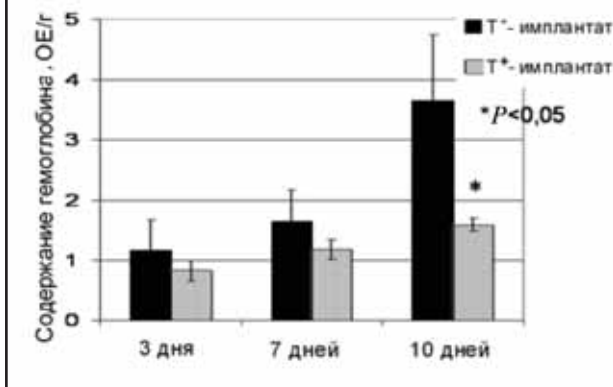
плотности крупных сосудов в матригеле с гиперэкспрессирующими Т-кадгерин клетками и в контрольных бляшках не наблюдалось:  $1,25 \pm 0,22$  и  $1,27 \pm 0,33$  соответственно;  $p > 0,05$ . В то время как в сосудах среднего диаметра ( $91,5 \pm 7,2$ ; в контроле –  $207,6 \pm 9,7$ ;  $p < 0,05$ ) и капиллярах (рис. 2, д) плотность сосудов была достоверно ниже в матригелях с гиперэкспрессирующими Т-кадгерин клетками, чем в контроле. В матригелях с контрольными L929 клетками большинство сосудов экспрессировали Т-кадгерин. Однако в матригелях, в которых L929 клетки экспрессировали Т-кадгерин, Т-кадгерин-позитивных сосудов было значительно меньше, чем в контроле (рис. 2, в, г, д). Таким образом, экспрессия Т-кадгерина в матригеле влияет на прорастание сосудов в бляшку, вызывая достоверное снижение плотности сосудов среднего размера и капилляров.

Одной из возможных причин снижения плотности сосудов в бляшках матригеля с гиперэкспрессирующими Т-кадгерин клетками могло быть негативное влияние Т-кадгерина на стабилизацию новообразующихся сосудов. Для ответа на вопрос, влияет ли локальная экспрессия Т-кадгерина фибробластами L929 на созревания прорастающих сосудов в матригеле, нами оценена плотность зрелых сосудов, окруженных перицитами или ГМК. Зрелые сосуды выявляли двойным иммунофлуоресцентным окрашиванием антителами против маркера эндотелиальных клеток CD31 в сочетании с антителами против  $\alpha$ -гладкомышечного актина или антителами против NG2-антигена – маркера перицитов [25, 26]. Разницы между плотностью зрелых сосудов (CD31/ $\alpha$ -актин или CD31/NG2-позитивные сосуды) в контрольных матригелях и в матригелях, содержащих Т-кадгерин-позитивные L929 клетки, обнаружено не было (рис. 3). Эти данные позволяют утверждать, что гиперэкспрессия Т-кадгерина в строме матригеля *in vivo* достоверно подавляет прорастание сосудов в бляшках, но не влияет на их созревание.

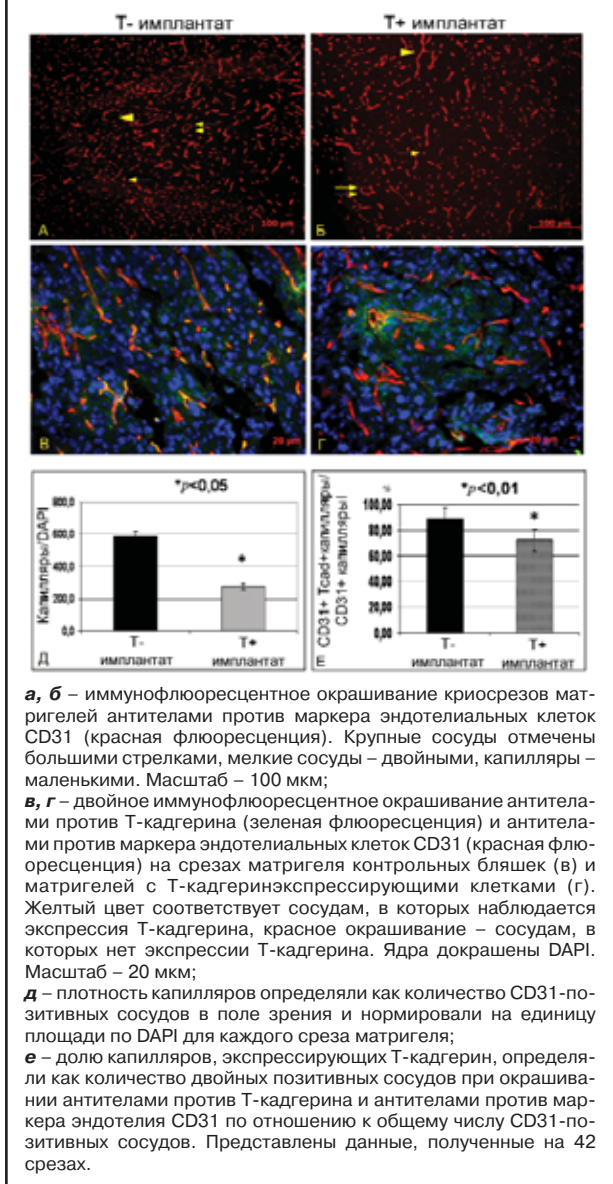
Рекомбинантные фрагменты Т-кадгерина активно используются в экспериментах *in vitro* для оценки эффектов кадгеринов на адгезию, пролиферацию и сортировку клеток [20, 27]. Для выявления возможного влияния Т-кадгерина на адгезию, пролиферацию, апоптоз и миграцию эндотелиальных клеток *in vitro* нами использовались рекомбинантные фрагменты Т-кадгерина (EC1 и EC5).

*Рекомбинантный аминотерминальный домен Т-кадгерина подавляет ангиогенез in vitro.* Для подтверждения предположения о том, что Т-кадгерин является ингибитором ангиогенеза, использовали рекомбинантные фрагменты Т-кадгерина для подавления формирования и роста капиллярных трубочек в матригеле, а также на модели сосудистого колечка *in vitro*. Аминотерминальный EC1 и С-концевой примембранный EC5 домены Т-кадгерина были выделены и очищены в стерильных условиях. Рекомбинантный Т-кадгерин и его фрагменты использовали в ряде работ, в которых изучали *in vitro* эффекты Т-кадгерина на клеточную адгезию и фенотип [20]. EC1-домен кадгеринов имеет определяющее значение для межклеточного узнавания и формирования контактов, в то время как домен EC5 часто используют в качестве негативного контроля [27]. Культивирование HUVEC, которые эндогенно экспрессируют

**Рис. 1. Содержание гемоглобина в имплантатах матригеля (n=14) на 3, 7 и 10-е сутки. \* $p < 0,05$ .**

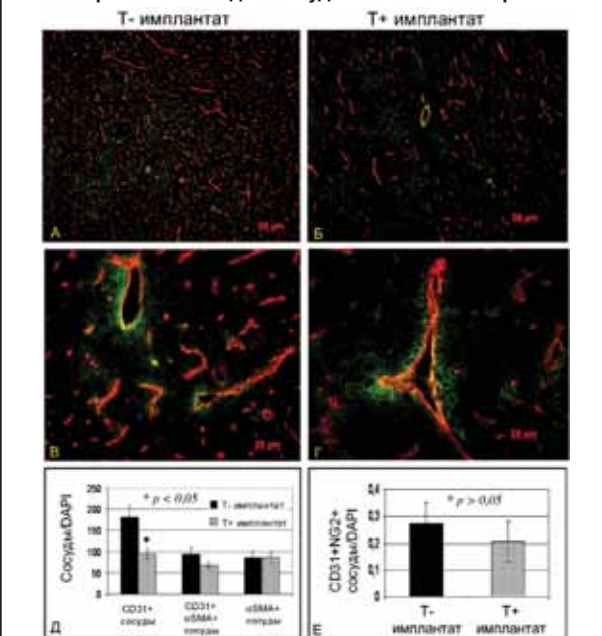


**Рис. 2. Вазкуляризация матригелей.**



Т-кадгерина, с растворимыми доменами Т-кадгерина EC1 и EC5 в концентрации 0,1 мг/мл не влияло на формирование капилляроподобных структур на матригеле *in vitro*. Однако при иммобилизации домена EC1 на поверхности матригеля (но не домена EC5) подавлялось формирование трубочек (рис. 4). В соответствии с этими данными были получены результаты на модели сосудистого

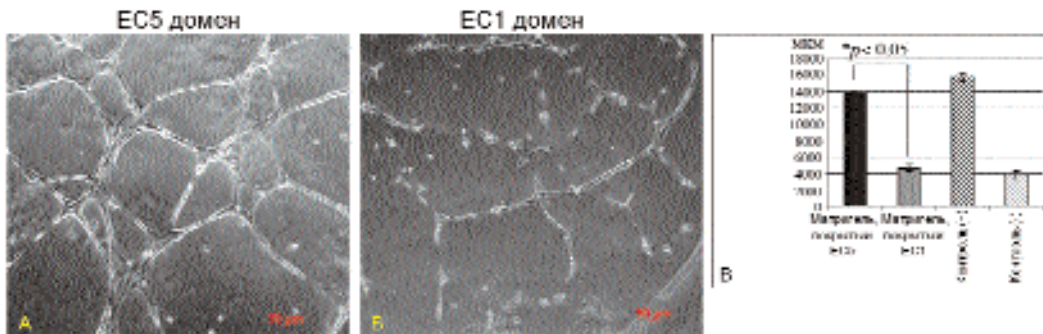
**Рис. 3. Зрелые и молодые сосуды на бляшках матригелей.**



колечка крысы: иммобилизация домена EC1 в матригеле снижала в 2–3 раза рост и ветвление капилляров по сравнению с контрольным доменом EC5. Этот эффект домена EC1 Т-кадгерина наблюдался в течение всего эксперимента (с 3 по 14-й день) и был зависимым от дозы (рис. 5). Результаты свидетельствуют о том, что растворенные фрагменты Т-кадгерина не влияют на рост и ветвление капилляров, в то время как иммобилизованный домен EC1 Т-кадгерина, по-видимому, имитирует гомофильное взаимодействие между клетками [25], что значительно подавляет ангиогенез на моделях *in vitro*.

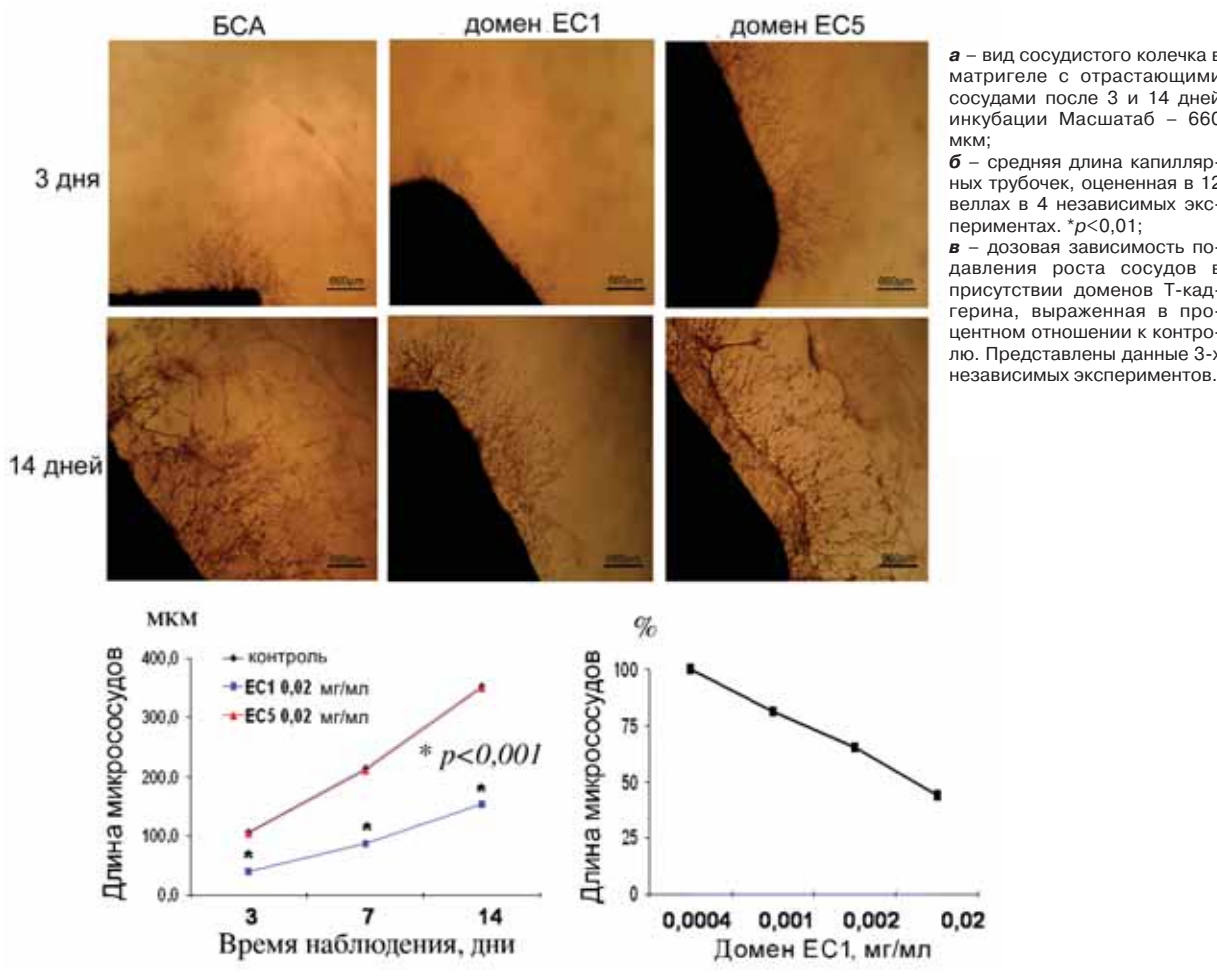
*Т-кадгерин подавляет миграцию эндотелиальных клеток, но не влияет на их адгезию, пролиферацию и апоптоз.* Для дальнейшего изучения механизма подавления ангиогенеза в присутствии Т-кадгерина исследовали его действие на адгезию, пролиферацию и апоптоз эндотелиальных клеток. Пролиферацию эндотелиальных клеток оценивали по уровню экспрессии белка PCNA. При сокультивировании HUVEC с клетками линий I929 или HEK293, экспрессирующими Т-кадгерин или контрольную плазмиду, достоверной разницы в количестве PCNA-позитивных эндотелиальных клеток не наблюдалось (рис. 6, а, б, в). Также при изучении адгезии HUVEC на пластике, покрытом доменами EC1 или EC5 или БСА, достоверной разницы по прикрепившимся эндотелиальным клеткам зарегистрировано не было. Аналогично экспрессия Т-кадгерина не влияла на адгезию эн-

Рис. 4. Формирование капилляроподобных структур *in vitro* клетками HUVEC в матрикеле, содержащем домены EC1 или EC5 T-кадгерина.



**а** – HUVEC в матрикеле с доменом EC5 (масштаб – 50 мкм); Домен EC5  
**б** – HUVEC в матрикеле с доменом EC1 (масштаб – 50 мкм); Домен EC1  
**в** – средняя длина капиллярных трубочек, оцененная в 4-х независимых экспериментах и повторенная в 3-х параллелях.

Рис. 5. Домен T-кадгерина EC1 подавляет рост капилляроподобных структур на модели сосудистого колечка крысы.

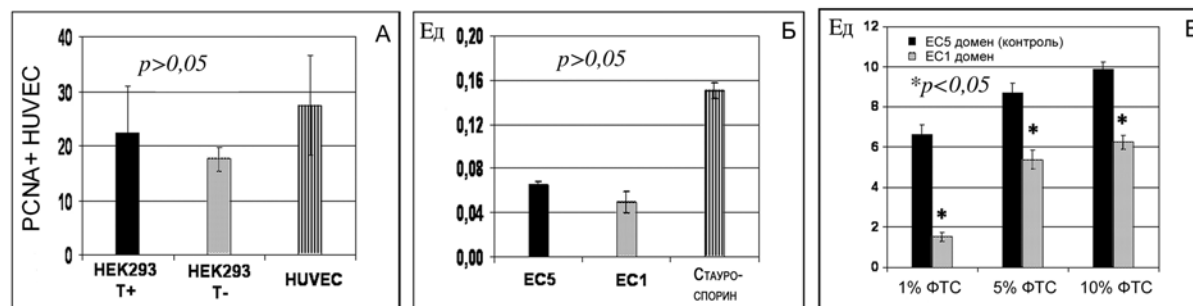


**а** – вид сосудистого колечка в матрикеле с отрастающими сосудами после 3 и 14 дней инкубации Масштаб – 660 мкм;  
**б** – средняя длина капиллярных трубочек, оцененная в 12 веллах в 4 независимых экспериментах. \* $p < 0,01$ ;  
**в** – дозовая зависимость подавления роста сосудов в присутствии доменов T-кадгерина, выраженная в процентном отношении к контролю. Представлены данные 3-х независимых экспериментов.

дотелиальных клеток на монослой I929 клеток, экспрессирующих T-кадгерин, по сравнению с адгезией на монослой контрольных клеток. Более того, культивирование HUVEC на пластике, покрытом доменом EC1 T-кадгерина (0,1 мг/мл), не вызвало активацию каспазы-3, ключевого участника апоптоза в HUVEC (рис. 6, б). Полученные данные позволяют утверждать, что обнаруженные при изучении ангиогенеза ингибиторные эффекты T-кадгерина не связаны с подавлением адгезии, пролиферации или активацией апоптоза эндотелиальных клеток.

Анализ миграции эндотелиальных клеток в камере Бойдена через мембрану, покрытую доменами T-кадгерин, показал, что домен EC1, участвующий в межклеточном узнавании, подавляет миграцию HUVEC в 2 раза по сравнению с контрольным доменом EC5 (см. рис. 6, в). Это позволяет предположить, что T-кадгерин опосредует свое негативное влияние на рост сосудов через подавление миграции эндотелиальных клеток. Такое предположение подтверждается и данными, полученными в экспериментах на модели сосудистого колечка крысы (рис. 5) и формирования капиллярных

Рис. 6. Влияние Т-кадгерина на пролиферацию, апоптоз и миграцию HUVEC.



**а** – пролиферация HUVEC при сокультивировании с клетками HEK293, гиперэкспрессирующими Т-кадгерин (HEK293+) или с контрольными HEK293, оцененная по числу PCNA-позитивных клеток;

**б** – оценка активности каспазы-3 в HUVEC при культивировании на пластике, покрытом доменом EC1, по данным колориметрического анализа. Представлены данные 3-х независимых экспериментов, повторенных в 6-х параллелях (*p* = 0,05);

**в** – миграция HUVEC в камере Бойдена через мембрану, покрытую рекомбинантными доменами Т-кадгерина. EC1 – аминоконцевой домен, EC5 – С-концевой домен.

трубочек в матрикеле *in vitro* (рис. 4), где было показано, что домен EC1, обеспечивающий гомофильное узнавание, имитирует межклеточное взаимодействие экспрессирующих Т-кадгерин клеток и подавляет такие связанные с миграцией процессы, как формирование, рост и ветвление капиллярных трубочек.

### Обсуждение

Во взрослом организме в норме сосудистая система находится в состоянии равновесия, процессы роста или регресса сосудов четко регулируются. Избыточный или недостаточный ангиогенез, как правило, сопутствует опухолевому росту, патологическому ремоделированию сосудов и различным гиперплазиям тканей. Поскольку рост опухолей связан с рекрутированием новых сосудов, подавление ангиогенеза считается перспективным подходом при терапии раковых заболеваний [28, 29].

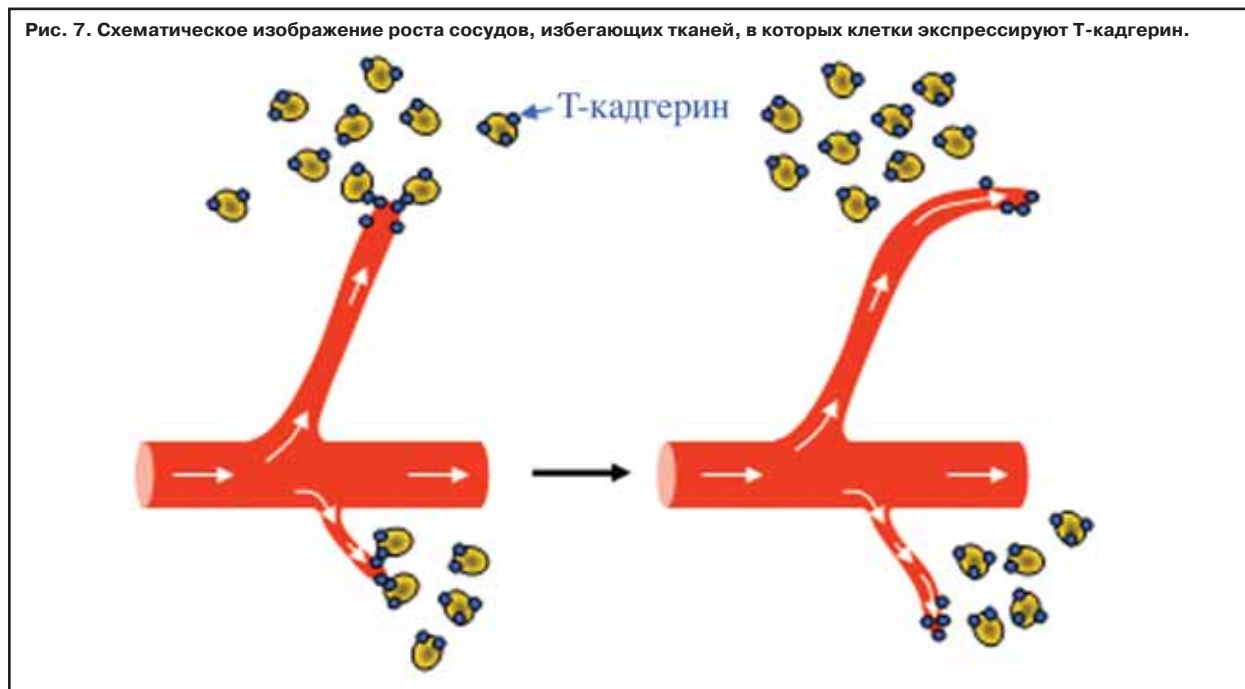
Т-кадгерин эндогенно экспрессируется в клетках сердечно-сосудистой системы: в кардиомиоцитах, эндотелии, ГМК и перицитах [15]. Уровень его экспрессии повышается при ряде заболеваний, связанных с избыточным ростом сосудов [15–17, 30]. Однако физиологическая роль Т-кадгерина до сих пор остается невыявленной.

Увеличение экспрессии Т-кадгерина в сосудистой стенке коррелирует с патологическим ангиогенезом при атеросклерозе и рестенозе [15, 16]. Данные, полученные в настоящем исследовании, являются первым свидетельством того, что Т-кадгерин специфически ингибирует миграцию эндотелиальных клеток и блокирует формирование мелких сосудов и капилляров *in vivo* и *in vitro*. нами высказано предположение о том, что для подавления миграции необходимо гомофильное связывание молекул Т-кадгерина: эндотелиальные клетки, эндогенно экспрессирующие Т-кадгерин, взаимодействуют со стромальными, также экспрессирующими Т-кадгерин, или с иммобилизованным доменом EC1, имитирующим гомофильное связывание, и это приводит к контактному торможению миграции эндотелиальных клеток [20, 31]. Возможно, что повышение экспрессии Т-кадгерина в сосудистой стенке при развитии атеросклероза и рестеноза является проявлением защитного механизма.

Гиперэкспрессия Т-кадгерина с использованием вирусной или плазмидной трансфекции из-

меняет свойства клеток *in vitro*: усиливает пролиферацию эндотелиальных клеток [20, 32, 33], повышает способность HUVEC и других клеток к спонтанной миграции [10, 14], а также защищает HUVEC от апоптоза и повышает устойчивость к оксидативному стрессу [34]. Эти данные, полученные на культивированных клетках, коррелируют с результатами исследований *in vivo* по экспрессии Т-кадгерина в сосудах некоторых опухолей. Так, при формировании легочных метастазов карциномы Левиса (Lewis carcinoma) уровень экспрессии Т-кадгерина повышается в сосудах, прорастающих в опухоль, в то время как в окружающей ткани Т-кадгерин не выявляется [17]. При гепатоклеточной карциноме в эндотелиальных клетках капилляров опухоли при неоваскуляризации экспрессия Т-кадгерина повышается, в то время как в окружающей ткани и в нормальной печени Т-кадгерин не обнаружен [30]. Эти данные свидетельствуют о том, что увеличение экспрессии Т-кадгерина в эндотелиальных клетках *in vitro* или в сосудах, прорастающих в опухоль, коррелирует с повышенным уровнем ангиогенеза. Однако, как правило, в описанных работах не учитывали роль стромы и ее возможного влияния на процессы ангиогенеза. В отличие от других авторов, нами была использована модель подкожной имплантации матрицеля, в которой клетки создают микроокружение с высоким содержанием Т-кадгерина для прорастающих сосудов. В этих условиях мигрирующие эндотелиальные клетки, эндогенно экспрессирующие Т-кадгерин, контактируют с клетками L929, экспрессирующими Т-кадгерин в результате плазмидной трансфекции, что приводит к подавлению прорастания кровеносных сосудов в матрикеле. Эффект подавления роста сосудов в матрикеле зависит от количества инъектированных Т-кадгерин-позитивных клеток. С этими данными *in vivo* хорошо согласуются результаты исследований, проведенных нами на модели сосудистого колечка *in vitro*, в которых выявлена дозовая зависимость подавления роста капилляров в присутствии домена EC1 в матрикеле, что свидетельствует о специфичности наблюдаемых эффектов Т-кадгерина. Нами было высказано предположение о том, что в данном случае гомофильное взаимодействие между молекулами Т-кадгерина на поверхности контактирующих клеток опосредует контактное ингибирование

Рис. 7. Схематическое изображение роста сосудов, избегающих тканей, в которых клетки экспрессируют Т-кадгерин.



инвазии эндотелиальных клеток в строму матригеля. Эта гипотеза получила подтверждение при изучении качественного и количественного состава прорастающих сосудов в матригеле. Присутствие Т-кадгерина в матригеле не влияло на количество крупных сосудов, в то время как плотность мелких сосудов и капилляров была значительно ниже в матригеле с Т-кадгерин-позитивными L929 клетками, чем в контроле. Это позволяет предположить, что Т-кадгерин в строме влияет на начальные стадии неангиогенеза. Анализ качественного состава сосудов в бляшках показал, что сосуды, которые прорастают в матригеле с Т-кадгерин-позитивными L929 клетками, сами в значительной степени перестают экспрессировать Т-кадгерин. Таким образом, экспрессия Т-кадгерина в строме может оказывать влияние на качественный состав сосудов, инфильтрирующих ткань, либо за счет регуляции направления роста сосудов, либо за счет регуляции экспрессии в сосудах Т-кадгерина. Эта гипотеза о навигационной функции Т-кадгерина, гомофильном взаимодействии и контактном ингибировании роста сосудов объясняет, почему подавление экспрессии Т-кадгерина в строме таких опухолей, как базально-клеточный рак, немелкоклеточная карцинома легкого, рак яичников, рак поджелудочной железы и др. коррелирует с негативным прогнозом и развитием заболевания [35–40], а Т-кадгерину приписывается роль супрессора опухолевого роста [17, 41, 42].

Механизм подавления роста сосудов, который опосредует Т-кадгерин, может быть аналогичен механизму контактного ингибирования роста аксонов в нервной системе, при котором происходит гомофильное взаимодействие между Т-кадгеринами, например, на конце растущего аксона и поверхности окружающих клеток [43, 44]. Накоплено большое количество данных, свидетельствующих в пользу того, что одни и те же молекулы могут осуществлять функцию навигационных рецепторов в нервной и сосудистой системе, более того, существуют данные о взаимной регуляции прорастания нервов и сосудов [45]. Известны по крайней

мере четыре семейства таких молекул, выполняющих навигационную функцию и опосредующих процессы «отталкивания» или адгезии клеток: нетрины и их рецепторы DCC/неогенины и Unc5, слит лиганды и их Робо-рецепторы, семафорины и их рецепторы плексины и нейропилины, эфрины и их рецепторы [46, 47]. Т-кадгерин является еще одной молекулой с навигационной функцией, регулирующей направление роста нервов и сосудов через окружающие ткани к своим мишеням (рис. 7). Эфрины и их рецепторы – пара навигационных молекул, осуществляющих регуляцию роста нервов и сосудов в эмбриогенезе, а также при опухолевом ангиогенезе [48, 49]. Эфрины класса А являются, как и Т-кадгерин, заякоренными ГФИ-молекулами [49, 50]. Результатом взаимодействия эфринов со своими рецепторами является либо адгезия клеток, либо их «отталкивание». Механизм передачи сигнала внутрь клетки через заякоренные ГФИ-эфрины не ясен, но, по-видимому, происходит кластеризация молекул эфринов в липидных плоскостях и/или участвуют адапторные белки. Еще меньше известно о механизмах внутриклеточной сигнализации и белках-партнерах Т-кадгерина, но, возможно, они аналогичны эфриновым, поскольку сходное строение позволяет предположить наличие аналогичных механизмов активации внутриклеточной сигнализации.

О Т-кадгерине было известно, что *in vivo* он экспрессируется в эмбриогенезе в нервной системе мигрирующими клетками нервного гребня и прорастающими к мишеням аксонами, которые избегают на своем пути ткани, в которые экспрессирован Т-кадгерин [6, 43, 44]. При этом Т-кадгерин выполняет функцию навигационного рецептора, опосредующего «отталкивание» и контактное ингибирование при гомофильном взаимодействии контактирующих экспрессирующих Т-кадгерин клеток. Теперь наши данные, полученные в экспериментах *in vitro* по миграции HUVEC в камере Бойдена при формировании капилляров клетками HUVEC в матригеле или на модели сосудистого колечка с использованием домена EC1 [20], позволяют утверждать, что Т-кадгерин участвует в нави-

гации прорастающих сосудов по такому же принципу. In vivo экспрессия Т-кадгерина клетками I929 в матрикеле создает микроокружение с высоким содержанием Т-кадгерина для прорастающих в бляшку сосудов, что тормозит начальные этапы ангиогенеза, но не влияет на созревание сосудов. Механизм действия Т-кадгерина заключается в подавлении миграции эндотелиальных клеток; однако присутствие Т-кадгерина не влияет на их пролиферацию, адгезию и апоптоз. Т-кадгерин является ингибитором ангиогенеза в системах in vivo и in vitro.

Современная медицина представляет опухоль и окружающую ее строму как единую систему, причем опухолевая строма больше не рассматривается как инертное микроокружение для растущей опухоли [51]. “Активированные фибробласты” в опухоли могут стимулировать начальные этапы ангиогенеза, метастазирование и пролиферацию опухолевых клеток, в то время как инъекции нормальных фибробластов в опухолевую строму подавляют рост опухоли [51]. Таким образом, инъекции клеток, гиперэкспрессирующих Т-кадгерин, или генетических конструкций, несущих ген Т-кадгерина, потенциально могут быть использованы для подавления опухолевого ангиогенеза и избыточного ангиогенеза в атеросклеротической бляшке или формирующейся неоплазии.

**Работа проводилась при поддержке РФФИ (грант №04-04-49399) и Wellcome Trust (грант №075154). Авторы выражают благодарность за помощь в работе канд. мед. наук Ольге Антоновой (культивирование HUVEC), Василию Черенкову (очистка рекомбинантных фрагментов Т-кадгерина) и Елене Малининой (двойное иммунофлюоресцентное окрашивание криосрезов матрицеля).**

#### Литература

1. Cavallaro U, Leibner S, Dejana E. Endothelial cadherins and tumor angiogenesis. *Exp Cell Res* 2006; 312: 659–67.
2. George SJ, Beeching CA. Cadherin:catenin complex: A novel regulator of vascular smooth muscle cells behaviour. *Atherosclerosis* 2006; 188: 1–11.
3. Rubina KA, Kalinina NI, Bochkov VN et al. T-cadherin as an antiadhesive and guidance molecule interacting with low density lipoproteins. *Annals EAS* 2005; 1–14.
4. Gumbiner BM. Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nature Rev Mol Cell Biol* 2005; 6: 622–34.
5. Perez-Moreno M, Jamora C, Fuchs E. Sticky business: orchestrating cellular signals at adherens junctions. *Cell* 2003; 112: 535–48.
6. Ranscht B, Dours-Zimmermann MT. T-cadherin, a novel cadherin cell adhesion molecule in the nervous system lacks the conserved cytoplasmic region. *Neuron* 1991; 7: 391–402.
7. Rubina KA, Tkachuk VA. Antiadhesive molecule T-cadherin is an atypical low-density lipoprotein receptor in vascular cells. *RJ. Physiol* 2004; 90: 968–86.
8. Philippova MP, Bochkov VN, Stambolsky DV et al. T-cadherin and signal-transducing molecules co-localize in caveolin-rich membrane domain of vascular smooth muscle cells. *FEBS Letters* 2004; 129: 201–10.
9. Tkachuk VA, Bochkov VN, Philippova MP et al. Identification of an atypical lipoprotein-binding protein from human aortic smooth muscle as T-cadherin. *FEBS Letters* 2004; 421: 208–12.
10. Rubina K, Talovskaya E, Cherenkov V et al. LDL induces intracellular signaling via atypical LDL-binding protein T-cadherin. *Mol Cell Biochem* 2005; 273: 33–41.
11. Hug C, Wang J, Ahmad NS et al. T-cadherin is a receptor for hexameric and high-molecular weight forms of Acrp30/adiponectin. *PNAS* 2004; 101 (28): 10308–13.

12. Brakenhielm E, Veitonmaki N, Cao R et al. Adiponectin-induced antiangiogenesis and antitumor activity involve caspase-mediated endothelial cell apoptosis. *PNAS* 2004; 101 (8): 2476–81.
13. Philippova M, Ivanov D, Allenspach R et al. RhoA and Rac mediate endothelial cell polarization and detachment induced by T-cadherin. *FASEB J* 2005; 19: 588–90.
14. Philippova M, Ivanov D, Tkachuk V et al. Polarisation of T-cadherin to the leading edge of migrating vascular cells in vitro: a function in vascular cell motility? *Histochem Cell Biol* 2003; 120: 353–60.
15. Ivanov D, Philippova M, Antropova J et al. Expression of cell adhesion molecule T-cadherin in the human vasculature. *Histochem Cell Biol* 2001; 115: 231–42.
16. Kudrjashova E, Basbrikov P, Bochkov V et al. Expression of adhesion molecule T-cadherin is increased during neointima formation in experimental restenosis. *Histochem Cell Biol* 2002; 118: 281–90.
17. Wyder L, Vitaliti A, Schneider H et al. Increased expression of H/T-cadherin in tumor-penetrating vessels. *Cancer Res* 2000; 60: 4682–8.
18. Passaniti A, Taylor RM, Pili R et al. A simple quantitative method for assessing angiogenesis and antiangiogenic agents using reconstituted basement membrane, heparin, and fibroblast growth factor. *Lab Invest* 1992; 67: 519–28.
19. Staton CA, Stribbling SM, Tazzyman S et al. Current methods for assaying angiogenesis in vitro and in vivo. *Int J Exp Path* 2004; 85: 233–48.
20. Ivanov D, Philippova M, Tkachuk V et al. Cell adhesion molecule T-cadherin regulates vascular cell adhesion, phenotype and motility. *Exp Cell Res* 2004; 293: 207–18.
21. Nagata D, Mogi M, Walsh K. AMP-activated protein kinase (AMPK) signaling in endothelial cells is essential for angiogenesis in response to hypoxic stress. *J Biol Chem* 2003; 278: 31000–6.
22. Nicosia RF, Ottinetti A. Modulation of microvascular growth and morphogenesis by reconstituted basement membrane gel in three-dimensional cultures of rat aorta: a comparative study of angiogenesis in matrigel, collagen, fibrin, and plasma clot. *Vitro Cell Dev Biol* 1990; 26: 119–28.
23. Kim KS, Hong YK, Joe YA et al. Antiangiogenic activity of the recombinant kringle domain of urokinase and its specific entry into endothelial cells. *J Biol Chem* 2003; 278: 11449–56.
24. Stieger SM, Bloch SH, Foreman O et al. Ultrasound assessment of angiogenesis in a Matrigel model in rats. *Ultrasound in Med Biol* 2006; 32: 673–81.
25. Gerhardt H, Betsholtz C. Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis. *Cell Tissue Res* 2003; 314: 15–23.
26. Bergers G, Song S. The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance. *Neuro-Oncology* 2005; 7: 452–64.
27. Niessen CM, Gumbiner BV. Cadherin-mediated cell sorting not determined by binding or adhesion specificity. *J Cell Biol* 2002; 156: 389–99.
28. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971; 285: 1182–6.
29. Cao Y. Tumor angiogenesis and therapy. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2005; 9: 340–3.
30. Adachi Y, Takeuchi T, Sonobe H, Obtsuki Y. An adiponectin receptor, T-cadherin, was selectively expressed in intratumoral capillary endothelial cells in hepatocellular carcinoma: possible cross talk between T-cadherin and FGF-2 pathways. *Virchows Arch* 2005; 5: 1–8.
31. Zhong Y, Lopez Barcons L, Haigentz M et al. Exogenous expression of H-cadherin in CHO cells regulates contact inhibition of cell growth by inducing p21 expression. *Int J Oncol* 2004; 24: 1573–9.
32. Ivanov D, Philippova M, Allenspach R et al. T-cadherin upregulation correlates with cells-cycle progression and promotes proliferation of vascular cells. *Cardiovasc Res* 2004; 64: 132–43.
33. Philippova M, Banfi A, Ivanov D et al. Atypical GPI-anchored T-cadherin stimulates angiogenesis in vitro and in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 2222–3.
34. Joshi MB, Philippova M, Ivanov D et al. T-cadherin protects endothelial cells from oxidative stress-induced apoptosis. *FASEB J* 2005; 19: 1737–9.
35. Kawakami M, Staub J, Clibi W et al. Involvement of H-cadherin (CDH13) on 16q in the region of frequent deletion in ovarian cancer. *Int J Oncol* 1999; 15: 715–20.

36. Takeuchi T, Liang S-B, Obtsuki Y. Downregulation of expression of a novel cadherin molecule, T-cadherin, in basal cell carcinoma of the skin. *Mol Cancerogen* 2002; 35: 173–9.
37. Hibi K, Nakayama H, Koderu K et al. CDH13 promoter region is specifically methylated in poorly differentiated colorectal cancer. *Brit J Cancer* 2004; 90: 1030–3.
38. Sakai M, Hibi K, Kosbikawa K et al. Frequent promoter methylation and gene silencing of CDH13 in pancreatic cancer. *Cancer Sci* 2004; 95: 588–91.
39. Kim JS, Han J, Shim YM et al. Abberant methylation of H-cadherin (CDH13) promoter is associated with tumor progression in primary nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer* 2005; 104: 1825–33.
40. Mukoyama Y, Zhou S, Miyachi Y, Matsuyoshi N. T-cadherin negatively regulates the proliferation of cutaneous squamous carcinoma cells. *J Invest Dermatol* 2005; 124: 833–8.
41. Takeuchi T, Misaki A, Liang SB et al. 2005 Expression of T-cadherin (CDH13, H-cadherin) in human brain and its characteristics as a negative growth regulator of epidermal growth factor in neuroblastoma cells. *J Neurochem* 2005; 74: 1489–97.
42. Takeuchi T, Obtsuki Y. Recent progress in T-cadherin (CDH13, H-cadherin) research. *Histol Histopathol* 2001; 16: 1287–93.
43. Fredette BJ, Ranscht B. T-cadherin expression delineates specific regions of the developing motoraxon-hindlimb projection pathway. *J Neurosci* 1994; 14: 7331–46.
44. Fredette BJ, Miller J, Ranscht B. 1994 Inhibition of motor axon growth by T-cadherin substrata. *Development* 1994; 122: 3163–71.
45. Carmeliet P. Blood vessels and nerves: common signals, pathways and diseases. *Nature Genet* 2003; 4: 710–20.
46. Weinstein BM. Vessels and nerves: marching to the same tune. *Cell* 2005; 120: 299–302.
47. Eichmann A, Makinen T, Alitalo K. Neural guidance molecules regulate vascular remodeling and vessel navigation. *Genes Dev* 2006; 19: 1013–21.
48. Adams RH, Wilkinson GA, Weiss C et al. Roles of ephrinB ligands and EphB receptors in cardiovascular development: demarcation of arterial-venous domains, vascular morphogenesis, and sprouting angiogenesis. *Genes Dev* 1999; 13: 295–306.
49. Poliakov A, Cortina M, Wilkinson DG. Diverse roles of Eph receptors and Ephrins in the regulation of cell migration and tissue assembly. *Dev Cell* 2004; 7: 465–80.
50. Davy A, Soriano P. Ephrins in vivo: look both ways. *Dev Dynamics* 2005; 232: 1–10.
51. Desmouliere A, Guyot C, Gabbiani G. The stroma reaction myofibroblast: a key player in the control of tumor behavior. *Int J Dev Biol* 2004; 48: 509–17.
52. Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nature Rev Cancer* 2004; 6: 392–401.

О.И.Пусаренко, Л.И.Серебрякова, О.В.Цкитишвили, И.М.Студнева

## Реперфузия метаболическими протекторами уменьшает гибель кардиомиоцитов после окклюзии коронарной артерии у крыс

Институт экспериментальной кардиологии

**Цель исследования.** Изучить влияние внутривенного введения аспартата калия и магния (К-Мг-Асп), смеси глюкоза–инсулин–калий (ГИК), комбинации глюкозы, инсулина с аспартатом калия (ГИКАсп) и одного инсулина (И) после периода региональной ишемии миокарда на метаболизм зоны риска (ЗР) и повреждения клеточных мембран кардиомиоцитов у крыс.

**Материалы и методы.** Острый инфаркт миокарда (ИМ) моделировали 40-минутной окклюзией передней нисходящей коронарной артерии и 60-минутной реперфузией. Во время реперфузии в яремную вену со скоростью 1 мл/кг/ч вводили один из растворов: физиологический раствор (контроль), К-Мг-Асп, ГИК, ГИКАсп или И. По окончании опытов определяли размеры ИМ или замораживали биоптаты ЗР в жидком азоте для определения метаболитов.

**Результаты.** Размеры ИМ в экспериментальных группах были достоверно меньше, чем в контроле, и снижались в ряду К-Мг-Асп>ГИКАсп>И>ГИК. Под действием протекторов содержание аденозинтрифосфата (АТФ) и фосфокреатина в ЗР к концу реперфузии восстанавливалось в 2–2,5 раза лучше, чем в контроле (в среднем до 56,3±3,4 и 81,8±7,9% от исходных значений). В экспериментальных группах потери фонда аспарагиновой и глутаминовой кислот, а также накопление лактата и глюкозы в ЗР были достоверно ниже, чем в контроле. Содержание общего креатина (ΣКр) в ЗР в конце реперфузии в контроле было снижено до 32,3±2,3%, а под влиянием ГИК, И и К-Мг-Асп увеличивалось до 78,0±5,7; 76,7±5,5 и 62,4±5,6% от исходного значения соответственно. В целом восстановление большинства показателей аэробного обмена и целостности мембран кардиомиоцитов было максимальным в группах И и ГИК и достоверно ниже после реперфузии К-Мг-Асп.

**Заключение.** Метаболическая эффективность протекторов соответствовала ограничению размеров ИМ. Использование метаболической защиты миокарда с помощью ГИК, И и К-Мг-Асп перспективно в качестве дополнительной терапии у пациентов с острым ИМ.

**Ключевые слова:** реперфузия сердца, макроэргические фосфаты, аминокислоты, мембраны кардиомиоцитов, механизмы действия.



O.I. Pisarenko, L.I. Serebryakova, O.V. Tskitishvili, I.M. Studneva  
Institute of Experimental Medicine

### REPERFUSION WITH METABOLIC PROTECTORS REDUCES CARDIOMYOCYTIC DEATH RATES AFTER CORONARY OCCLUSION IN RATS

**Aim.** To evaluate the effect of intravenous injection of potassium aspartate and magnesium aspartate (K-Mg-Asp), a glucose-insulin-potassium (GIP) mixture, a combination of glucose, insulin with potassium aspartate (GIPAsp), and insulin (I) alone after myocardial regional ischemia on the metabolism of a risk area (RA) and after cardiomyocytic membranous damage in rats.

**Materials and methods.** Acute myocardial infarction (MI) was simulated by 40-minute occlusion of the anterior descending coronary artery and by 60-minute reperfusion. During reperfusion, one of the solutions (physiological solution (a control group), K-Mg-Asp, GIP, GIPAsp, or I) was injected into the jugular vein at a rate of 1 ml/kg/hr. After completion of the experiments, the extent of MI was estimated or the RA biopsy specimens were frozen in liquid nitrogen for the determination of metabolites.

**Results.** In the experimental groups, the extent of MI was significantly less than that in the control and was in the descending order of K-Mg-Asp > GIPAsp > I > GIP. By the end of reperfusion, the use of the protectors restored the RA levels of adenosine triphosphate and phosphocreatine by 2-2.5 times greater than that in the control (mean up to 56.3±3.4 and 81.8±7.9% of the baseline values, respectively). In the experimental groups, the losses of the stores of aspartic and glutamic acids and the accumulation of lactate and glucose in RA were significantly less than those in the control. At the end of reperfusion, the RA content of total creatine (Cr) decreased to 32.3±2.3% in the control, but, when GIP, I, or K-Mg-Asp was administered, increased up to 78.0±5.7, 76.7±5.5, and 62.4±5.6% of the baseline value, respectively. By and large the recovery of most parameters of aerobic metabolism and the integrity of cardiomyocytic membranes was a maximum in the I- and GIP-groups and insignificantly less after reperfusion with K-Mg-Asp.

**Conclusion.** The metabolic efficacy of the protectors corresponded to the limit of MI extent. Myocardial metabolic protection with GIP, I, and K-Mg-Asp was promising as a supplementary therapy in patients with acute MI.

**Key words:** cardiac reperfusion, energy-rich phosphates, amino acids, cardiomyocytic membranes, mechanisms of action.

Реперфузия постинфарктного миокарда не всегда способна обеспечить адекватное восстановление аэробного обмена и функции сердца. Отсутствие оптимальных условий для защиты реперфузируемого миокарда при возобновлении коронарного кровотока диктует необходимость использования кардиопротекторов, корректирующих метаболизм [1]. Для снижения ишемических и реперфузионных повреждений миокарда применяются протекторы, в состав которых входят естественные метаболиты сердца – аминокислоты, глюкоза и инсулин (И). К наиболее распространенным из них относятся “метаболический коктейль” глюкоза–инсулин–калий (ГИК) и регулятор внутриклеточного ионного гомеостаза аспарагинат калия и магния (К-Мг-Асп), известный под названием панангин, или аспаркам.

Кардиозащитное действие К-Мг-Асп обычно связывают с транспортом  $K^+$  и  $Mg^{2+}$  с помощью аспартата<sup>2+</sup> в миокардиальные клетки, что устраняет дисбаланс электролитов, предотвращая перегрузку кардиомиоцитов ионами  $Ca^{2+}$  и  $Na^+$ . Следствием этого является снижение возбудимости и проводимости миокарда при реперфузии и уменьшение частоты возникновения аритмий [2]. Наряду с улучшением электрофизиологических характеристик аспарагиновая кислота способна запускать компенсаторные механизмы образования аденозинтрифосфата (АТФ) и ГТФ в митохондриях и цитозоле в условиях снижения обеспечения клеток кислородом [3, 4]. Результатом этого может быть уменьшение потерь макроэргических фосфатов на стадии ранней реперфузии. При последующем восстановлении аэробного обмена увеличение внутриклеточной концентрации аспарагиновой кислоты в кардиомиоцитах способствует ресинтезу адениннуклеотидов и фосфокреатина [5].

В экспериментальных и клинических исследованиях установлено, что ГИК снижает уровень циркулирующих в крови свободных жирных кислот (СЖК) и их потребление миокардом [6]. Это уменьшает токсическое действие СЖК на ишемизированный миокард, связанное с повреждением мембран, которое приводит к возникновению аритмий и подавлению функции сердца [7]. Кроме того, ГИК увеличивает захват  $K^+$  миоцитами благодаря стимуляции активности  $Na^+/K^+$ -АТФазы инсулином и способствует транспорту глюкозы в клетки [8]. Увеличение гликолитического потока не только поддерживает более высокие уровни АТФ и фосфокреатина (ФКр) в условиях ишемии, но и снижает внутриклеточные концентрации аденозиндифосфата (АДФ) и неорганического фосфата, что значительно увеличивает свободную энергию гидролиза АТФ при протекании всех АТФазных реакций. Образующийся в гликолизе АТФ обеспечивает сохранение структуры плазматической мембраны и работу ионных насосов, уменьшая перегрузку миоцитов ионами  $Ca^{2+}$  [9]. Эти метаболические перестройки хорошо объясняют способность ГИК препятствовать развитию контрактуры и улучшать работу сердца при ишемии.

Хотя К-Мг-Асп и ГИК длительное время применяются для лечения и профилактики нарушений структур и функции сердца разной природы, их влияние на необратимые повреждения кардиомиоцитов и метаболизм миокарда при реперфузии практически не изучено. Недавно в ряде лабораторий было установлено ограничение размеров инфаркта миокарда (ИМ) при использовании ГИК только во время реперфузии [10, 11]. Было высказано предположение о том, что этот эффект мог быть обусловлен как антиапоптотическим дейст-

вием И, так и влиянием ГИК на метаболизм постишемических миоцитов [12–14].

*Целью настоящей работы* являлось изучение способности К-Mg-Асп, ГИК, комбинации глюкозы, И с аспаратом калия (ГИКАсп) и одного И ограничивать размеры ИМ у крыс при их введении на стадии ранней реперфузии. Для понимания механизмов защитного действия кардиопротекторов было изучено их влияние на метаболизм зоны риска (ЗР) и повреждение клеточных мембран миоцитов в конце реперфузии.

## Материалы и методы

*Препарирование животных.* Эксперименты проводили на крысах-самцах Вистар массой 300–450 г; наркотизированных кетамин (100 мг/кг веса внутривенно). Искусственную вентиляцию легких осуществляли комнатным воздухом с добавлением кислорода с частотой 60–80 в 1 мин, под постоянным контролем насыщения кислородом артериальной крови. Правую яремную вену катетеризировали для введения гепарина и испытываемых растворов. Левую сонную артерию катетеризировали для регистрации артериального давления (АД; “Мингограф-804”, “Siemens Elema”) и взятия проб артериальной крови (“ABL-30”, “Radiometer”, Копенгаген). Грудную клетку вскрывали во II–IV межреберье слева или продольным рассечением грудины, и освобождали сердце от перикарда.

Для создания региональной ишемии миокарда левый желудочек (ЛЖ) прошивали атравматической иглой 5–0 под левым ушком в направлении, перпендикулярном большой оси сердца. Затягивание лигатуры на передней нисходящей коронарной артерии (ПНА), находящейся в толще прошитого миокарда, прекращало кровоснабжение перфузируемого ею участка миокарда и вызывало образование цианозного пятна на поверхности миокарда. Ослабление лигатуры приводило к восстановлению кровотока и исчезновению цианозного пятна. По окончании опытов сердце окрасивали 2% раствором Эванса синего, введенным через яремную вену при затянутой лигатуре, отделяли ЛЖ, который замораживали при  $-20^{\circ}\text{C}$  для последующей гистохимической обработки [15]. В отдельных сериях опытов ЗР ЛЖ быстро вырезали и замораживали щипцами Волленберге-ра, охлажденными в жидком азоте, для последующей оценки метаболического состояния.

Показатели кислотно-щелочного баланса артериальной крови контролировали на кислотно-щелочном газоанализаторе “ABL-30” (“Radiometer”) и поддерживали на физиологическом уровне в течение всего опыта.

*Протоколы опытов.* По окончании препарирования животных и стабилизации в течение 30 мин гемодинамических показателей (исходное состояние) для создания региональной ишемии на 40 мин окклюзировали ПНА. Продолжительность последующей реперфузии составляла 60 мин. В течение всего периода реперфузии в яремную вену со скоростью 1 мл/кг/ч вводили физиологический раствор (контроль). Эффективность защиты ишемизированного миокарда с помощью метаболических протекторов оценивали в отдельных сериях опытов, вводя с той же скоростью во время реперфузии К-Mg-Асп (К-аспарат 2,6 М, Mg-аспарат) 2 2,75 М); ГИК (глюкоза 2,8 М, И 100 МЕ/л,

К+ 0,1 М), ГИКАсп (глюкоза 2,8 М, И 100 МЕ/л, К-аспарат 0,1 М) или И (100 МЕ/л в физиологическом растворе). Оптимальное содержание компонентов в составе протекторов и их дозы введения были подобраны, исходя из имеющихся в литературе данных, и оценены в сериях предварительных опытов на используемой модели ИМ.

*Измерение размеров ИМ.* Срезы ЛЖ толщиной около 1,5 мм инкубировали 10 мин в 1% растворе 2,3,5-трифенилтетразолия хлорида, растворенном в 0,1 М фосфатном буфере pH 7,4 при  $37^{\circ}\text{C}$ . Затем их взвешивали для определения общей массы ЛЖ. После подсушивания окрашенные срезы сканировали, размеры ИМ и ЗР определяли методом компьютерной планиметрии, используя программу “Imagescal” [16]. В каждой группе рассчитывали отношения ЗР/ЛЖ и ИМ/ЗР (в %).

*Обработка ткани и анализ метаболитов.* По окончании исходного состояния или периода реперфузии ткань ЗР ЛЖ быстро вырезали и замораживали в жидком азоте. Замороженные образцы ткани измельчали в холодной 6%  $\text{HClO}_4$  (10 мл/г ткани) и гомогенизировали с помощью “Ultra-Turax” T225 (“IKA-Labortechnik”). Затем их экстрагировали 20 мин во льду и центрифугировали при 3000 g в течение 10 мин при  $4^{\circ}\text{C}$ . Супернатанты нейтрализовали 5 М  $\text{K}_2\text{CO}_3$  до pH 7,40 и повторно центрифугировали при  $4^{\circ}\text{C}$  для удаления осадка  $\text{KClO}_4$ . Безбелковые экстракты хранили замороженными до определения метаболитов. Сухой вес ткани определяли взвешиванием части осадка ткани после экстракции  $\text{HClO}_4$ , высушенной при  $110^{\circ}\text{C}$  в течение ночи [17]. Концентрации АТФ, фосфокреатина (ФКр), креатина (Кр), аспартата (Асп), глутамата (Глу), лактата и глюкозы определяли спектрофотометрически энзиматическими методами [18].

*Статистическая обработка.* Данные представляли как  $M \pm m$ . Отличия между группами оценивали по *t*-критерию Стьюдента, различия между величинами считали достоверными при  $p < 0,05$ .

## Результаты

*Влияние протекторов на размеры ИМ.* Введение физиологического раствора или метаболических протекторов во время реперфузии не влияло на АД и кислотно-щелочное состояние артериальной крови. Во всех группах эти показатели в конце реперфузии не отличались от исходных значений и составляли в среднем: АД –  $100 \pm 3$  мм рт. ст., pH –  $7,40 \pm 0,03$ ;  $p\text{CO}_2$  –  $24,5 \pm 1,8$  мм рт. ст.,  $\text{PO}_2$  –  $299 \pm 30$  мм рт. ст. Таким образом, животные всех групп были гемодинамически стабильны, и поддерживался адекватный аэробный обмен.

В экспериментальных группах отношение ЗР/ЛЖ не отличалось от аналогичного показателя в контроле и в среднем составляло  $24,2 \pm 1,3\%$ , что указывало на стандартное повреждение миокарда при окклюзии ПНА. Отношение ИМ/ЗР составляло  $55,5 \pm 3,9\%$  в контроле и достоверно снижалось под влиянием всех протекторов (рис. 1). Размеры ИМ в экспериментальных группах, оцененные по этому показателю, снижались в ряду ГИКАсп > К-Mg-Асп > И > ГИК. Существенно, что достоверных различий в размерах ИМ после реперфузии ГИК или И не обнаружено. Это свидетельствует о том, что И играет ключевую роль в защитном эффекте ГИК. Замена К+ в смеси ГИК эквивалентным количеством К-аспартата (0,1 М) не приводила к даль-

Таблица 1. Изменения в содержании метаболитов энергетического обмена в ЗР левого желудочка сердца крысы при региональной ишемии и реперфузии ( $M \pm m$ ; мкмоль/г сухого веса ткани)

Группа	АТФ	ФКр	Креатин
Исходное состояние	22,39±1,20	23,78±1,59	35,49±2,13
Контроль	5,26±0,61 <sup>a</sup>	7,53±0,87 <sup>a</sup>	11,62±1,87 <sup>a</sup>
К–Mg–Асп	11,35±0,75 <sup>a,б</sup>	18,87±1,74 <sup>a,б</sup>	18,67±2,34 <sup>a,б</sup>
ГИК	13,96±1,06 <sup>a,б</sup>	20,14±2,76 <sup>a,б</sup>	27,31±3,14 <sup>a,б</sup>
И	12,47±0,92 <sup>a,б</sup>	20,05±2,01 <sup>a,б</sup>	26,28±2,15 <sup>a,б</sup>

Примечание. Здесь и в табл. 2 представлены данные серий из 10–12 опытов. Исходное состояние – 30-минутная стабилизация гемодинамических показателей после препарирования животных. Контроль – 40-минутная окклюзия ПНА с последующей 60-минутной реперфузией. К–Mg–Асп, ГИК или И – 60-минутная реперфузия с соответствующим протектором со скоростью 1 мл/кг/час после 40-минутной окклюзии ПНА.

<sup>a</sup> $p < 0,01$  по сравнению с исходным состоянием; <sup>б</sup> $p < 0,05$  по сравнению с контролем.

нейшему ограничению размеров ИМ по сравнению с этим показателем в группе ГИК. Отношение ИМ/ЗР (в %) в группе ГИКАсп было самым высоким, но достоверно ниже, чем в контроле, поэтому исследование влияния ГИКАсп на метаболизм ЗР не проводили.

*Изменения в метаболическом состоянии ЗР.* Содержание макроэргических фосфатов, аминокислот, глюкозы и лактата в ЛЖ сердца крысы до окклюзии ПНА (исходное состояние) соответствовало значениям, указанным в литературе (табл. 1, 2) [5, 8].

Под влиянием региональной ишемии и последующей реперфузии содержание АТФ и ФКр в ЗР в контроле снижалось до 23,5±2,7 и 31,7±3,6% от исходного соответственно (см. табл. 1). В конце реперфузии содержание макроэргических фосфатов в ЗР сердце, защищенных ГИК, И или К–Mg–Асп, было в 2,5 раза выше, чем в контроле, и в среднем соответствовало 56,3±3,4 и 81,8±7,9% от исходных значений для АТФ и ФКр соответственно. Достоверных различий в содержании АТФ или ФКр в ЗР между экспериментальными группами не обнаружено.

Низкое содержание АТФ и ФКр в ЗР в контрольной группе в конце реперфузии соответствовало метаболическим сдвигам, характерным для неэффективного восстановления аэробного обмена. К ним относятся высокое содержание продуктов гликолиза/гликогенолиза – лактата и глюкозы в ЗР к концу опыта и сниженное содержание аспарагиновой и глутаминовой кислот (до 6,8±1,6 и 41,1±3,6% от исходных значений соответственно), указывающее на их включение в анаэробный обмен.

Под влиянием реперфузии с метаболическими протекторами потери фонда аспарагиновой и глутаминовой кислот в ЗР достоверно снижались. Наибольшее содержание как аспарагиновой, так и глутаминовой кислоты в ЗР было отмечено при использовании К–Mg–Асп. В этом случае общий фонд этих аминокислот был в 2 раза выше, чем в контроле, и составлял 67,2±6,6 и 33,5±4,9% от исходного уровня соответственно ( $p < 0,01$ ). Это предполагало транспорт аспарагиновой кислоты в кардиомиоциты и ее последующее трансаминирование в глутаминовую кислоту. Накопление лактата и глюкозы в ЗР уменьшалось в наибольшей степени под влиянием И, что свидетельствовало об активации аэробного гликолиза. При реперфузии с ГИК содержание глюкозы в ЗР было наибольшим, что отражало увеличение не только внутриклеточного, но и внеклеточного содержания глюкозы, а уровень лактата был практически таким же, как и после реперфузии с И. Реперфузия с К–Mg–Асп также достоверно снижала уровни глюкозы и лактата в ЗР по сравнению с контролем.

Целостность мембран кардиомиоцитов в ЗР оценивали по внутриклеточному маркеру – содержанию общего Кр ( $\Sigma\text{Кр} = \text{ФКр} + \text{Кр}$ ). В конце реперфузии этот показатель был минимальным в контроле за счет трехкратного снижения уровня ФКр и Кр (табл. 1) и составлял 32,3±2,3% от исходного содержания  $\Sigma\text{Кр}$  (рис. 2). Под влиянием протекторов тканевой фонд  $\Sigma\text{Кр}$  сохранялся значительно лучше, чем в контроле. После реперфузии с ГИК и И содержание  $\Sigma\text{Кр}$  в ЗР составляло 80,1±4,9 и 78,2±5,6% от исходного уровня соответственно и было достоверно более высоким, чем у крыс группы К–Mg–Асп (63,3±5,5%;  $p < 0,05$ ). Поскольку мембрана интактных кардиомиоцитов непроницаема для ФКр и Кр [19], более высокое содержание  $\Sigma\text{Кр}$  предполагает лучшую интегрированность сарколеммы кардиомиоцитов в ЗР при реперфузии с ГИК и И, чем К–Mg–Асп.

Корреляционный анализ выявил тесную положительную взаимосвязь между средними значениями потерь общего креатина в ЗР ( $\Delta\Sigma\text{Кр}$  в % от исходного содержания) и средними значениями отношений ИМ/ЗР (в %) в исследуемых группах ( $r = 0,99$ ;  $p < 0,05$ ; рис. 3). Таким образом, под влиянием протекторов при большом ограничении размеров ИМ лучше сохранялось содержание  $\Delta\text{Кр}$  в ЗР, а следовательно, и меньше были разрывы сарколеммы ишемизированных кардиомиоцитов.

## Обсуждение

*Эффективность протекторов при реперфузии.* Полученные результаты свидетельствуют о том, что внутривенное введение всех изучавшихся протекторов на реперфузии увеличивает толерантность постишемических кардиомиоцитов ЗР к реперфузионному повреждению по сравнению с изменениями в контроле. Наибольшее и практически одинаковое снижение необратимого повреждения, охарактеризованное отношением ИМ/ЗР (в %), обеспечивала ранняя реперфузия ГИК и И, в меньшей степени ИМ снижался под действием К–Mg–Асп (см. рис. 1). Включение аспартата К в состав ГИК не увеличивало кардиопротекторную эффективность ГИК. Отсутствие дополнительного защитного эффекта, вероятно, связано как с низким содержанием самого Асп в составе ГИКАсп по сравнению с его содержанием в К–Mg–Асп, так и с отсутствием второго необходимого компонента для проявления протекторных свойств Асп –  $\text{Mg}^{2+}$ .

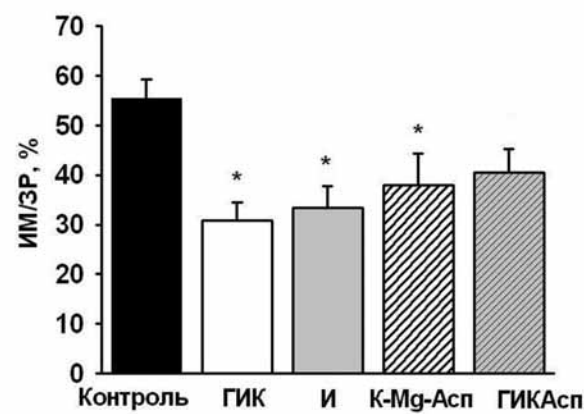
Полученные данные непосредственно указывают на метаболическую природу защитного действия использованных реперфузионных составов: ГИК, И и К–Mg–Асп улучшали восстановление аэробного обмена в постишемических

**Таблица 2. Влияние реперфузии с метаболическими протекторами на содержание аминокислот, глюкозы и лактата в ЗР левого желудочка ( $M \pm m$ ; мкмоль/г сухого веса ткани)**

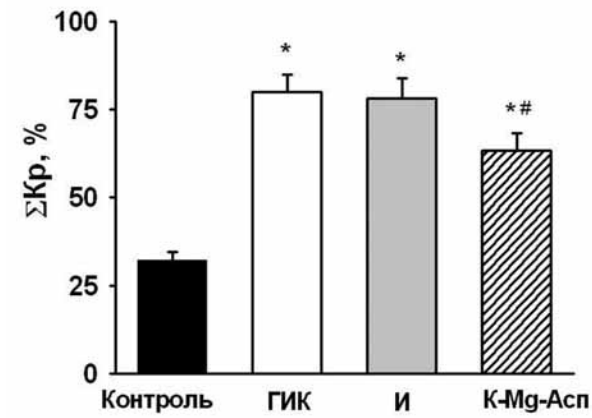
Группа	Аспарат	Глутамат	Лактат	Глюкоза
Исходное состояние (n=8)	6,75±0,56	23,45±2,12	2,15±0,14	2,46±0,29
Контроль (n=10)	0,46±0,11 <sup>a</sup>	9,35±0,84 <sup>a</sup>	12,83±1,80 <sup>a</sup>	38,26±4,12 <sup>a</sup>
К-Мг-Асп (n=12)	3,98±0,45 <sup>a,б</sup>	16,27±0,90 <sup>a,б</sup>	10,05±0,55 <sup>a</sup>	26,30±2,74 <sup>a,б</sup>
ГИК (n=8)	1,94±0,20 <sup>a,б,в</sup>	12,92±0,98 <sup>a,б</sup>	9,10±2,32 <sup>a</sup>	92,22±19,58 <sup>a,б,в</sup>
И (n=9)	2,87±0,24 <sup>a,б,в</sup>	14,77±1,18 <sup>a,б</sup>	8,50±0,85 <sup>a</sup>	17,58±2,96 <sup>a,б,в</sup>

Примечание:  $p < 0,05$  по сравнению, а – с исходным состоянием, б – с контролем, в – с К-Мг-Асп.

**Рис. 1. Ограничение размеров ИМ левого желудочка сердца крысы под действием метаболических протекторов.** Здесь и на рис. 2: представлены данные серий из 10–12 опытов. Контроль – 40-минутная окклюзия ПНА с последующей 60-минутной реперфузией; ГИК, И, К-Мг-Асп и ГИКАсп – 60-минутная реперфузия с соответствующим протектором со скоростью 1 мл/кг/ч после 40-минутной окклюзии ПНА. \* $p < 0,05$  по сравнению с контролем.

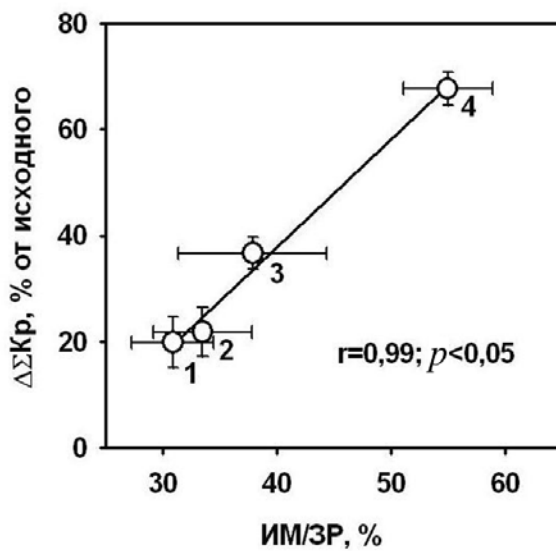


**Рис. 2. Влияние реперфузии с метаболическими протекторами на содержание общего креатина в ЗР левого желудочка сердца крысы.** Общий креатин ( $\Sigma\text{Кр} = \text{ФКр} + \text{Кр}$ ) выражали в % к исходному содержанию в ЗР, которое составляло  $59,26 \pm 1,96$  мкмоль/г сухой ткани.  $p < 0,05$  по сравнению \* с контролем, # с К-Мг-Асп.



кардиомиоцитах. Это подтверждалось более высоким содержанием АТФ и ФКр, лучшим сохранением фонда ключевых аминокислот сердца – Асп и Глу – одновременно со снижением накопления лактата в ЗР в конце реперфузии (см. табл. 1, 2). Также нами была обнаружена тесная корреляция между сохранением содержания  $\Sigma\text{Кр}$  в ЗР и снижением размеров ИМ во всех группах (см. рис. 3). В целом восстановление аэробного обмена и уменьшение повреждения мембран кардиомиоцитов, оцененное по содержанию  $\Sigma\text{Кр}$ , было максимальным в группах И и ГИК и значительно ниже после реперфузии К-Мг-Асп. Таким образом, метаболическая эффективность протекторов соответствовала ограничению

**Рис. 3. Корреляция между средними значениями потерь общего креатина ( $\Sigma\text{Кр}$ ) в ЗР и средними значениями отношения ИМ/ЗР в исследуемых группах.** Представлены данные серий из 10–12 опытов. 1 – ГИК, 2 – И, 3 – К-Мг-Асп, 4 – контроль.



размеров ИМ и увеличивалась в ряду контроль < К-Мг-Асп < И < ГИК.

**Механизмы защитного действия ГИК.** Особый интерес представляет анализ влияния ГИК и И на снижение гибели кардиомиоцитов в ЗР. Ранее защитные механизмы «поляризующей смеси» ГИК связывали с обеспечением электрической стабильности сердца при ишемии [20]. Впоследствии L.Оrie и соавт. была разработана метаболическая концепция действия ГИК, основанная на регуляции энергетического обмена [21]. На разных моделях ишемии и реперфузии миокарда было подтверждено, что под влиянием ГИК увеличивается продукция АТФ в гликолизе, лучше сохраняются запасы гликогена, происходит образование пирувата, сопряженное с обеспечением физиологических уровней интермедиатов цикла трикарбоновых кислот [6]. Следствием этого является большая интегрированность плазматических мембран и поддержка ионного гомеостаза кардиомиоцитов. Принципиально важно, что ГИК способен оптимизировать утилизацию энергопродуцирующих субстратов ишемизированным сердцем, снижая уровень циркулирующих в крови СЖК и их захват миокардиальными клетками [22]. В экспериментальных работах и у пациентов, подвергавшихся реваскуляризации коронарных артерий, были обнаружены тесные взаимосвязи между увеличенной экстракцией миокардом глюкозы, метаболическими эффектами ГИК и снижением постишемической дисфункции сердца [10, 23]. Совокупность этих результатов принципиально согласуется с ограничением ИМ

при использовании ГИК в период реперфузии, продемонстрированным нами и другими исследователями [6, 11, 13, 14]. Очевидно, что факторами, определяющими уменьшение гибели кардиомиоцитов в ЗР, являются снижение ингибирующего действия СЖК на энергетический обмен, увеличение продукции АТФ при окислении глюкозы, меньшее накопление лактата и  $H^+$ , инициирующее перегрузку ионами  $Ca^{2+}$ , и развитие дефектов сарколеммы.

Полученные нами результаты показывают, что основным кардиозащитным компонентом ГИК является И. Это подтверждается как одинаковым снижением размеров ИМ под действием ГИК и одного И (см. рис. 1), так и их сходным влиянием на показатели энергетического обмена, продукцию лактата и содержание аспарагиновой и глутаминовой кислот в ЗР (см. табл. 1, 2). Более того, введение в состав ГИК еще одного потенциального кардиопротектора – Асп – при замене  $K^+$  эквивалентным количеством К-аспартата (ГИКАсп) не вызвало дальнейшего уменьшения ИМ (см. рис. 1). Это позволяет предположить, что снижение реперфузионного повреждения ЗР под влиянием ГИК прямо не связано с захватом ишемизированными миоцитами глюкозы или  $K^+$  и может быть обусловлено независимыми кардиопротекторными механизмами. В пользу этого предположения свидетельствует и тот факт, что ГИК в равной степени снижал размеры ИМ у крыс *in vivo* при внутривенном введении в период ишемии и реперфузии и при введении только во время реперфузии [12]. Однако в последнем случае изменений в содержании СЖК и глюкозы в крови по сравнению с контролем не происходило.

*Активация метаболических и сигнальных путей И.* В опытах на изолированном перфузируемом сердце крысы и на животных разных видов *in vivo* показано, что реперфузия одним И способна восстанавливать функцию сердца и уменьшать размеры ИМ, вызванные ишемическим и реперфузионным стрессом, практически в той же степени, что и ГИК [11, 12]. Эти данные хорошо согласуются с результатами настоящей работы (см. рис. 1). Имеются экспериментальные и клинические подтверждения того, что это может быть вызвано ингибированием И липолиза в жировой ткани, приводящим к снижению концентрации СЖК в крови и уменьшению их экстракции миокардом [24]. Сдвиг в утилизации энергетических субстратов под действием И в пользу углеводов уменьшает бесполезный расход АТФ при включении СЖК в триглицериды и снижает ингибирование окисления глюкозы ацетилкоэнзимом А и цитратом – продуктами окисления СЖК. Следствием этих метаболических перестроек является меньшее повреждение функции митохондрий и накопление  $H^+$  в постишемических кардиомиоцитах, способствующее сохранению внутриклеточного ионного гомеостаза и целостности плазматических мембран [7, 9, 14]. Прямые доказательства улучшения восстановления аэробного метаболизма в ЗР и снижения повреждений мембран кардиомиоцитов под действием И были получены в данной работе (см. табл. 1, 2).

В то же время ранее было экспериментально подтверждено, что И промотирует внутриклеточные сигнальные пути выживания ишемизированных кардиомиоцитов при реперфузии. Так, на мо-

дели изолированного сердца крысы показано, что инфузия И на стадии ранней реперфузии уменьшает не только некроз, но и запрограммированную гибель клеток – апоптоз [11, 25]. Причем антиапоптотное действие И не зависит от энергетического субстрата и полностью воспроизводится при замене глюкозы в перфузате пируватом. С помощью ингибиторного анализа было доказано, что этот кардиопротективный фенотип опосредуется сигнальными каскадами, в которых участвуют тирозинкиназа, фосфатидилинозитол-3-киназа (PI3-киназа) и p70S6-киназа (S6K), а активация сигнальных интермедиатов – протеинкиназы В (Akt) и S6K – происходит при их фосфорилировании И в стадии реперфузии [12]. Кроме того, И при реперфузии поддерживает проапоптотный пептид BAD (Bcl-2/Bcl-XL – агонист, вызывающий гибель клеток) в неактивной фосфорилированной форме. В последние годы был идентифицирован дополнительный сигнальный каскад, инициируемый И в реперфузируемом сердце, мишенью которого является эндотелиальная NO-синтаза [26]. Фосфорилирование этого фермента И через опосредованный PI3-киназой – Akt путь вызывает образование в эндотелии NO, обладающего свойствами не только вазодилатора, но и ингибитора апоптоза [27]. Таким образом, митоген И может действовать как "метаболически независимый" компонент коктейля ГИК, снижая вклад апоптоза в реперфузионное повреждение миокарда.

*Особенности действия К-Mg-Асп.* Хотя целесообразность применения аспарагиновой кислоты при остром ИМ давно обоснована экспериментально [3, 28], данные по влиянию К-Mg-Асп на ИМ и метаболизм ЗР в доступной литературе отсутствуют. Механизм его действия связывают с ролью аниона Асп<sup>2-</sup> как переносчика ионов  $K^+$  и  $Mg^{2+}$  во внутриклеточное пространство и участием самого Асп<sup>2-</sup> в метаболических процессах. Благодаря этому К-Mg-Асп способен уменьшать дисбаланс электролитов, снижать возбудимость и проводимость миокарда, оказывая антиаритмический эффект, и улучшать метаболическое состояние постишемического сердца. Полученные нами результаты показывают, что ограничение размеров ИМ под действием К-Mg-Асп при реперфузии прямо связано с его включением во внутриклеточный обмен. Это подтверждается значительным снижением потерь аспарагиновой кислоты в ЗР к окончанию реперфузии и одновременным увеличением содержания продукта ее метаболизма – глутаминовой кислоты (см. табл. 2). Образование интермедиатов цикла трикарбоновых кислот и активация переноса восстановительных эквивалентов NADH из цитозола в митохондрии в малат-аспартатном челноке в результате сопряженного трансаминирования глутаминовой и аспарагиновой кислот способствует аэробному окислению глюкозы и восстановлению макроэргических фосфатов [3–5]. Об этом свидетельствуют достоверно более низкие уровни лактата и глюкозы (см. табл. 2) и двукратное увеличение содержания АТФ и ФКр в ЗР по сравнению с контролем (см. табл. 1). Кроме того, изменение трансмембранных ионных потоков, вызванное введением К-Mg-Асп, влияет на активность фосфоинозитидной и аденилатциклазной систем в миокарде [2]. Поскольку обе мессенджерные системы находятся в центре влияния гормонов и биологически активных

веществ, “быстрые ответы” кардиомиоцитов, обусловленные изменениями мембранных потенциалов, также могут быть ответственны за предотвращение гибели постишемических кардиомиоцитов.

### Заключение

Тромболитическая терапия или первичная ангиопластика являются стандартной помощью при остром ИМ. Очевидно, что восстановления коронарного кровотока и снабжения кислородом ЗР недостаточно для спасения постишемических кардиомиоцитов, и следующей мишенью терапевтического воздействия должен быть миокард, поэтому для успешной миокардиальной защиты в условиях срочной реперфузии необходимо использовать метаболические протекторы. Это, в частности, подтверждают клинические исследования ECLA и DIGAMI, в которых продемонстрирована высокая кардиопротективная эффективность реперфузии ГИК, снижавшая смертность больных с острым коронарным синдромом [29, 30]. Результаты нашей работы, так же как и данные более ранних экспериментальных исследований, указывают на перспективность такого подхода. Применение метаболических протекторов позволяет снижать обе составляющие необратимого повреждения миокардиальных клеток – некроз и апоптоз. Это достигается комплексным воздействием на внутриклеточный обмен и ионный гомеостаз модуляцией активности сигнальных каскадов и мессенджерных систем. Полученные результаты указывают на целесообразность дальнейшего изучения действия этого класса кардиопротекторов в условиях реперфузионного стресса.

**Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант №05-04-48524).**

### Литература

1. Verma S, Fedak PWM, Eisel RD. *Fundamentals of reperfusion injury for the clinical cardiologist*. *Circulation* 2002; 105: 2332–6.
2. Вишневецкий АА, Берляков АА. Активность мессенджерных систем в гипертрофированном миокарде крыс при введении панангина. *Бюл. экпер. биол. и мед.* 2002; 134 (9): 299–302.
3. Rosenfeldt FL, Korchazbikina OV, Richards SM et al. Aspartate improves recovery of the recently infarcted rat heart after cardioplegic arrest. *Eur J Cardio-Thorac Surg* 1998; 14: 185–90.
4. Snaitth ChD, Wright G, Loflein M. The effects of aspartate and 2-oxoglutarate upon glycolytic energy metabolites and mechanical recovery following global ischemia in isolated rat heart. *J Mol Cell Cardiol* 1992; 24: 305–15.
5. Pisarenko OI. Metabolic and antioxidant support with amino acids. *Ischemia-reperfusion injury in cardiac surgery*. Georgetown, Landes Bioscience, 2001; 90–6.
6. Apstein CS, Taegtmeyer H. Glucose-insulin-potassium in acute myocardial infarction. The time has come for a large, prospective trial. *Circulation* 1997; 95: 1074–7.
7. Lopaschuk GD, Wambolt RR, Barr RI. An imbalance between glycolysis and glucose oxidation for the detrimental effects of high levels of fatty acids during aerobic reperfusion of ischemic hearts. *J Pharmacol Exp Ther* 1993; 264: 135–44.
8. Cross HR, Radda GK, Clarke K. The role of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase activity during low-flow ischemia in preventing myocardial injury: a  $^{31}\text{P}$ ,  $^{23}\text{Na}$  and  $^{87}\text{Rb}$  NMR spectroscopy study. *Magn Reson Med* 1995; 34: 673–85.
9. Xu KY, Zweier JL, Becker LC. Functional coupling between glycolysis and sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  transport. *Circ Res* 1995; 77: 88–97.

10. Jonassen AK, Aasum E, Reismersma RA et al. Glucose-insulin-potassium reduces infarct size when administered during reperfusion. *Cardiovasc Drugs and Therapy* 2000; 14: 615–23.
11. Zhang HF, Fan Q, Qian XX, Lopez BL et al. Role of insulin in the apoptotic effect of glucose-insulin-potassium in rabbits with acute myocardial ischemia and reperfusion. *Apoptosis* 2004; 9: 777–83.
12. Jonassen AK, Sack MN, Mjos OD, Yellon DM. Myocardial protection by insulin at reperfusion requires early administration and is mediated via Akt and p70s6 kinase cell-survival signaling. *Circ Res* 2001; 89: 1191–9.
13. LaDisa JF, Krolkowski JG, Pagel PS et al. Cardioprotection by glucose-insulin-potassium: dependence on KATP channel opening and blood glucose concentration before ischemia. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol)* 2004; 287: H601–7.
14. Angelos MG, Murray HN, Gorsline RT, Klawitter PF. Glucose, insulin and potassium (GIK) during reperfusion mediates improved myocardial bioenergetics. *Resuscitation* 2002; 55(3): 329–36.
15. Писаренко О.И., Студнева И.М., Серебрякова Л.И. и др. Защита миокарда крыс селективным ингибитором  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  обмена и ишемическим preconditionированием. *Кардиология* 2005; 45 (2): 37–44.
16. Писаренко О.И., Серебрякова Л.И., Цкитишвили О.В. и др. Влияние ингибирования  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  обмена на метаболизм зоны риска и размеры инфаркта миокарда у собак. *Кардиология*. 2003; 12: 73–8.
17. Pisarenko OI, Tskitisbivi OV, Studneva IM, Serebryakova LI. Metabolic effects of ischemic preconditioning and adenosine receptor blockade in dogs. *Ann NY Acad Sci* 1996; 793: 85–97.
18. Bergmeyer HU. *Methods of enzymatic analysis*. New York: Academic Press 1974; 3–4: 1464–7, 1696–700, 1704–8, 1772–6, 2101–10, 2127–31.
19. Reimer KA, Hill ML, Jennings RB. Prolonged depletion of ATP and of the adenine nucleotide pool due to delayed resynthesis of adenine nucleotides following reversible myocardial ischemic injury in dogs. *J Mol Cell Cardiol* 1981; 13: 229–39.
20. Sodi-Pallares D, Testelli M, Fishleder F. Effects of intravenous infusion of potassium-insulin-glucose solution on the electrocardiographic signs of myocardial infarction. *Am J Cardiol* 1962; 9: 166–81.
21. Opie LH. Glucose and the metabolism of ischaemic myocardium. *Lancet* 1995; 345: 1520–1.
22. Sidossis LS, Stuart CA, Shulman GI et al. Glucose plus insulin regulate the rate of fatty acid entry into the mitochondria. *J Clin Invest* 1996; 98: 2244–50.
23. Coleman GM, Gradinac S, Taegtmeyer H et al. Efficacy of metabolic support with glucose-insulin-potassium for left ventricular pump failure after aortocoronary bypass surgery. *Circulation* 1989; 80: 191–6.
24. Randle PJ. Regulatory interactions between lipids and carbohydrates: The glucose – fatty acid cycle after 35 years. *Diabetes Metab Rev* 1998; 14: 263–83.
25. Sack MN, Yellon DM. Insulin therapy as an adjunct to reperfusion after acute coronary ischemia. A proposed direct myocardial cell survival effect independent of metabolic modulation. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41 (8): 1404–7.
26. Gao F, Gao E, Yue T-L, et al. Nitric oxide mediates the anti-apoptotic effect of insulin in myocardial ischemia-reperfusion. The roles of PI3-kinase, Akt, and endothelial nitric oxide synthase phosphorylation. *Circulation* 2002; 105: 1497–506.
27. Rakbit RD, Marberb MS. Nitric oxide: an emerging role in cardioprotection? *Heart* 2001; 86: 368–72.
28. Engelman RM, Rousou JA, Flack JE 3rd, et al. Reduction of infarct size by systemic amino acid supplementation during reperfusion. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1991; 101 (5): 855–9.
29. Diaz R, Paolasso EA, Piegas LS et al. Metabolic modulation of acute myocardial infarction: The ECLA glucose-insulin-potassium pilot trial. *Circulation* 1998; 98 (21): 2227–34.
30. Malmberg K, Ryden L, Hamsten A et al. Effects of insulin treatment on cause-specific one-year mortality and morbidity in diabetic patients with acute myocardial infarction: DIGAMI study group: Diabetes insulin-glucose in acute myocardial infarction. *Eur Heart J* 1996; 17: 1337–44.

К.Б.Шумаев, А.Ф.Ванин\*, В.Л.Лакомкин, В.П.Мох, Л.И.Серебрякова,  
О.В.Цкитишвили, А.А.Тимошин, А.В.Максименко, О.И.Писаренко,  
Э.К.Рууге, В.И.Капелько, Е.И.Чазов

## Участие активных форм кислорода в модуляции гипотензивного эффекта динитрозильных комплексов железа

Институт экспериментальной кардиологии

\*Институт химической физики им. Н.Н.Семенова РАН

**Цель работы.** Изучение взаимодействия активных форм кислорода с динитрозильными комплексами железа (ДНКЖ) в опытах *in vitro* и *in vivo*.

**Материалы и методы.** Действие ДНКЖ и пероксида водорода ( $H_2O_2$ ) изучали на изолированных полосках аорты, изолированных сердцах крыс, а также на наркотизированных крысах. В отдельной серии у крыс изучали действие ДНКЖ на размер инфаркта миокарда после перевязки коронарной артерии.

**Результаты.** В опытах *in vitro* показано образование ДНКЖ в среде, содержащей ферритин (источник железа) и доноры оксида азота (NO). Скорость реакции определялась соотношением свободных субстратов. Супероксид в присутствии избытка оксида азота стимулировал образование ДНКЖ, а при низкой концентрации NO вызывал распад этих комплексов. Распад ДНКЖ замедлялся при наличии в среде флавоноидов или антиоксидантных ферментов. На полоске аорты пероксид водорода уменьшал и укорачивал вазодилаторный эффект ДНКЖ. Введение  $H_2O_2$  в коронарные сосуды изолированного сердца или же внутривенно наркотизированным крысам сопровождалось отчетливым снижением артериального тонуса. Введение ДНКЖ непосредственно перед лигированием коронарной артерии, сочетавшееся с обычным продолжительным снижением сРАД, уменьшало и риск развития аритмии, и реперфузионное повреждение миокарда.

**Заключение.** Величина и длительность гипотензивного эффекта ДНКЖ в значительной степени определяются уровнем активных форм кислорода.

**Ключевые слова:** супероксид, пероксид водорода, оксид азота, артериальное давление, инфаркт миокарда.

K.B. Shumayev, A.F. Vanin\*, V.L. Lakomkin, V.P. Mokh, L.I. Serebryakova, O.V. Tskitisvili,  
A.A. Timoshin, A.V. Maksimenko, O.I. Pisarenko, E.K. Ruuge, V.I. Kapelko, E.I. Chazov

Institute of Experimental Cardiology

\*N.N. Semenov Institute of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences

### INVOLVEMENT OF ACTIVE OXYGEN FORMS IN THE MODULATION OF THE ANTIHYPERTENSIVE EFFECT OF IRON DINITROSYL COMPLEXES

**Aim.** To study the interaction of active oxygen forms with iron dinitrosyl complexes (IDNC) in *in vitro* and *in vivo* experiments.

**Materials and methods.** The effects of IDNC and hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) were studied on isolated rat aortic strips, isolated rat hearts, and anesthetized rats. A separate series was used to evaluate the effect of IDNC on the extent of myocardial infarction after ligation of the rat coronary artery.

**Results.** The *in vitro* experiments indicated the production of IDNC in the medium containing ferritin (a source of iron) and nitric oxide (NO) donors. The rate of the reaction was determined by the ratio of free substrates. Superoxide in the presence of excess NO stimulated the formation of IDNC and, at a low concentration of NO, disintegrated these complexes. The disintegration of IDNC became slower when the medium contained flavonoids or antioxidative enzymes. On the aortic strip,  $H_2O_2$  lowered and shortened the vasodilator effect of IDNC. Administration of  $H_2O_2$  into the coronary vessels of the isolated heart or intravenously to the anesthetized rats caused a noticeable arterial tone reduction. Administration of IDNC just before coronary arterial ligation, which was accompanied by a usual prolonged decrease in mean blood pressure, reduced the risk for arrhythmia and diminished reperfusion-induced myocardial damage.

**Conclusion.** The magnitude and duration of the antihypertensive effect of IDNC are largely determined by the level of active oxygen forms.

**Key words:** superoxide, hydrogen peroxide, nitric oxide, blood pressure, myocardial infarction.

Среди известных доноров оксида азота (NO, нитроксида) в последнее время значительное внимание привлекают низкомолекулярные или связанные с белками комплексы железа. Динитрозильные

комплексы железа (ДНКЖ, общая формула  $\{(RS)_2Fe^+(NO^+)_2\}^+$ ) являются одной из форм депонирования NO [1]. Однако в крови они распадаются в пределах 1 ч с выделением нитроксида, оказывающего

длительное гипотензивное действие [2, 3]. Предполагают, что ДНКЖ разрушаются под действием супероксида и других активных окислителей аналогично мононитрозильным комплексам железа с дитиокарбаматом [4]. Очевидно, что накопление активных форм кислорода (АФК) в крови или сосудистых клетках может оказать существенное влияние на эффективные концентрации NO. В связи с этим первой задачей данной работы было изучение взаимодействия ДНКЖ и АФК в модельных системах *in vitro* и выяснение влияния АФК на эффекты ДНКЖ на изолированном сосуде.

Усиленное взаимодействие NO и супероксида, ведущее к образованию пероксинитрита, играет существенную роль в развитии толерантности к нитратам [5]. Однако применение супероксида и пероксида водорода на разных объектах давало неоднозначные результаты: наблюдали как снижение, так и повышение артериального тонуса [5–10]. По этой причине второй задачей работы являлось изучение действия пероксида водорода ( $H_2O_2$ ) на изолированное сердце и крыс *in vivo*.

В свою очередь, усиленное образование NO снижает потребление кислорода митохондриями [11, 12], а следовательно, и образование свободных радикалов кислорода. Это может быть критическим фактором предупреждения реперфузионных повреждений миокарда, когда образование АФК происходит наиболее интенсивно. Показан защитный эффект нитроглицерина, ди- и мононитратов при лечении остро коронарного синдрома, инфаркта миокарда (ИМ) и сердечной недостаточности [13]. В связи с этим еще одной задачей данной работы было выяснение способности внутривенного введения ДНКЖ, наряду со снижением артериального давления (АД), уменьшать необратимые повреждения кардиомиоцитов на модели региональной ишемии и реперфузии миокарда крыс *in situ*.

### Материалы и методы

Динитрозильные комплексы синтезировали по разработанному А.Ф.Ваниным способу [3]. Методика измерения ДНКЖ с помощью электронно-парамагнитного резонанса (ЭПР) была аналогична изложенной в указанной статье. Белковые динитрозильные комплексы получали, добавляя низкомолекулярные ДНКЖ с фосфатными лигандами в растворы альбумина и гемоглобина. Использовали следующие реагенты: аскорбат натрия, тиосульфат натрия, восстановленный L-глутатион,  $H_2O_2$ , донор оксида азота PAPA/NO, ксантин и ксантинооксидазу, супероксиддисмутазу (СОД) и TIRON (все производства “Sigma”), терт-бутил гидропероксид (“Aldrich”), 5-диэтоксифосфорил-5-метил-1-пирролин-N-оксид (“Oxis”).

Опыты на изолированных полосках аорты крыс проводили в растворе Кребса при 37°. Регистрировали изометрическое напряжение полосок преобразователем UC-2 при предварительном сокращении, вызванном стандартной концентрацией норадреналина ( $10^{-7}$  М).

Опыты с введением  $H_2O_2$  *in vivo* проводили на самцах крыс Вистар массой 300–350 г, находившихся под кетаминным наркозом (100 мг/кг). Вводили катетеры в сонную артерию и яремную вену. Регистрировали частоту сердечных сокращений (ЧСС) и среднее АД ( $cp_{AD}$ ) при помощи усилителя “BIOGRAPH-4” (Санкт-Петербургский университет аэрокосмического приборостроения) и аналого-

цифрового преобразователя “NIUSB 6009” (США).  $H_2O_2$  (0,8%) вводили внутривенно со скоростью 0,4 мл/мин в течение 5 мин дважды с 20-минутным интервалом, в промежутке (10 мин) выполняли контрольное введение физиологического раствора в том же объеме или введение биферментного конъюгата антиоксидантных ферментов – супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы в дозе 1,3–1,6 мг/кг. Метод получения биферментного конъюгата описан нами ранее [14], содержание белка в конъюгате составляло 5%, а его специфическая (удельная) активность по СОД – 56 Ед/мг; а по каталазе – 145 Ед/мг препарата.

Изучение кардиопротекторных свойств ДНКЖ проводили на крысах-самцах Вистар массой 300–450 г, находившимися под кетаминным наркозом (100 мг/кг веса внутривенно). Искусственную вентиляцию легких осуществляли комнатным воздухом с добавлением кислорода, с частотой 60–80 в 1 мин, под постоянным контролем кислотно-щелочного баланса (“ABL-30”, “Radiometer”, Копенгаген). Регистрировали давление в сонной артерии (“Мингограф-804”, “Siemens Elema”). Инфаркт миокарда моделировали 40-минутной окклюзией ветви передней нисходящей коронарной артерии и последующей 60-минутной реперфузией по методу Kitakaze и соавт. [15]. В опытной серии непосредственно перед началом региональной ишемии внутривенно болюсом вводили ДНКЖ с цистеиновым лигандом (1:20), растворенный в 0,5 мл физиологического раствора, в дозе 81,6 мг/кг. В предварительных опытах было выяснено, что такая доза ДНКЖ вызывает продолжительное снижение сРАД, указывающее на вазодилаторный эффект образующегося NO. В контроле перед началом ишемии внутривенно вводили физиологический раствор без ДНКЖ в эквивалентном объеме. В конце опыта в яремную вену вводили болюсом 2% раствор Эванса синего для идентификации интактной зоны левого желудочка (ЛЖ). Гистохимическую локализацию зоны риска (ЗР) и ИМ проводили, окрашивая срезы ЛЖ 2-, 3-, 5-трифенилтетразолий хлоридом. Площади ИМ и ЗР определяли методом компьютерной планиметрии с помощью программы “Imagical”. В каждой группе рассчитывали (в %) отношение ЗР/масса ЛЖ (ЗР/ЛЖ) и ИМ/ЗР [16].

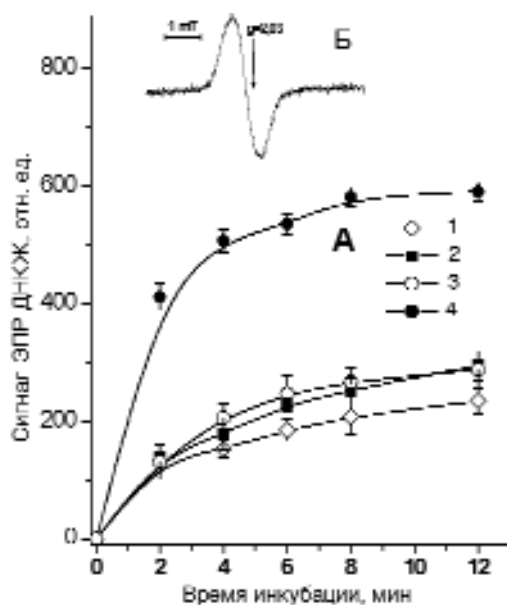
Статистическую обработку данных проводили с помощью t-критерия Стьюдента. Результаты представлены как  $M \pm m$ .

### Результаты

**Образование и стабильность комплексов.** Комплексы образуются при смешивании естественных компонентов метаболизма клеток – источников железа и нитросоединений, однако весьма важным является вопрос, могут ли они образовываться в естественных условиях в клетках. В опытах *in vitro* при наличии источника железа – ферритина, источника NO – GSNO (нитрозоглутатиона) и глутатиона в качестве лиганда происходит образование ДНКЖ, о чем свидетельствовало увеличение сигнала ЭПР (рис. 1). Добавление к среде PAPA/NO гораздо более эффективного донора NO, чем GSNO, существенно не повлияло на кинетику образования ДНКЖ, что указывает на ионы железа как на наиболее вероятный фактор, лимитирующий в этих условиях скорость формирования ДНКЖ. Супероксид, образуемый при добавлении к смеси ксантина и ксантинооксидазы, практически не влиял на образо-



Рис. 1. а – кинетика формирования ДНКЖ в среде, содержащей 30 мМ восстановленного глутатиона (GSH), 150 мМ фосфатного буфера и 0,2 мкг/мл ферритина; б – типичный спектр ЭПР ДНКЖ с глутатионовым лигандом.



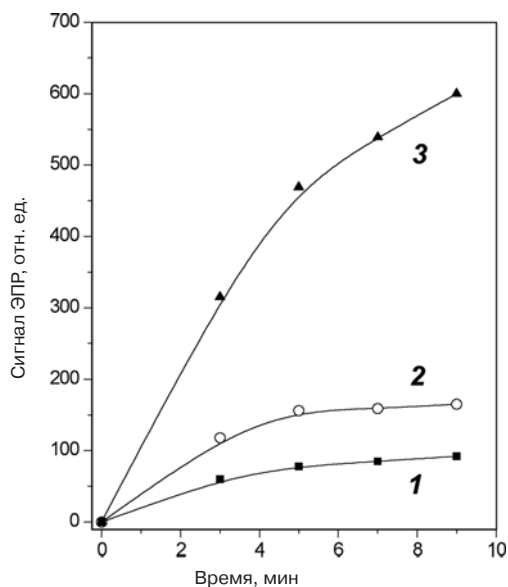
вание ДНКЖ с участием GSNO, но значительно (приблизительно в 3 раза) увеличивал скорость образования ДНКЖ в присутствии PAPA/NONO, т.е. при избытке NO (см. рис. 1).

В той же среде, но при сниженной скорости образования ДНКЖ из-за очень низкого содержания глутатиона (в 15 раз меньше, чем в среде, соответствующей кривой 1 на рис. 1), добавление к среде энергизированных митохондрий (в присутствии сукцината) как генератора супероксида в 2 раза повышало скорость образования ДНКЖ (рис. 2). В этих условиях добавление антимицина А – ингибитора  $bc_1$ -сегмента (комплекса III) митохондриальной дыхательной цепи, блокирующего перенос электрона от цитохрома  $b_{566}$  на окисленный коэнзим Q и резко усиливающего образование супероксида, на порядок повышало скорость образования ДНКЖ (см. рис. 2).

В то же время при усиленном образовании АФК при отсутствии доноров нитроксида распад ДНКЖ значительно ускорялся (рис. 3). Особенно быстро распад происходил при наличии в среде хелатора железа ДТПА (см. рис. 3, а). Участие супероксида в разрушении комплексов подтверждается резким замедлением распада при добавлении в указанную среду СОД, нейтрализующей супероксид (см. рис. 3, а и 4, б), или каталазы, нейтрализующей образующийся при дисмутации супероксида  $H_2O_2$  (см. рис. 4, б). Применение ловушки TIRON позволяет проследить за кинетикой снижения уровня супероксида (см. рис. 4, а). Кроме того, распад комплексов в присутствии супероксида может быть значительно замедлен низкомолекулярными антиоксидантами – кверцетином в микромолярных концентрациях (см. рис. 3, б) или аскорбатом в миллимолярных концентрациях (см. рис. 4, б).

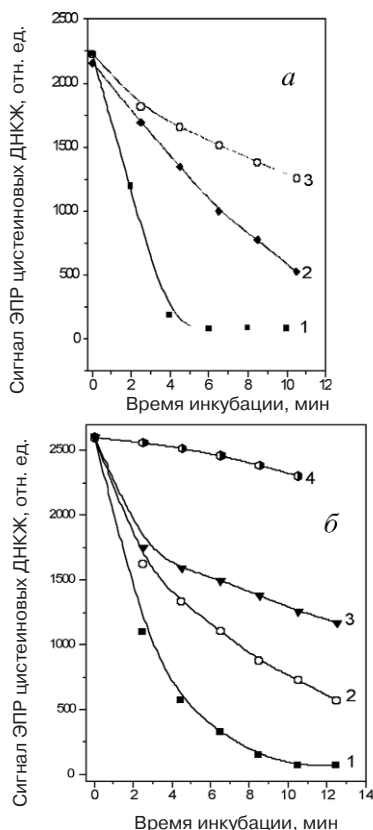
Попавшие в кровоток ДНКЖ быстро связываются с белками, что значительно повышает их устойчивость к аутоокислению (см. рис. 4, б). Однако гене-

Рис. 2. Образование ДНКЖ в реакционной среде.



1 – 0,2 мМ GSH, 3 мМ GSNO и ферритин (2,5 мкг/мл); 2 – среда 1+митохондрии (5 мг белка/мл); 3 – среда 2+антимицин А.

Рис. 3. Ингибирование распада цистеиновых ДНКЖ в условиях ферментативной генерации супероксида под действием СОД (а) или кверцетина (б).

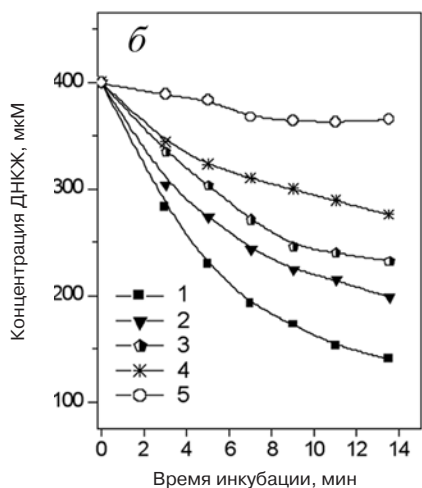
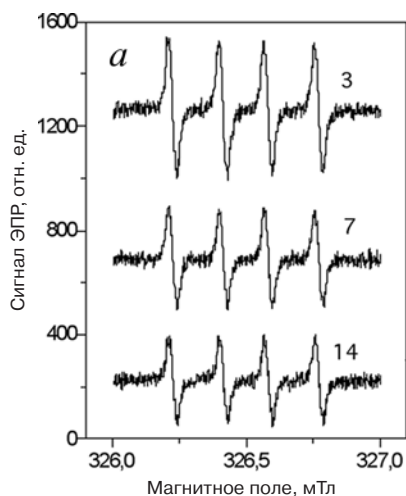


Состав среды: 150 мМ фосфатный буфер (рН 7,4), ксантиноксидаза (0,6 Ед/мл) ксантин (4 мМ), ДТПА (1,1 мМ), ДНКЖ с цистеином (0,2 мМ) и цистеин (4 мМ). 1 – кинетика распада ДНКЖ в этой среде, 2 – добавлена СОД, 3 – аутоокисление ДНКЖ (среда без ксантина).

Для фрагмента б: 1 – деструкция ДНКЖ с цистеином в среде без ДТПА, 2 – аутоокисление ДНКЖ в среде без ДТПА и ксантина, 3 – к среде 1 добавлен кверцетин (0,45 мМ), 4 – кверцетин (0,45 мМ) добавлен к среде 2.

рация супероксида тоже усиливала распад комплексов, связанных с гемоглобином или альбумином.

Рис. 4. а – генерация радикала TIRON супероксида в системе ксантин–ксантинооксидаза при постоянной аэрации (спектры 1–3).



Состав реакционной среды: 150 мМ фосфатный буфер (рН 7,4), ксантин (4 мМ), ксантинооксидаза (0,6 Ед/мл) и 10 мМ TIRON.

б – кинетические кривые разрушения гемоглобиновых ДНКЖ в условиях ферментативной генерации супероксида.

Состав реакционной среды: 1 – тот же, что и в а, но вместо TIRON добавлены гемоглобиновые ДНКЖ (0,4 мМ), 2 – добавлена каталаза (600 Ед/мл), 3 – вместо каталазы добавлена СОД (500 Ед/мл), 4 – к среде 1 добавлен аскорбат Na (4,5 мМ), 5 – самопроизвольный распад гемоглобиновых ДНКЖ в 150 мМ фосфатном буфере без добавок.

Влияние антиоксидантов на устойчивость связанных с белками ДНКЖ оказалось избирательным – аскорбат замедлял распад ДНКЖ, связанных с гемоглобином (рис. 4, б) или альбумином, в то время как кверцетин оказывал подобное действие только на комплексы, связанные с альбумином, но не с гемоглобином. Эти результаты продемонстрировали различия в эффективности антиоксидантов в водной и белковой среде, что предоставляет экспериментатору возможность выбора соответствующего антиоксиданта в зависимости от условий и задачи введения ДНКЖ.

**Действие  $H_2O_2$ .** Далее влияние АФК на реализацию эффекта ДНКЖ было изучено на изолированном сосуде, предварительно сокращенном норадреналином. На этом объекте ДНКЖ с цистеином (1:2) вызывали зависимое от дозы расслабление, имевшее двухфазный характер (рис. 5). Добавление  $H_2O_2$  (100 мкМ) повышало исходный тонус сосуда, на этом фоне эффект тех же доз ДНКЖ был ослаблен и

Рис. 5. Влияние  $H_2O_2$  (100 мкМ, пунктирная кривая) на гипотензивный эффект ДНКЖ (сплошная кривая) в концентрациях 1 мкМ (-6) и 10 мкМ (-5) на изолированной полоске аорты крысы.



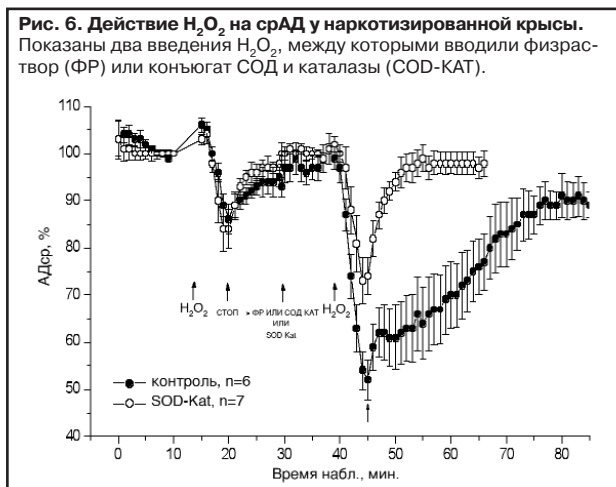
Исходное напряжение, развивающееся после норадреналина (NA), принято за 100%.

значительно укорочен. При добавлении к исходному раствору СОД (25 Ед/мл) – фермента, трансформирующего нативный супероксид в  $H_2O_2$ , продолжительность вазодилаторного ответа увеличивалась, а скорость восстановления тонуса снижалась примерно в 2 раза. Сочетание СОД и каталазы еще больше удлиняло время гипотензивного эффекта.

В связи со способностью  $H_2O_2$  изменять тонус сосуда и модулировать эффект ДНКЖ, действие  $H_2O_2$  в широком диапазоне концентраций было испытано на изолированном сердце, работавшем в изоволюмическом режиме. Низкие концентрации  $H_2O_2$  (до 100 мкМ) снижали тонус коронарных артерий, степень снижения зависела не только от концентрации, но и от исходного сРАД. При повышенном сРАД (около 100 мм рт. ст.) введение  $H_2O_2$  снижало сРАД примерно на 20 мм рт. ст, в то время как при низком сРАД (55 мм рт. ст.) оно снижалось всего на 5 мм рт. ст. Более высокие концентрации  $H_2O_2$  – выше 200 мкМ – всегда повышали сРАД.

Первое введение  $H_2O_2$  наркотизированным крысам вызывало двухфазную реакцию сРАД (рис. 6). Повышение сРАД в первой фазе происходило при неизменной ЧСС. Второе введение  $H_2O_2$  вызывало быстрое и глубокое снижение сРАД, останавливавшееся только с прекращением введения  $H_2O_2$  (рис. 6). Восстановление сРАД происходило медленно, и исходный уровень не достигался даже через 40 мин. Промежуточное введение физраствора не оказывало влияния на сРАД, а введение конъюгата СОД и каталазы значительно уменьшало величину и длительность последующего гипотензивного эффекта  $H_2O_2$ .

**Ишемия и реперфузия миокарда in vivo.** В исходном состоянии сРАД составляло  $95 \pm 7$  мм рт. ст., а ЧСС –  $225 \pm 7$  уд/мин<sup>-1</sup>. Введение ДНКЖ наркотизированному животному сопровождалось быстрым и глубоким снижением сРАД, начинавшимся через  $14 \pm 1$  с и достигавшим минимального значения ( $57 \pm 4$  мм рт. ст.) через  $36 \pm 4$  с (рис. 7). Далее происходило довольно быстрое повышение сРАД, и уже через 2 мин оно достигало  $87 \pm 3$  мм рт. ст. Вторая фаза снижения сРАД начиналась через 5 мин, и к концу ишемии, а также в период реперфузии сРАД оставалось достоверно ниже, чем в контроле. В большинстве случаев (кроме двух) у животных после введения ДНКЖ снижению сРАД предшествовала другая кратковременная (длительностью 1–4 с) реакция – повышение сРАД на 8–20 мм рт. ст. с одновременным снижением ЧСС в среднем на 10%. В контрольной группе введение физиологического раствора не повлияло на сРАД и ЧСС. В обеих груп-



пах на 8–15-й мин региональной ишемии наблюдались нарушения сердечного ритма. Их длительность была существенно меньше на фоне введения ДНКЖ и составила в среднем  $170 \pm 10$  против  $445 \pm 30$  с в контроле ( $p < 0,001$ ).

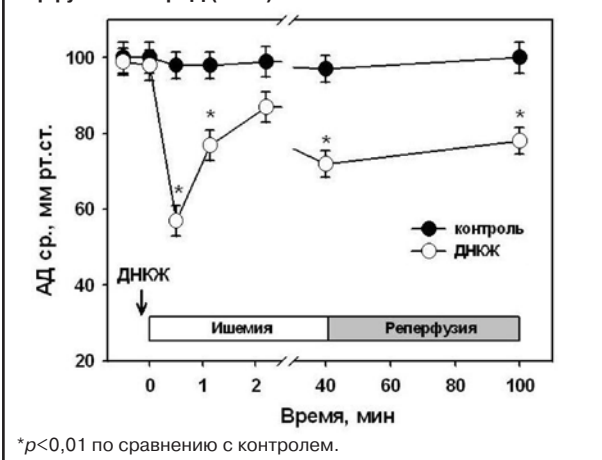
Морфометрический анализ срезов ЛЖ после реперфузии не выявил отличий в ЗР между группами (см. таблицу). Однако размер ИМ был достоверно меньше в группе животных, получивших ДНКЖ непосредственно перед наложением лигатуры. Таким образом, использованная доза ДНКЖ, оказывавшая обычное вазодилаторное действие, достоверно уменьшала и риск развития аритмии, и реперфузионное повреждение миокарда.

### Обсуждение

Полученные результаты свидетельствуют о том, что действие АФК на эффект ДНКЖ является неоднозначным. Супероксид выступает не только как необходимый элемент образования ДНКЖ, но и как его регулятор. С одной стороны, супероксид, генерируемый ксантиноксидазой либо энергизованными митохондриями, стимулирует образование ДНКЖ, особенно при высокой концентрации свободного нитроксида. Поскольку указанные компоненты являются естественными метаболитами, полученный результат означает, что ДНКЖ могут образовываться в клетках при умеренном окислительном стрессе и, тем самым, формировать собственный внутриклеточный пул NO. Эти данные согласуются с концепцией А.Ф.Ванина [1, 4], рассматривающего ДНКЖ как форму запасаения NO в клетках. Преимущество ДНКЖ перед NO в этом плане, очевидно, состоит в увеличении длительности эффекта, поскольку NO представляет собой молекулу с кратким периодом жизни (3 с). В процессе образования ДНКЖ в клетках, по-видимому, участвует и стимулируемое супероксидом высвобождение ионов железа из его внутриклеточных депо [17]. С другой стороны, вполне вероятно, что наряду с синтезом ДНКЖ происходит их деструкция под действием  $O_2$ , проявляющаяся особенно при низком уровне NO. Из этого следует, что для образования ДНКЖ необходим определенный баланс между интенсивностью генерации супероксида, содержанием NO и “свободного” железа.

Образующиеся в крови ДНКЖ легко связываются с белками, что сильно замедляет выход нитроксида и обеспечивает длительное вазодилаторное действие *in vivo* [2, 3]. Наличие подобного эффекта на изолированном сосуде или сердце позволяет пред-

**Рис. 7. Влияние ДНКЖ (81,6 мг/кг), введенных внутривенно крысам перед 40-минутной окклюзией передней нисходящей коронарной артерии и последующей 60-минутной реперфузией на срАД (n=12).**



\* $p < 0,01$  по сравнению с контролем.

**Таблица. Влияние введения ДНКЖ крысам перед окклюзией передней коронарной артерии на размеры зоны риска и инфаркта миокарда левого желудочка.**

	ЗР/ЛЖ, %	ЗИ/ЗР, %
Контроль	$38,7 \pm 6,3$	$48,0 \pm 3,9$
ДНКЖ	$37,7 \pm 2,9$	$36,9 \pm 1,1^*$

Представлены  $M \pm m$  для серий из 8 опытов. Размеры зоны риска (ЗР) выражены в % к весу левого желудочка (ЗР/ЛЖ), а размер зоны инфаркта миокарда (ЗИ) – в % к зоне риска (ЗИ/ЗР).

\* Величина достоверно отличается от контроля ( $p < 0,02$ ).

положить, что при отсутствии белков плазмы ДНКЖ могут связываться и с белками эндотелиальных клеток или/и действующим началом могут быть соединения, находящиеся в динамическом равновесии с ДНКЖ, в частности нитрозотиолы. Как показали наши данные, длительность жизни ДНКЖ в крови в высокой степени зависит от уровня АФК. Низкомолекулярные антиоксиданты – флавоноиды, аскорбат, а также антиоксидантные ферменты замедляют распад ДНКЖ и пролонгируют их вазодилаторный эффект, а  $H_2O_2$  укорачивает его. Таким образом, концентрация высоко- и низкомолекулярных динитрозильных комплексов железа может регулироваться АФК и, в свою очередь, влиять на них.

Действие  $H_2O_2$  на сосудистый тонус оказалось сложным. Он уменьшал сосудорасширяющий эффект ДНКЖ на изолированном сосуде, но повышал исходный тонус. Это согласуется с наличием повышенного уровня пероксида в крови у крыс с гипертонией, индуцированной большим потреблением соли [18], и у больных артериальной гипертонией, причем между концентрацией пероксида и уровнем АД существует положительная корреляция [19]. В опытах на изолированном сердце он в умеренных концентрациях, как правило, оказывал гипотензивное действие, которое было в прямой зависимости от исходного уровня срАД. Данный эффект реализуется через высвобождение нитроксида, и блокада образования последнего сочетается с ухудшением сократительной функции сердца в условиях окислительного стресса [8]. Однако снижение тонуса коронарных артерий под влиянием  $H_2O_2$  происходило плавно и достигало пикового значения примерно через 10 мин, после чего развивалось еще более медленное восстановление. Такая динамика отличается от действия нитратов или ДНКЖ. Возможно, что в данной ситуации, когда из-

за высокой скорости перфузии сердца образование нитроксида и так уже близко к максимуму [20, 21], включается другой механизм – образование зависящего от эндотелия гиперполяризующего фактора. Показано, что  $H_2O_2$ , образующийся в эндотелиальных клетках, вызывает расслабление гладкомышечных клеток, связанное с открытием зависимых от  $Ca^{2+}K^+$ -каналов [22].

Еще более сложным оказывается эффект  $H_2O_2$  в опытах *in vivo*. Разница между первым и вторым введением  $H_2O_2$  может быть связана с симпатической активацией, возникающей при первом введении и сопровождающейся подъемом сРАД и ЧСС [6]. Снижение сРАД при втором введении можно объяснить активацией эндотелиальной NO-синтазы [7]. Вместе с тем динамика сРАД при втором введении напоминала действие ДНКЖ [3]. Применение антиоксидантных ферментов значительно уменьшало эффект. Аналогичным наблюдавшемуся в наших опытах эффектом обладает FeSOD, преобразующий нативный супероксид в пероксид [10].

Способность ДНКЖ взаимодействовать с супероксидом и, тем самым, снижать окислительный стресс послужила одной из причин применения ДНКЖ при ишемии и реперфузии сердца, когда процесс образования АФК значительно усиливается. Введение ДНКЖ снижало частоту нарушений ритма во время региональной ишемии и значительно уменьшало размеры ИМ при реперфузии у крыс *in vivo*. Ранее в клинических исследованиях было показано, что внутривенное введение нитратов снижает размеры ИМ и смертность пациентов с острым коронарным синдромом [23, 24]. Цитопротекторные свойства доноров NO – L-аргинина и SPM-5185 (нитропроизводного цистеина) – были изучены при проведении кардиохирургических операций [25, 26]. Включение этих соединений в состав раствора для кровяной кардиоплегии ограничивало размеры ИМ и улучшало восстановление сократительной функции сердца.

Уменьшение ишемического и реперфузионного повреждения сердца под действием фармакологических доноров NO может быть обусловлено комплексом защитных механизмов. Во-первых, NO способен обратно ингибировать цитохромоксидазу (комплекс IV дыхательной цепи) и, тем самым, снижать поглощение кислорода [11, 12]. Во-вторых, стимуляция NO растворимой гуанилатциклазы, сопровождающаяся образованием цГМФ, снижает  $Ca^{2+}$  ток L-типа и уменьшает концентрацию цАМФ [27]. В-третьих, введение ДНКЖ сопровождалось значительным снижением сРАД, что уменьшало нагрузку на сердце. Все эти механизмы снижают потребление кислорода и потребность в энергии ишемизированных миоцитов, что является физиологически значимым во время ишемии и ранней реперфузии [12, 28]. В-четвертых, недавно было показано, что NO, вызывая деполяризацию внутренней митохондриальной мембраны, способен уменьшать повреждения кардиомиоцитов благодаря снижению перегрузки митохондрий ионами  $Ca^{2+}$  [29]. Эти данные свидетельствуют о том, что NO способен воздействовать на критический компонент ишемического-реперфузионного повреждения миокарда – дисбаланс между сниженным производством энергии и ее потреблением в ишемизированных кардиомиоцитах. Наконец, митохондрии способны регенерировать NO из продуктов окисления ДНКЖ (вероятнее всего, из нитрита),

что может повышать концентрацию NO в зоне ишемического поражения и способствовать восстановлению кровотока.

Гибель миоцитов при реперфузии может быть вызвана не только их некрозом, но и активацией их запрограммированной смерти – апоптоза. Известны несколько механизмов, посредством которых NO ингибирует апоптоз миоцитов. Один из них обусловлен S-нитрозилированием каспаз-1 и -3, приводящим к снижению их активности, другой сопряжен с образованием цГМФ и сопутствующим уменьшением перегрузки миоцитов  $Ca^{2+}$ , опосредующей апоптоз, третий включает индукцию цитопротекторных белков теплового шока (HSP 70 и 32) [13]. Таким образом, образующийся из ДНКЖ нитроксид способен блокировать оба основных пути гибели клеток.

Защитный эффект ДНКЖ при реперфузии может также быть связан с другими компонентами комплекса. Благодаря наличию сульфгидрильной (-SH) группы в структуре цистеина этот компонент ДНКЖ способен проявлять антиоксидантные свойства и уменьшать ишемическое и реперфузионное повреждение сердца [30]. Кроме того, входящий в состав ДНКЖ полисахарид декстран при реперфузии может восполнять функцию белков плазмы, поддерживая осмотическое давление в интерстиции, и, тем самым, предохранять ишемизированные кардиомиоциты от осмотического шока [31]. Вклад каждого из них в уменьшении гибели клеток от ишемии и реперфузии предстоит выяснить в дальнейшем.

**Работа частично поддержана (РФФИ гранты №06-04-48203а, №06-04-08002-офи, 06-08-00011, №05-04-49751).**

#### Литература

1. Vanin AF, Stukan RA, Manukhina EB. Physical properties of dinitrosyl iron complexes in relation with their vasodilator activity. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1295: 5–12.
2. Галаган М.Е., Орановская Е.В., Мордвицев П.И. и др. Гипотензивный эффект динитрозильных комплексов железа на бодрствующих животных. *Бюл. ВКНЦ* 1988; 2: 75–80.
3. Лакомкин В.Л., Тимошин А.А., Ванин А.Ф. и др. Длительный гипотензивный эффект стабильных динитрозильных комплексов железа у бодрствующих нормотензивных и гипертензивных крыс. *Кардиологич. вестн.* 2006; 1 (1): 42–7.
4. Vanin AF, Huisman A, Stroes ESG et al. Antioxidant capacity of mononitrosyl-iron-dithiocarbamate complexes: implications for NO trapping. *Free Radic Biol Med* 2001; 30 (8): 813–24
5. Hanspal IS, Magid KS, Webb DJ, Megson IL. The effect of oxidative stress on endothelium-dependent and nitric oxide donor-induced relaxation: implications for nitrate tolerance. *Nitric Oxide* 2002; 6 (3): 263–70.
6. Huang HS, Stahl GL, Longhurst JC. Cardiac-cardiovascular reflexes induced by hydrogen peroxide in cats. *Am J Physiol* 1995; 268 (5 Pt 2): H2114–24.
7. Bbaradwaj L, Prasad K. Mediation of H2O2-induced vascular relaxation by endothelium-derived relaxing factor. *Mol Cell Biochem* 1995; 149–150: 267–70.
8. Valen G, Skjelbakken T, Vaage J. The role of nitric oxide in the cardiac effects of hydrogen peroxide. *Mol Cell Biochem* 1996; 159 (1): 7–14.
9. Bryan RM Jr, Steenberg ML, Marrelli SP. Role of endothelium in shear stress-induced constrictions in rat middle cerebral artery. *Stroke* 2001; 32: 1394–400.
10. Aleksic T, Jovovic D, Miloradovic Z, et al. The effects of iron-containing superoxide dismutases on haemodynamic parameters in spontaneously hypertensive rats. *Acta Physiol Hung* 2006; 93 (4): 285–92.
11. Clementi E, Brown GC, Foxwell N, Moncada S. On the mechanism by which vascular endothelial cells regulate their oxygen consumption. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96 (4): 1559–62.

12. Loke KE, McConnell PI, Tuzman JM et al. Endogenous endothelial nitric oxide synthase-derived nitric oxide is a physiological regulator of myocardial oxygen consumption. *Circ Res* 1999; 84 (7): 840–5.
13. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43: 109–42.
14. Максименко АВ, Тищенко ЕГ. Модификация каталазы хондроитинсульфатом. *Биохимия* 1997; 62 (10): 1364–8.
15. Kitakaze M, Takashima S, Funaya H et al. Temporary acidosis during reperfusion limits myocardial infarct size. *Am J Physiol* 1997; 272: H2071–8.
16. Писаренко ОИ, Студнева ИМ, Серебрякова ЛИ и др. Защита миокарда крысы селективным ингибитором  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  обмена и ишемическим прекодиционированием. *Кардиология* 2005; 45 (2): 37–44.
17. Biemond P, Swaak AJ, Van Eijk HG, Koster JF. Superoxide dependent iron release from ferritin in inflammatory diseases. *Free Radic Biol Med* 1988; 4: 185–98.
18. Swee A, Lacy F, DeLano FA, Schmid-Schonbein GW. Oxidative stress in the Dahl hypertensive rat. *Hypertension* 1997; 30 (6): 1628–33.
19. Lacy F, O'Connor DT, Schmid-Schonbein GW. Plasma hydrogen peroxide production in hypertensives and normotensive subjects at genetic risk of hypertension. *J Hypertens* 1998; 16 (3): 291–303.
20. Kuo L, Chilian WM, Davis MJ. Interaction of pressure- and flow-induced responses in porcine coronary resistance vessels. *Am J Physiol* 1991; 261: H1706–15.
21. Miura H, Bosnjak JJ, Ning G et al. Role for hydrogen peroxide in flow-induced dilation of human coronary arterioles. *Circ Res* 2003; 92: e31–e40.
22. Matoba T, Shimokawa H, Nakashima M et al. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in mice. *J Clin Invest* 2000; 106: 1521–30.
23. Yusuf S, Collins R, MacMahon S et al. Effect of intravenous nitrates on mortality in acute myocardial infarction: an overview of the randomized trials. *Lancet* 1988; i: 1088–92.
24. European Study of Prevention of Infarct with Molsidomine (ESPRIM) Group. The ESPRIM trial: short-term treatment of acute myocardial infarction with molsidomine. *Lancet* 1994; 344: 91–7.
25. Sato H, Zhao ZQ, McGee DS, et al. Supplemental L-arginine during cardioplegic arrest and reperfusion avoids regional postischemic injury. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1995; 110: 302–14.
26. Nakanishi K, Zhao ZQ, Vinten-Johansen J et al. Blood cardioplegia enhanced with nitric oxide donor SPM-5185 counteracts postischemic endothelial and ventricular dysfunction. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1995; 109: 1146–54.
27. Vinten-Johansen J, Zhao ZQ, Nakamura M et al. Nitric oxide and the vascular endothelium in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Ann NY Acad Sci* 1999; 874: 354–70.
28. Brady AJB, Warren JB, Poole-Wilson PA et al. Nitric oxide attenuates cardiac myocyte contraction. *Am J Physiol* 1993; 265: H176–82.
29. Rakbit RD, Mojat MH, Marber MS et al. Mitochondria as targets for nitric oxide-induced protection during simulated ischemia and reoxygenation in isolated neonatal cardiomyocytes. *Circulation* 2001; 103: 2617–23.
30. Genet S, Kale RK, Baguer NZ. Effects of free radicals on cytosolic creatine kinase activities and protection by antioxidant enzymes and sulfhydryl compounds. *Mol Cell Biochem* 2000; 210 (1–2): 23–8.
31. Levitsky S, Mullin ED, Sloane RE et al. Effects of a hyperosmotic perfusate on extended preservation of the heart. *Circulation* 1971; 43: 1–124–1–129.

Н.В.Рагюхина, П.Н.Руткевич, Т.И.Арефьева, А.В.Козлов, Т.Х.Гурская,  
А.Я.Шевелев, И.Н.Рыбалкин, Т.Н.Власик, О.П.Ильинская, Э.М.Тарарак

## Лентивирусная трансдукция малодифференцированных костно-мозговых клеток-предшественников *in vivo*

Институт экспериментальной кардиологии

**Цель исследования.** Создание эффективного способа переноса генов в недифференцированные клетки костного мозга методом лентивирусной трансдукции *in vivo*.

**Материалы и методы.** Выделенные с помощью метода магнитной сепарации клетки костного мозга мыши с фенотипом  $\text{Lin}^-/\text{c-kit}^+$  трансдуцировали с помощью лентивирусного вектора, содержащего маркерный ген, кодирующий зеленый флуоресцентный белок (сopGFP). Долю клеток, экспрессирующих трансген, оценивали на поточном цитофлуорометре. Трансдуцированные *in vitro* донорские клетки сами вводили летально облученным самкам-реципиентам для получения селезеночных колоний. Интеграцию генетической конструкции в костно-мозговые клетки-предшественники *in vivo* контролировали по наличию в геномной ДНК клеток селезеночных колоний векторной последовательности WPRE (woodchuck post-transcriptional regulatory element). Стабильность интеграции генетической конструкции в геном клеток-мишеней оценивали на культуре фибробластов линии 3T3, которые культивировали в течение 3 мес после трансдукции.

**Результаты.** Предложенная генетическая конструкция позволила добиться высокой эффективности трансдукции малодифференцированных клеток костного мозга и обеспечила высокий (27%) уровень экспрессии трансгена *in vitro*. В экспериментах по получению селезеночных колоний у летально облученных животных было показано, что часть селезеночных колоний содержала трансген, и, следовательно, используемая генетическая конструкция была интегрирована в геном клеток-потомков донорских клеток. Среди донорских костно-мозговых клеток-предшественников, содержащих трансген, присутствовали колониеобразующие единицы, которые способны формировать селезеночные колонии, в том числе недифференцированного типа, у летально облученных животных.

**Заключение.** Выбранная генетическая конструкция, полученная на основе лентивируса HIV, способна эффективно и стабильно трансдуцировать костно-мозговые клетки-предшественники с фенотипом *Lin<sup>-</sup>c-kit<sup>+</sup>* *in vivo*.

**Ключевые слова:** костно-мозговые клетки-предшественники, лентивирусные векторы, трансдукция, селезеночные колонии.

*N.V. Radyukhina, P.N. Rutkevich, T.I. Arefyeva, A.V. Kozlov, T.Kh. Gurskaya, A.Ya. Shevelev, I.N. Rybalkin, T.N. Vlasik, O.P. Ilyinskaya, E.M. Tararak*

*Institute of Experimental Cardiology*

## IN VIVO LENTIVIRUS TRANSDUCTION OF LOW-DIFFERENTIATED BONE MARROW CELL PROGENITORS

**Aim.** To develop an effective procedure for gene transfer to undifferentiated bone marrow cells by *ex vivo* lentivirus transduction.

**Materials and methods.** The bone marrow cells of a mouse with the phenotype *Lin<sup>-</sup>c-kit<sup>+</sup>*, isolated by magnetic separation, were transduced using the lentivirus vector containing a marker gene encoding for green fluorescent protein (cop GFP). The proportion of transgene-expressing cells was estimated on a flow cytofluorometer. The *in vitro* transduced male donor cells were administered to the lethally irradiated female recipients to obtain splenic colonies. The *in vivo* integration of the genetic make-up into the bone marrow cell progenitors was monitored by the presence of the cells of splenic colonies of the vector sequence WPRE (woodchuck post-transcriptional regulatory element) in genomic DNA. The stability of integration of the genetic make-up into the genome of target cells was evaluated on a culture of NIH3T3 fibroblasts that had been cultured within 3 months after transduction.

**Results.** The proposed genetic make-up has ensured a high efficiency of transduction of low-differentiated bone marrow cells and a high (27%) level of transgene expression *in vitro*. The experiments to obtain splenic colonies in lethally irradiated animals demonstrated that the portion of splenic colonies contained transgene and therefore the used genetic make-up was integrated into the genome of donor cell progenitors. Among the transgene-containing donor bone marrow cell progenitors, there were colony-forming units that were able to form splenic colonies, including those of the undifferentiated type, in lethally irradiated animals.

**Conclusion.** The chosen HIV lentivirus-based genetic make-up can effectively and stably transduce bone marrow cell progenitors with the phenotype *Lin<sup>-</sup>c-kit<sup>+</sup>* *in vivo*.

**Key words:** bone marrow cell progenitors, lentivirus vectors, transduction, splenic colonies.

В настоящее время перенос генов в кроветворные клетки-предшественники млекопитающих является перспективным и быстро развивающимся методом в биологии и медицине. Это стало возможным в связи с успехами в конструировании векторов, доставляющих гены, представляющие научный и лечебный интерес, в соответствующие клетки [1–3]. В качестве наиболее перспективных генетических конструкций для переноса генов в клетки-предшественники рассматриваются лентивирусные системы трансгенного переноса, в связи с их уникальной способностью доставлять гены в неделящиеся клетки, в том числе и в стволовые [4]. Однако пока максимально достигнутая эффективность трансдукции ранних костно-мозговых клеток-предшественников (КМКП) лентивирусными конструкциями незначительна и не превышает 20% [5, 6]. Низкая эффективность трансдукции (маркирования) таких клеток не позволяет получить полную картину их участия в развитии сосудистых патологий, реэнтотелизации артериальной стенки или новообразований кровеносных сосудов.

Целью исследования являлась разработка оптимального способа переноса генов в геном мало дифференцированных клеток костного мозга (КМ) с помощью лентивирусной трансдукции *in vivo*. Проводили сравнительный анализ двух генетических конструкций, полученных на основе лентивирусов кошачьего (FIV) и человеческого (HIV-1) иммунодефицитов, по их способности трансдуцировать КМКП мыши. В качестве репортерного использовали ген зеленого флуоресцентного белка (copGFP), позволяющий оценить эффективность трансдукции *in vitro* и, в дальней-

шем, проследить за изменениями меченых клеток *in vivo*. Интеграцию выбранной генетической конструкции в КМКП *in vivo* контролировали по наличию в геномной ДНК потомков этих клеток векторной последовательности WPRE с помощью метода селезеночных колоний.

### Материалы и методы

В работе использовали самок и самцов мышей-гибридов (СВА×С57Bl/6) F1 массой 18–20 г.

Получение препаратов псевдовirusных частиц. Для трансдукции КМКП апробировали два варианта генетических конструкций, созданных на основе FIV и HIV. В качестве репортерного обе конструкции содержали ген copGFP под промотором человеческого цитомегаловируса (ЦМВ).

Для получения псевдовirusных частиц на основе HIV, кроме транспортной плазмиды pLA-CG-H1 (“System Biosciences”), использовали две упаковочные плазмиды – pVSV-G и pHIVpack (“System Biosciences”).

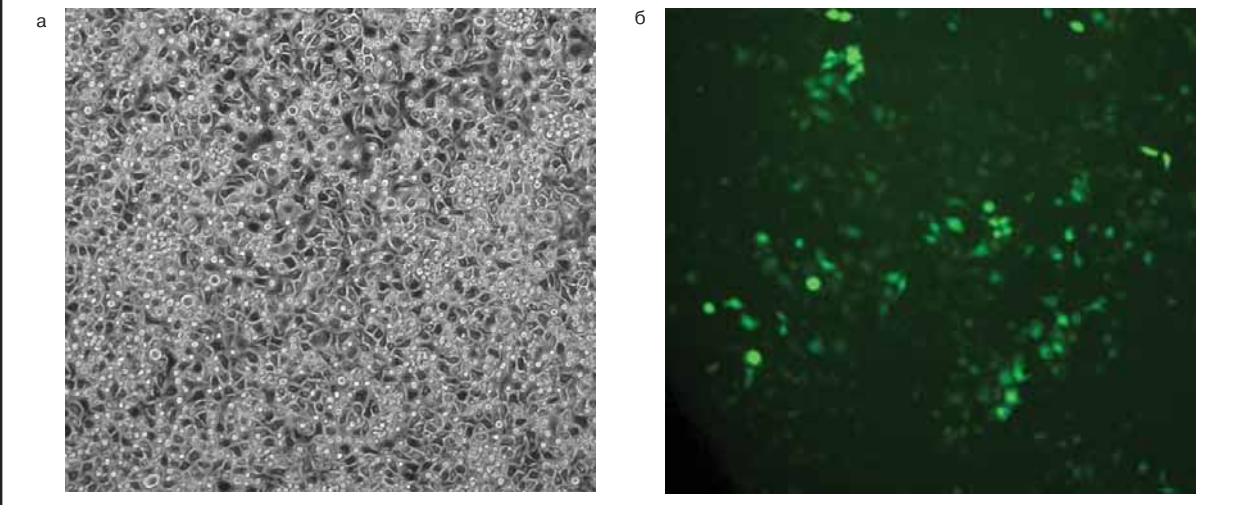
Для упаковки FIV-частиц использовали транспортную плазмиду pCopGXL-H1 (“System Biosciences”) и плазмиду pVSV-G-C34N, которая была объединена из двух плазмид – pVSV-G и pC34N (“System Biosciences”).

Для получения псевдовirusных частиц были взяты клетки-“упаковщики” линии HEK293-T, которые котрансфицировали препаратами плазмид с добавлением липофектамина. Полученные псевдовirusные частицы концентрировали с помощью полиэтиленгликоля. Титр частиц был определен на клетках культуры H1299 и составил от  $1,5 \times 10^6$  до  $1 \times 10^7$  инфекционных частиц/мл.

Выделение субпопуляции ранних клеток-предшественников КМ с фенотипом *Lin<sup>-</sup>c-kit<sup>+</sup>*. Для получе-

**Рис. 1. Экспрессия GFP в культуре, образованной клетками КМ с фенотипом Lin<sup>c-kit</sup>, трансдуцированными псевдовиральными HIV-частицами, на 7-е сутки культивирования (×150).**

а – фазовый контраст; б – флюоресцентная микроскопия.



ния субпопуляции ранних КМКП применяли двухэтапный метод магнитной сепарации клеток с использованием магнитных микроносителей из коллоидного железа MACS MicroBeads в соответствии с протоколом производителя (“Miltenyi Biotec”).

На I этапе от тотальной популяции клеток КМ отделяли клетки, не несущие на поверхности “линейные” маркеры. Для этого суспензию клеток КМ мыши окрашивали коктейлем моноклональных антител против маркеров разных направлений дифференцировки кроветворных клеток (CD5, CD45R, CD11b, LybG и Ter 119), конъюгированных с микроносителями. Клетки, не несущие на поверхности “линейные” маркеры, были отделены пропусканием клеточной суспензии через находящуюся в магнитном поле колонку LS Column (“Miltenyi Biotec”), заполненную ферромагнитным материалом.

На II этапе из полученной субпопуляции выделяли клетки, несущие на поверхности рецептор к фактору стволовых клеток c-kit. Клетки, изолированные на I этапе, окрашивали антителами против c-kit, конъюгированными с микроносителями, и пропускали через колонку. Полученную популяцию КМКП подвергали субпопуляционному анализу на поточном цитофлюорометре FACSCalibur (“BD Immunocytometry Systems”) после окрашивания специфическими антителами против белков – маркеров стволовых и низкодифференцированных клеток: c-kit, Sca-1, CD34 (“BD Biosciences”).

*Трансдукция субпопуляции ранних костномозговых кроветворных клеток-предшественников с фенотипом Lin<sup>c-kit</sup> in vitro.* Для трансдукции свежeweделенные клетки с фенотипом Lin<sup>c-kit</sup> высаживали в 24-луночный планшет в ростовую среду, содержащую 10% инактивированной нагреванием сыворотки, с добавлением цитокинов интерлейкина-3 (ИЛ-3), ИЛ-6 и фак-

тора стволовых клеток. После внесения псевдовиральных частиц и полибрена (конечная концентрация – 5 мкг/мл) клетки инкубировали при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> и через 24 ч отмывали и добавляли свежей среды.

Для обеспечения наибольшей эффективности трансдукции КМКП in vitro сравнивали два варианта генетических конструкций, созданных на основе FIV и HIV, иммунодефицитов, по их способности к интеграции в геном этих клеток с последующей экспрессией встроившегося гена. После трансдукции псевдовиральными частицами с разными титрами клетки культивировали в течение 1 нед, а затем анализировали на поточном цитофлюорометре, определяя долю клеточных элементов, экспрессирующих GFP. Во время культивирования проводили также визуальную оценку цитотоксического эффекта, оказываемого псевдовиральными частицами.

*Трансдукция и культивирование фибробластов мыши линии NIH3T3.* Для подтверждения способности выбранной генетической конструкции эффективно и стабильно встраиваться в геном клеточной мишеней, а также экспрессировать введенный трансген, трансдуцировали фибробласты мыши (линия NIH3T3). Выбор объекта для данного эксперимента был обусловлен тем, что эти клетки, в отличие от клеток переживающей культуры КМ, можно легко культивировать в течение длительного периода времени.

Для трансдукции мышинные фибробласты линии NIH3T3 высаживали в 6-луночный планшет, в ростовую среду DMEM, содержащую 10% инактивированной нагреванием сыворотки плода коровы.

После внесения препарата псевдовиральных частиц, полученного на основе HIV и полибрена (конечная концентрация 5 мкг/мл) клетки инкубировали при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>, затем через 48 ч от-

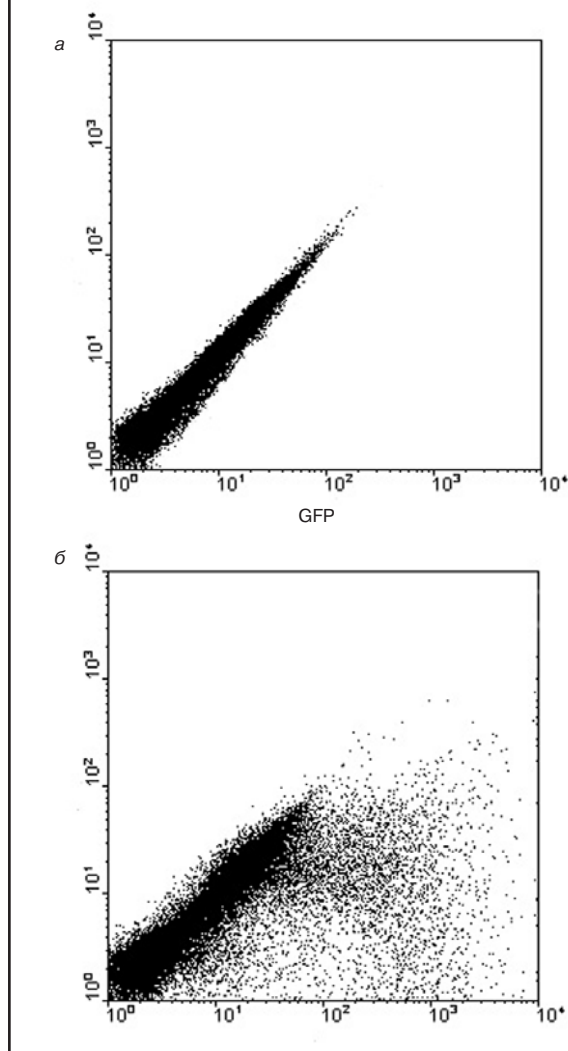
**Таблица. Характеристика групп экспериментальных животных**

Группа самок-реципиенток	Донорские клетки самцов	Число введенных клеток	Инкубация с псевдовиральными частицами (трансдукция)
1-я (опыт; n=8)	Lin <sup>c-kit</sup>	2×10 <sup>3</sup>	+
2-я (контроль; n=4)	Lin <sup>c-kit</sup>	2×10 <sup>3</sup>	-
3-я (контроль; n=4)	Клетки нефракционированного КМ	3×10 <sup>4</sup>	-

Примечание. n – число животных в группе.

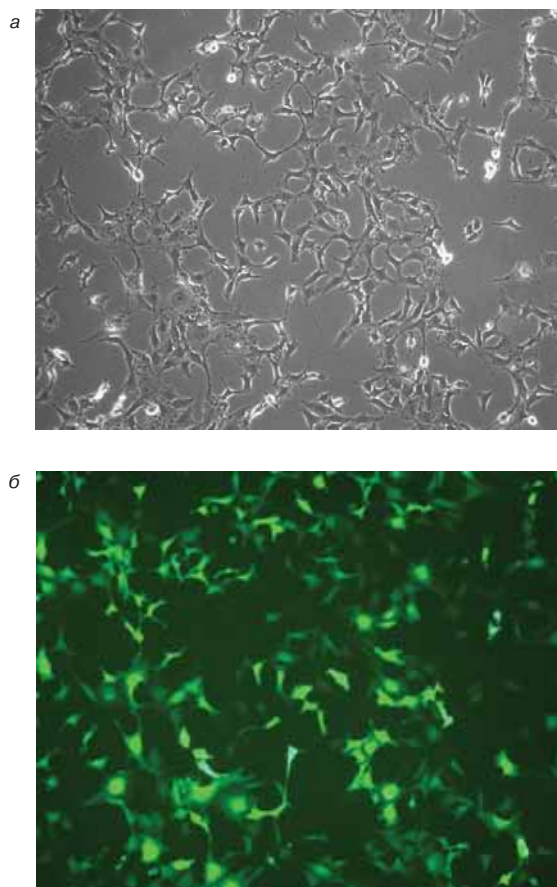
**Рис. 2.** Результат анализа на потоочном цитофлуориметре суспензии клеток КМ с фенотипом Lin<sup>-</sup>c-kit<sup>+</sup> через 7 сут после трансдукции генетической конструкцией на основе лентивируса HIV-1.

а – контроль (нетрансдуцированные клетки); б – опыт (трансдуцированные клетки). Интенсивность флуоресценции указана в условные единицы флуоресценции.



**Рис. 3.** Экспрессия GFP фибробластами линии NIH3T3 на 45-е сутки культивирования после трансдукции генетической конструкцией на основе лентивируса HIV-1 (×150).

а – фазовый контраст; б – флуоресцентная микроскопия.



**Рис. 4.** Макроскопически различимые колонии (указаны стрелками) в селезенках летально облученных самок-реципиентов на 10-е сутки после трансплантации  $2 \times 10^3$  трансдуцированных клеток КМ с фенотипом Lin<sup>-</sup>c-kit<sup>+</sup> самцов-доноров.



мывали и культивировали в течение 3 мес. Часть клеток 1 раз в неделю брали для анализа. Долю клеточных элементов, экспрессирующих GFP, оценивали на потоочном цитофлуориметре. Наличие фрагмента векторного генома в ДНК, выделенной из этих клеток, а также количество встроившихся копий векторной последовательности на 1 клетку определяли с помощью метода полимеразной цепной реакции (ПЦР).

**Тестирование результатов трансдукции КМКП *in vivo*. Получение селезеночных колоний.** Для контроля интеграции выбранного вектора в геном недифференцированных клеток КМ *in vivo* использовали метод получения селезеночных колоний. Для получения селезеночных колоний гибридных самок (СВА×С57Bl/6)F1 облучали двумя равными дозами с перерывом в 3 ч на <sup>137</sup>Cs-установке ИПК. Общая доза облучения составила 10 Гр. После облучения самкам-реципиентам внутривенно вводили суспензию трансдуцированных клеток КМ самцов той же линии. В качестве контрольных использовали 2 группы животных, которым вводили нетрансдуцированные клетки с фенотипом Lin<sup>-</sup>c-kit<sup>+</sup> или нативные клетки нефракционированного КМ. Всем животным вводили донорские клетки в коли-

честве, необходимом для получения дискретных селезеночных колоний. Дозы введенных клеток и характеристика групп экспериментальных животных представлены в таблице.

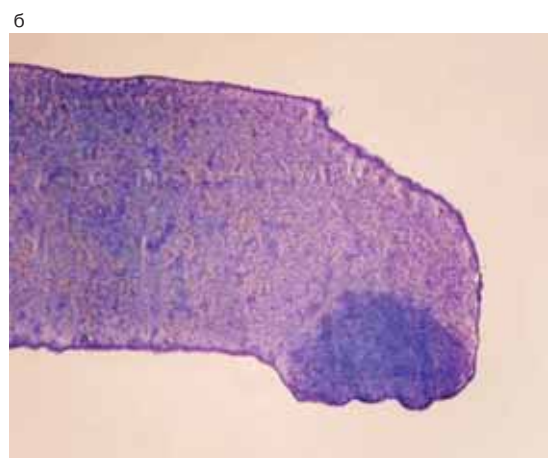
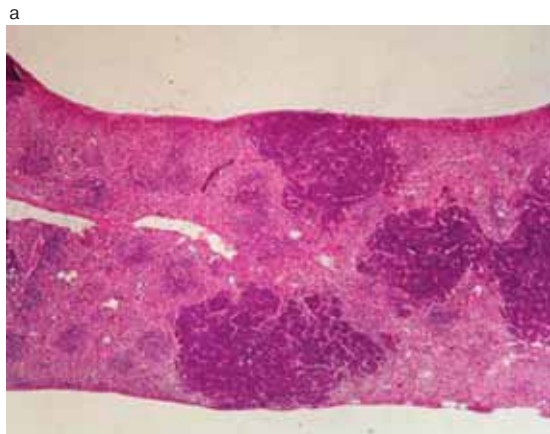
На 10-е сутки после облучения из селезенок изолировали отдельные колонии, из клеток которых выделяли геномную ДНК. Выделенную ДНК анализировали с помощью ПЦР для выявления двух маркерных фрагментов ДНК. Наличие одного из них – фрагмента ДНК Y-хромосомы – подтверждало донорскую природу клеток колоний, а другого – фрагмента векторной последовательности WPRE – интеграцию лентивирусной конструкции в ДНК клеток.

Для подтверждения донорской природы колоний использовали праймеры, специфичные для Y-региона самцов: прямой (AAG TTG GCC CAG CAG



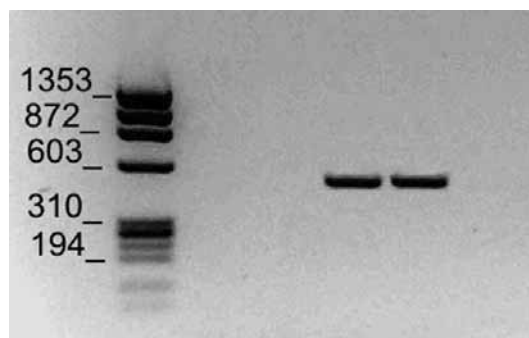
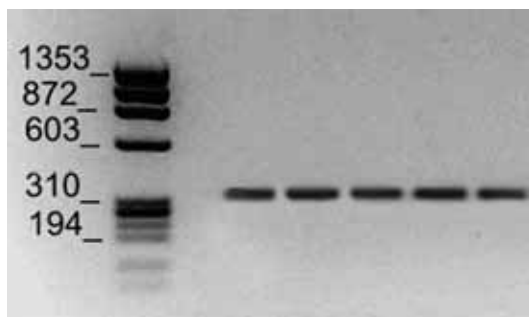
**Рис. 5. Гистологическое исследование селезенок самок-реципиентов через 10 сут после трансплантации донорских клеток КМ самца.**

*а* – селезенка мыши контрольной группы (вводили клетки нефракционированного КМ): видны эритроидные колонии. Окраска гематоксилин-эозином ( $\times 40$ ). *На врезке* – фрагмент эритроидной колонии ( $\times 200$ ); *б* – селезенка мыши опытной группы (вводили трансдуцированные клетки КМ субпопуляции Lin<sup>-</sup>c-kit<sup>+</sup>): видна колония недифференцированного типа. Окраска гематологическим красителем Гимзы ( $\times 40$ ). *На врезке* – фрагмент колонии ( $\times 600$ ).



**Рис. 6. Результат ПЦР-анализа ДНК клеток селезеночных колоний одной из мышей опытной группы на Y-хромосомный маркер (а) и фрагмент векторной последовательности WPRE (б).**

Электрофорез продуктов амплификации последовательностей ДНК в агарозном геле. 1–5 – номера колоний.



вании генетический конструкции, созданной на основе HIV, в результате переноса которой клеток, экспрессирующих трансген, оказалось от 2,5 до 27%.

При исследовании с помощью фазово-контрастной и флуоресцентной микроскопий, в тех случаях, когда удавалось добиться большой эффективности трансдукции КМКП FIV-частицами, в культуре наблюдали большое количество клеточного детрита, и лишь изредка встречались конгломераты созревающих кроветворных клеток. Заметный токсический эффект на клетки оказывали также псевдовиральные частицы, созданные на основе вируса HIV, с титром  $1 \times 10^7$  инфекционных частиц/мл.

HIV-частицы с титром  $2 \times 10^6$  инфекционных частиц/мл не только позволили добиться высокой (27%) эффективности трансдукции, но и оказывали минимальный цитотоксический эффект *in vitro*. Культура КМКП, трансдуцированных этими частицами, почти не отличалась от таковой, не подвергшейся заражению (рис. 1 *а, б*).

Результаты анализа этих клеток на поточном цитофлуорометре представлены на рис. 2 *а, б*.

Таким образом, в результате сравнительного анализа эффективности двух разных систем трансдукции, для дальнейших экспериментов *in vivo* был выбран препарат псевдовиральных HIV-частиц с титром  $2 \times 10^6$  на 1 мл.

При проведении еженедельного цитофлуорометрического анализа было показано, что доля флуоресцирующих клеток фибробластов мыши линии NIH3T3 составила 92% и практически не изменялась в течение всего периода длительного культивирования. В течение первых 15 сут эксперимента интенсивность флуоресценции увеличивалась, что, по-видимому, свидетельствовало о накоплении белка в клетках. В дальнейшем показав

AAT) и обратный (CTC CGA TGA GCC TGA TAT) [7]. Для выявления фрагмента векторной последовательности WPRE использовали праймеры фирмы "System Biosciences". ПЦР-продукты, полученные в результате амплификации ДНК, разделяли электрофорезом в агарозном геле.

Часть селезенок с колониями фиксировали смесью Буэна, обезвоживали, заливали в парафин, получали парафиновые срезы, которые окрашивали гематологическим красителем Гимзы ("Sigma") и анализировали под микроскопом.

### Результаты и обсуждение

После выделения субпопуляции КМКП с фенотипом Lin<sup>-</sup>c-kit<sup>+</sup> методом магнитной сепарации ее клеточный состав анализировали на поточном цитофлуорометре. Внутри этой популяции выявлены полипотентные КМКП с фенотипом Lin<sup>-</sup>c-kit<sup>+</sup>Sca-1+CD34<sup>+</sup> (0,4–1,0%), которые, по данным литературы, способны давать клетки всех направлений кроветворной дифференцировки [8].

При сравнительном исследовании эффективности двух вариантов генетических конструкций оказалось, что среди клеток, трансдуцированных псевдовиральными FIV-частицами, доля экспрессирующих GFP составила 8–27%. Практически аналогичные результаты были получены и при использо-

тели интенсивности флюоресценции вышли на плато и оставались практически без изменений до конца культивирования. Экспрессия маркерного белка GFP трансдуцированными фибробластами представлена на рис. 3.

Количественный ПЦР-анализ ДНК, выделенной из трансдуцированных клеток линии NIH3T3, показал, что число встроенных копий векторной последовательности составило 5–7 на 1 клетку и практически не изменялось в течение всего периода культивирования.

Таким образом, анализируя результаты данной части эксперимента, можно заключить, что вектор, созданный на основе лентивируса HIV, способен эффективно и стабильно трансдуцировать фибробласты линии NIH3T3.

При тестировании результатов трансдукции КМКП *in vivo* методом селезеночных колоний было выявлено, что пролиферация в селезенке введенных кроветворных клеток приводит к образованию в ней очагов кроветворения (колоний), отчетливо визуализирующихся через 10 дней после трансплантации (рис. 4).

Гистологическое исследование селезенки мышей 3-й группы (см. таблицу), которым после облучения вводили клетки нефракционированного КМ, позволило обнаружить все характерные типы селезеночных колоний: эритроидные (рис. 5, а), миелоидные, мегакариоцитарные и смешанные, что соответствует данным литературы [9].

Среди селезеночных колоний мышей 1-й и 2-й групп (см. таблицу) значительная часть была представлена колониями недифференцированного типа, состоящими из морфологически неидентифицируемых лимфоцитоподобных и бластных элементов (рис. 5, б).

Анализ результатов этой части эксперимента позволил сделать вывод о том, что при выделении КМКП с фенотипом Lin<sup>-</sup>c-kit<sup>+</sup> произошло значительное обогащение субпопуляции ранними кроветворными клетками-предшественниками.

Для подтверждения донорской природы колоний, образующихся в селезенке самок-реципиентов, выделенную из них ДНК исследовали на наличие фрагмента Y-хромосомы самца. Оказалось, что ДНК клеток колоний как опытной, так и обеих контрольных групп животных содержала фрагмент Y-хромосомы (рис. 6, а). Это свидетельствовало о том, что все колонии самок-реципиентов произошли из КМКП самцов-доноров.

Кроме того, ДНК клеток колоний животных опытной группы анализировали на присутствие в геноме векторной последовательности WPRE. Было показано, что клеточные элементы в 30% колоний селезенки самок-реципиентов содержали этот фрагмент (рис. 6, б). Полученный результат свидетельствует о том, что используемая генетическая конструкция была интегрирована в геном клеток-потомков КМКП донорского происхождения.

## Заключение

В результате проведенного исследования было показано, что генетическая конструкция, создан-

ная на основе лентивируса HIV, *in vitro* способна эффективно трансдуцировать гемопоэтические клетки-предшественники с фенотипом Lin<sup>-</sup>c-kit<sup>+</sup>.

Эксперименты по трансдукции фибробластов мыши линии NIH3T3 подтвердили стабильность интеграции генетической конструкции в геном клеток-мишеней с последующей экспрессией трансгена.

Данные, полученные в результате переноса маркерного гена sorGFP методом *in vivo*, свидетельствуют о наличии среди донорских КМКП колониеобразующих единиц, содержащих трансген и способных формировать селезеночные колонии, в том числе недифференцированного типа, у летально облученных животных.

Результаты, полученные при выполнении настоящей работы, в дальнейшем предполагается использовать для уточнения этапов мобилизации из КМ клеток-предшественников эндотелия и гладкомышечных клеток артериальной стенки, их миграции через кровь и инвазии в область репарации. При последующем исследовании эти этапы, наряду с изучением пролиферации и дифференцировки КМКП в зрелые элементы стенки артерий, могут стать важными точками приложения стратегии генетической терапии сердечно-сосудистых заболеваний.

**Исследование поддержано Госконтрактами Миннауки (№02.445.11.7486, 02.512.11.2049, 02.512.11.2129) и РФФИ (гранты №05-04-48922 и 07-04-01456).**

Авторы выражают благодарность заведующей лабораторией физиологии крови Гематологического научного центра РАМН докт. биол. наук Н.И.Дризе за консультации и помощь в работе.

## Литература

1. Lynch CM, Clowes MM, Osborne WR et al. Long-term expression of human adenosine deaminase in vascular smooth muscle cells of rats: a model for gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89 (3): 1138–42.
2. Messina LM, Podrazik RM, Whitebill TA et al. Adhesion and incorporation of lacZ-transduced endothelial cells into the intact capillary wall in the rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89 (24): 12018–22.
3. Sata M. Role of circulating vascular progenitors in angiogenesis, vascular healing and pulmonary hypertension. *Arterioscl Thromb Vasc Biol* 2006; 26 (5): 1008–14.
4. Saenz DT, Poeschla EM. FIV: from lentivirus to lentivector. *J Gene Med* 2004; Suppl. 1: 95–104.
5. Chen WY, Wu X, Levasseur DN et al. Lentiviral transduction of hematopoietic stem cells that mediate long-term reconstitution of lethally irradiated mice. *Stem Cells* 2000; 18: 352–9.
6. Price MA, Case SS, Carbonaro DA et al. Expression from second-generation feline immunodeficiency virus vectors is impaired in human hematopoietic cells. *Mol Ther* 2002; 6 (5): 645–52.
7. Nagamine CM, Chan KM, Kozak CA, Lau YF. Chromosome mapping and expression of a putative testis-determining gene in mouse. *Science* 1989; 243 (4887): 80–3.
8. Osawa M, Hanada K, Hamada H, Nakauchi H. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science* 1996; 273 (5272): 242–5.
9. Чертков ИЛ, Фриденштейн АЯ. Клеточные основы кроветворения. М.: Медицина, 1977: 8–27.

В.С.Жданов, М.М.Маревичев\*

# Проведение мониторинга атеросклероза аорты и коронарных артерий у практически здоровых людей

Институт клинической кардиологии им. А.Л.Мясникова, Москва;

\* Областное бюро судебно-медицинской экспертизы, Рязань

**Цель.** Изучить эволюцию развития атеросклероза (АС) у практически здоровых людей в трех городах (Москва, Рязань, Якутск) по данным исследований, проведенных с 40-летним интервалом.

**Материалы и методы.** Работа выполнена в рамках программы ВОЗ, разработанной для эпидемиологических морфологических исследований АС. Изучение АС аорты и коронарных артерий (КА) провели у практически здоровых мужчин, умерших в возрасте 20–59 лет от внешних причин (насильственная смерть) и не имевших признаков хронических заболеваний. Повторные исследования проведены в 1963–1965 и 2003–2006 гг. В Якутске были выделены группы коренного и некоренного населения (КН и НН). На I этапе в Москве было 359 наблюдений, в Рязани – 555, в Якутске – 729, на II этапе 215, 190 и 226 наблюдений соответственно. Изучение атеросклеротических поражений в сосудах проводили после окрашивания их суданом IV (для выявления в них липоидоза). Результаты макрометрических исследований АС сопоставляли с данными гистометрического изучения в стандартных участках аорты и КА.

**Результаты.** При повторном исследовании АС у практически здоровых мужчин трех городов, проведенных с 40-летним интервалом, отмечено существенное увеличение тяжести АС. Это выразилось в увеличении площади возвышающихся атеросклеротических поражений в аорте и КА. Площадь липидных пятен в аорте и левой КА также была существенно большей на II этапе исследования у мужчин из Москвы и Якутска.

Наибольший прирост площади возвышающихся атеросклеротических поражений в брюшной аорте на II этапе исследования наблюдали у мужчин Москвы и КН Якутска, в левой КА – у мужского КН и НН Якутска.

**Заключение.** В современных условиях изучение АС в группе практически здоровых людей может быть использовано для проведения популяционных (эпидемиологических) морфологических исследований АС, так как развитие АС аорты и коронарных артерий в этой группе отражает его развитие во всей популяции.

V.S. Zhdanov, M.M. Marevichev

AL. Myasnikov Institute of Clinical Cardiology, Moscow;  
Regional Forensic Medical Examination Office, Ryazan

## MONITORING OF AORTIC ATHEROSCLEROSIS AND CORONARY ARTERIES IN APPARENTLY HEALTHY INDIVIDUALS

**Aim.** To study the evolutionary process of atherosclerosis (AS) in apparently healthy individuals in three cities (Moscow, Ryazan, Yakutsk) from the data of studies conducted at a 40-year interval.

**Materials and methods.** The study was performed within the framework of the WHO program developed for epidemiological and morphological studies of AS. The latter of the aorta and coronary arteries (CA) was examined in apparently healthy males who had died at the age of 20–59 years from external causes (violent death) and had no signs of chronic diseases. Repeated studies were made in 1963–1965 and 2003–2006. Groups of aboriginals and newcomers were identified in Yakutsk. At Stage 1, there were 359 cases in Moscow, 555 cases in Ryazan, and 729 cases in Yakutsk; at Stage 2, there were 215, 190, and 226 cases, respectively. Atherosclerotic lesions were studied in the vessels after painting the latter with Sudan IV (to detect lipoidosis in them). The results of gross metric studies of AS were compared with the data of histometric studies in the standard portions of the aorta and CA.

**Results.** The repeated studies of AS in apparently healthy males from the three cities, conducted at a 40-year interval, revealed a substantial increase in the severity of AS. This manifested as the increased extent of raising atherosclerotic lesions in the aorta and CA. The area of lipid spots in the aorta and left CA was much larger in the males from Moscow and Yakutsk at Stage 2 of the study.

At Stage 2, the greatest increment in the area of raising atherosclerotic lesions was observed in the abdominal aorta of Moscow males and Yakutsk aboriginals and in the left CA of Yakutsk male aboriginals and newcomers.

**Conclusion.** Under the present conditions, the study of AS in the group of apparently healthy individuals may be used for population-based (epidemiological) AS morphological surveys as the development of AS of the aorta and coronary arteries in this group reflects its development in whole community.

**Key words:** review, atherosclerosis, aorta, coronary arteries, healthy population.

Течение атеросклероза (АС) может существенно изменяться на протяжении жизни человека (как ускоряться, так и замедляться). Мониторинг АС в конкретных популяциях населения является важным условием для изучения темпов развития АС, и его результаты могут быть учтены при разработке целенаправленных профилактических мероприятий по снижению заболеваемости и смертности от сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ).

Эпидемиологические морфологические исследования АС, подобные проведенным в 1960 и 1980 г., в настоящее время трудно осуществимы. Это прежде всего связано с резким сокращением вскрытий умерших, тогда как программа эпидемиологических морфологических исследований АС ВОЗ основывается на проведении вскрытий не менее 75% умерших в регионе или городе [1-4]. К тому же эти исследования основываются на макроскопическом изучении атеросклеротических поражений, что не позволяет полностью учитывать их полиморфизм и качественные особенности.

Важным условием изучения АС в популяциях в современных условиях является выбор группы лиц для таких исследований, которые отражали бы темпы развития АС во всей популяции, и чьи материалы были бы доступны для изучения. Ранее нами было показано, что такой группой лиц могут быть практически здоровые люди, умершие от случайных причин, у которых при вскрытии не были бы выявлены хронические заболевания [5-7]. Материалы для исследований этой группы умерших доступны для исследования, поскольку вскрытия этих лиц производятся в судебно-медицинском порядке. Развитие АС у лиц из такой группы в наибольшей степени отражает естественное его течение у человека; тогда как у людей, умерших от различных заболеваний, развитие АС нередко существенно меняется под их влиянием [5].

В силу значительной однородности группы практически здоровых людей необходимое количество наблюдений для проведения исследований АС может быть ограничено сравнительно небольшим числом наблюдений – 30-40 случаев для одного десятилетия жизни. Однако при изучении разных факторов риска (ФР), которые могут влиять на развитие АС, число наблюдений должно быть большим. К таким ФР относятся курение, злоупотребление алкоголем, избыточная масса тела, профессиональный фактор, семейный анамнез в отношении ССЗ и др.

Ранее было показано, что имеются значительные различия в выраженности АС у лиц разных этнических групп населения, проживающих в одном городе [4]. С целью повышения однородности изучаемых групп в исследование предлагается включать только лиц, постоянно проживающих в данном регионе, и учитывать их этническую принадлежность.

Мониторинг АС в рамках предлагаемых исследований может быть проведен с любым временным интервалом. Установление величины этого интервала представляет интерес для определения "подвижности" развития АС со временем у человека и роли разных факторов, влияющих на изменение темпов его развития.

*Целью настоящей работы* был анализ результатов изучения АС у практически здоровых людей

в трех городах (Москва, Рязань, Якутск) по данным исследований, проведенных с 40-летним интервалом.

### Материалы и методы

Исследование выполнено в рамках программы, разработанной ВОЗ для изучения эпидемиологии АС по материалам вскрытий умерших в разных регионах и городах [3]. Сравнительное изучение АС аорты и коронарных артерий (КА) проведено у практически здоровых мужчин, умерших в возрасте 20-59 лет от внешних причин (насильственная смерть) и не имевших признаков хронических заболеваний. Повторные исследования АС проведены с интервалом 40 лет (I этап – 1963-1965 гг. и II – 2003-2006 гг.). В Якутске были выделены группы коренного (КН) и некоренного (НН) населения. На I этапе в Москве было 359 наблюдений, в Рязани – 555, в Якутске – 729, на II этапе 215, 190 и 226 наблюдений соответственно. При вскрытии этих лиц заболеваний, связанных с АС и ревматическим поражением сердца, признаков легочного сердца и других заболеваний не выявлено. Масса сердца у мужчин не превышала 400 г.

Морфометрическое исследование АС проводили в грудном и брюшном отделах аорты, правой коронарной артерии (ПКА), нисходящей (ветви левой) КА (НКА). Для лучшего выявления липоидоза препараты аорт и КА предварительно окрасивали стандартным раствором судана IV в изопропиловом спирте [2-4]. Визуально-планиметрическим методом определяли площадь атеросклеротических поражений (в % к площади всей интимы сосуда): общую площадь поражения, площадь липидных пятен (ЛП), фиброзных бляшек (ФБ), осложненных поражений и кальциноза. В каждом сосуде определяли также частоту выявления указанных видов атеросклеротических поражений. Сравнение результатов двух этапов исследования проводили по 10-летним возрастным группам. Значимость различий по выраженности всех типов атеросклеротических поражений при сравнении данных I и II этапов исследования оценивали, используя критерий t Стьюдента.

Данные исследования представлены в таблицах по площади атеросклеротических поражений в брюшной аорте (БА) и НКА, так как в них отражаются основные закономерности развития АС. При анализе использовали данные по возвышающимся поражениям (ВП), отражающие в наибольшей степени тяжесть АС, и ЛП, характеризующим начальные стадии развития АС. ВП включают в себя три основных типа атеросклеротических поражений: ФБ, осложненные поражения и кальцинированные бляшки (кальциноз).

### Результаты

Во всех трех городах у практически здоровых мужчин на II этапе исследования (по сравнению с данными I этапа) отмечено увеличение площади ВП в БА и НКА (табл. 1). На обоих этапах исследования по мере увеличения возраста у мужчин во всех городах наблюдалось увеличение площади ВП.

На I этапе исследования площадь ВП в аорте была наименьшей у мужского КН Якутска (в 50-59 лет они занимали 15,2% интимы БА), тогда как у мужчин в двух других городах и у НН Якутска пло-



# ЛИПРИМАР®

аторвастатин

## Сила, надежность, уверенность

... Я  ЖИЗНЬ...  
люблю



**Липримар®** (аторвастатин) - селективный конкурентный ингибитор ГМГ-КоА редуктазы - ключевого фермента, превращающего 3-гидрокси-3-метилглутарил-КоА в мевалоновую кислоту - предшественник стероидов, включая холестерин. Липримар снижает содержание в плазме крови общего холестерина, холестерина липопротеинов высокой плотности (Хс-ЛПВП), Липримар снижает уровни холестерина и Хс-ЛПНП в плазме крови, ингибируя ГМГ-КоА редуктазу и синтез холестерина в печени и увеличивая число "печеночных" рецепторов ЛПНП на поверхности клеток, что приводит к усилению захвата и катаболизма Хс-ЛПНП. Липримар (10-80 мг) снижает содержание общего холестерина на 30-46%, Хс-ЛПНП - на 41-61%, аполипопротеина В - на 34-50% и триглицеридов - на 14-33%, повышает Хс-ЛПВП - на 5,1-8,7%. **Показания:** Липримар применяют в сочетании с диетой для лечения пациентов с повышенным уровнем общего холестерина, Хс-ЛПНП, аполипопротеина В, триглицеридов и повышения уровня Хс-ЛПВП у больных первичной гиперхолестеринемией, комбинированной гиперлипидемией, с повышенным содержанием триглицеридов в плазме крови и больных с дисбеталипопротеинемией; для снижения в плазме крови общего холестерина и Хс-ЛПНП у пациентов с гомозиготной семейной гиперхолестеринемией при недостаточности эффективности диетотерапии и других нефармакологических методов лечения; для предупреждения сердечно-сосудистых осложнений. У пациентов без клинически выраженных симптомов сердечно-сосудистых заболеваний, с наличием или отсутствием дислипидемии, но с имеющимися несколькими факторами риска ИБС, такими как курение, артериальная гипертензия сахарный диабет, низкие концентрации Хс-ЛПВП в плазме крови или ранее развитие ИБС у родственников, препарат показан для снижения: риска развития ИБС со смертельным исходом или нефатального инфаркта миокарда; риска развития инсульта; риска развития стенокардии и необходимости реваскуляризации. **Противопоказания:** Липримар противопоказан больным с повышенной чувствительностью к любому из компонентов препарата; с активными заболеваниями печени или повышением активности трансаминаз сыворотки (более чем в 3 раза по сравнению с верхней границей нормы) неясного генеза; беременным или кормящим женщинам, а также женщинам репродуктивного возраста, не пользующимся адекватными методами контрацепции. С осторожностью применять у пациентов, злоупотребляющих алкоголем и/или страдающих заболеваниями печени (в анамнезе). **Побочное действие:** Липримар обычно хорошо переносится. Побочные реакции, как правило, легкие и преходящие. Нежелательными эффектами, которые встречались при лечении Липримаром чаще всего (>1%), были: бессонница, головная боль, астенический синдром, тошнота, диарея, боль в животе, диспепсия, запор, метеоризм, миалгия. **Особые указания:** до, через 6 и 12 недель после начала применения препарата, после увеличения дозы, а также периодически во время лечения необходимо контролировать функцию печени на предмет увеличения содержания «печеночных» трансаминаз. Если сохраняется повышение уровня АСТ и АЛТ более чем в 3 раза по сравнению с верхней границей нормы или при десятикратном повышении КОФК, рекомендуется снижение дозы или отмена препарата. **Информация для больного:** пациентов необходимо предупредить о том, что им следует немедленно обратиться к врачу при появлении необъяснимых болей или слабости в мышцах, особенно, если они сопровождаются недомоганием или лихорадкой. Дозировка и применение: доза Липримара варьирует от 10 до 80 мг один раз в сутки. Дозу подбирают с учетом исходных уровней Хс-ЛПНП, цели терапии и индивидуального эффекта. Препарат можно принимать в любое время суток, независимо от приема пищи. При поражении почек изменение дозы не требуется. Различий в безопасности, эффективности или же достижении целей гиплипидемической терапии у пожилых людей обнаружено не было. Форма выпуска: таблетки, покрытые оболочкой, 10, 20, 40 и 80 мг. В упаковке 14 или 30 таблеток.



Таблица 1. Средняя площадь ВП в БА и НКА у практически здоровых мужчин в 3-х городах на I-II этапах исследования.

Сосуд	Город	Этап исследования	Возрастная группа, годы			
			20-29	30-39	40-49	50-59
БА	Москва	I	0,3	4,9	11,7	24,4
		II	2,4*	3,0	23,9*	53,5*
	Рязань	I	0,9	2,9	15,5	27,2
		II	3,4*	12,2*	20,9	46,5*
	Якутск	I	1,1	3,0	6,2	15,2
		КН	II	1,2	3,0	11,0*
НН	I	3,3	9,6	21,5	27,8	
	II	4,4	8,9	27,2	37,9*	
НКА	Москва	I	2,4	11,3	11,8	17,7
		II	4,7*	11,9	22,2*	27,1*
	Рязань	I	2,9	10,9	18,6	28,6
		II	6,8*	20,1*	21,6	35,6*
	Якутск	I	3,6	6,5	7,2	15,4
		КН	II	0,6*	6,5	15,6**
НН	I	6,3	12,6	11,4	21,1	
	II	3,8*	13,4	32,8*	34,2*	

Примечание. Здесь и в табл. 2: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  по сравнению с I-м и II-м этапами исследования. Коренное (КН) и некоренное (НН) население Якутска.

Таблица 2. Средняя площадь ЛП в БА и НКА у практически здоровых мужчин в трех городах на I и II этапах исследования.

Сосуд	Город	Этап исследования	Возрастная группа, годы			
			20-29	30-39	40-49	50-59
БА	Москва	I	11,0	12,5	8,1	6,2
		II	14,5*	16,4*	9,5*	5,6*
	Рязань	I	17,5	18,0	13,9	9,4
		II	17,9	13,8	14,4	6,8
	Якутск	I	6,4	6,0	3,9	1,1
		КН	II	11,8*	16,6**	16,0**
НН	I	13,7	12,8	10,2	8,5	
	II	18,1	17,7*	12,2	4,9**	
НКА	Москва	I	1,7	2,1	2,0	1,8
		II	4,1**	3,1**	3,7**	4,5**
	Рязань	I	2,9	3,5	3,1	3,6
		II	2,3	3,6	3,3	3,4
	Якутск	I	0,9	1,8	2,2	5,5
		КН	II	1,9**	3,5**	4,2*
НН	I	1,8	1,2	2,9	1,2	
	II	3,2**	3,7**	4,0	3,7	

щадь ВП была существенно большей и различалась в сравнительно небольших пределах (от 24,4 до 27,8% поверхности интимы БА).

На II этапе исследования различия по площади ВП в БА у мужчин в разных городах были существенно больше и различались в возрастной группе 50-59-летних от 28,0% поверхности их интимы (КН Якутска) до 53,5% (Москва). Эти данные свидетельствуют о разных темпах развития АС в БА у практически здоровых мужчин в разных городах (табл. 1). Максимальный прирост площади ВП среди 50-59-летних отмечался у мужчин Москвы: прирост площади БА на II этапе по сравнению у них составил 119%. Данный показатель у КН Якутска составил 84%, и у мужчин Рязани – 70%. Наименьшим он был у НН Якутска (36%). При этом существенное увеличение площади ВП в аорте у мужчин Москвы и Рязани наблюдали уже с 3-го десятилетия жизни, тогда как у мужчин КН и НН Якутска – только с 5-го.

В КА площадь ВП на II этапе исследования была значительно большей, чем на I этапе, у мужчин Москвы и Рязани с 3-го десятилетия жизни, тогда как у КН и НН Якутска – только с 5-го (табл. 1). Различия по площади ВП в НКА у мужчин в возрасте 50-59 лет на I этапе составляли от 15,4 (КН Якутска) до 28,6% (Рязань), на II этапе эти различия были менее значительными – от 27,1 (Москва) до 35,6% (Рязань).

Прирост площади ВП в НКА на II этапе исследования в 4-м и 5-м десятилетиях жизни был боль-

шим у мужчин Якутска (КН и НН), чем у мужчин Москвы и Рязани. Так, в возрастной группе 50-59 лет прирост площади ВП в НКА у КН и НН Якутска составил 80 и 62% соответственно, у мужчин из Москвы – 53%, а у мужчин Рязани – 24%.

По площади ЛП в БА различия между данными двух этапов исследования у мужчин Рязани были статистически незначимыми, тогда как у мужчин Москвы и КН и НН Якутска площадь ЛП была существенно больше на II этапе исследования (табл. 2). В НКА ЛП у мужчин Москвы и Якутска на II этапе исследования были также большей площади. Так, средняя площадь ЛП в НКА у мужчин КН Якутска в возрасте 20-59 лет на I этапе составляла 2,6% интимальной поверхности, на II этапе – 3,7%; у НН площадь ЛП на II этапе была больше в 2 раза – 1,8 и 3,6% соответственно. Площадь ЛП в НКА на I этапе была большей у мужского НН Якутска, тогда как на II этапе она была практически одинаковой у мужской части как КН, так и НН – 3,6 и 3,7% интимальной поверхности соответственно. У мужчин Рязани существенных различий по площади ЛП в НКА между этапами не выявлено.

## Обсуждение

Данные двух эпидемиологических морфологических исследований АС, проведенных с интервалом 40 лет, свидетельствуют об ускоренном развитии АС у практически здоровых людей в Москве, Рязани и Якутске [8-10]. Ранее нами было показано, что развитие АС в этой группе исследуемых

коррелирует с выраженностью его во всей популяции [4, 6, 7]. Так, при проведении повторных эпидемиологических исследований по АС во всей популяции мужской КН и НН Якутска наблюдалась более значительная его выраженность у НН. Это же нами отмечено и в настоящем исследовании: выраженность АС у практически здоровых людей коррелирует с его выраженностью во всей популяции.

В последние 20–25 лет наблюдалось увеличение смертности от ССЗ в России [11], что можно объяснить более быстрым развитием АС в российской популяции. Ранее в рамках международных эпидемиологических исследований АС по программе ВОЗ было отмечено существенное ускорение развития АС аорты и КА у мужчин в некоторых городах бывшего СССР за 25-летний период [7, 12, 13]. Тогда эти исследования проводили на основании изучения признаков АС у всех умерших, а не только у умерших от внешних причин и не имевших признаков хронических заболеваний. При проведении эпидемиологических исследований ССЗ было показано, что развитие ФР имеет в настоящее время большую распространенность, чем это отмечалось при проведении более ранних исследований. Следует отметить поведенческие и социальные факторы (нерациональное питание, курение, злоупотребление алкоголем, гиподинамия, низкий социальный и образовательный статус), биологические (артериальная гипертензия, дислипидемия, гиперинсулинемия, гипергликемия, тромбогенность) и факторы внешней среды (загрязнение воздуха, воды, почвы) [14].

Различия в развитии АС в разных популяциях населения могут четко выявляться и при гистометрических исследованиях стандартных участков КА и аорты. Ранее нами было отмечено, что у практически здоровых людей в популяциях с быстрыми темпами развития АС и высокой смертностью от ССЗ наблюдаются существенно более выраженные (по гистометрическим параметрам) атеросклеротические изменения, чем в популяциях с более медленными темпами развития АС. Прямая зависимость между выраженностью АС по гистометрическим показателям во всей популяции и в группе практически здоровых людей отмечается уже у лиц молодого (20–39 лет) и даже детского возраста [7, 15, 16]. При гистометрических исследованиях АС в стандартных участках КА и аорты нами учитывались следующие изменения: толщина интактной интимы и ее толщина в зоне атеросклеротических поражений, протяженность очаговой гиперплазии интимы КА (в % к длине ее окружности), протяженность разрушенных участков внутренней эластической мембраны, площадь содержащих липиды клеток и внеклеточных липидов.

При проведении повторных эпидемиологических исследований в 5 европейских городах с интервалом в 25 лет было выявлено замедление развития АС в Мальме (Швеция) и ускоренное его развитие в Риге. Гистометрические исследования стандартного участка ПКА показали также значительно большие изменения у мужчин Риги [17]: это отмечалось в отношении толщины интимы вне изменений ее, протяженности гиперплазии интимы (в % к окружности артерии), толщины ЛП, протяженности дефектов внутренней эластической мембраны артерии. Гиперплазия интимы КА, которая предшествует развитию атеросклероти-

ческих поражений, уже на первых годах жизни была существенно большей в популяциях с ускоренным развитием АС.

Важно подчеркнуть, что проведение гистометрических исследований стандартных участков сосудистой стенки может стать основой для оценки темпов развития и тяжести атеросклеротических поражений в сравниваемых популяциях. Повторные исследования такого типа (проведенные с интервалом в 3, 5 10 и более лет) могут служить основой для оценки темпов развития АС в разных популяциях населения.

В современных условиях имеются большие трудности в получении необходимых материалов, а именно анатомических препаратов для изучения АС у всех или у большинства умерших. Это связано со значительным уменьшением числа умерших, подвергающихся вскрытиям и большими ограничениями по изъятию сосудов. Поэтому изучение АС в различных популяциях населения практически не может быть проведено на методических основах, разработанных в XX веке. В настоящее время изучение АС на популяционном уровне возможно на ограниченных материалах, которые однако должны отражать ситуацию во всей популяции. Такой группой может служить группа практически здоровых людей, умерших от внешних (случайных) причин и не имевших анатомических признаков каких-либо хронических заболеваний.

Существенным дополнением в этих исследованиях является проведение гистометрических исследований стандартных участков артерий, которые позволяют получить важную информацию о количественных и качественных параметрах АС в изучаемых популяциях. Более того, эти исследования могут быть основами для характеристики темпов развития АС в определенных популяциях населения. Гистометрические исследования артерий у людей молодого и даже детского возраста позволяют выявить значительные различия в выраженности предатеросклеротических и ранних атеросклеротических поражений в разных популяциях населения, которые коррелируют с выраженностью АС у взрослых людей в этих городах. Еще большие возможности открывают эти исследования для характеристики АС в разных популяциях при исследовании стандартных участков сосудистой стенки у лиц более старшего возраста.

## Заключение

Развитие АС аорты и КА у практически здоровых людей отражает темпы его развития во всей популяции населения. Это наблюдалось как при макроморфометрическом исследовании атеросклеротических поражений на всем протяжении сосудов, так и при гистометрическом исследовании стандартных участков их. В современных условиях изучение АС в группе практически здоровых людей может быть использовано для проведения популяционных (эпидемиологических) морфологических исследований АС.

При сравнительных исследованиях АС у практически здоровых мужчин трех городов, проведенных с 40-летним интервалом, отмечено существенное увеличение тяжести АС на II этапе исследования у мужчин во всех трех городах. Это выражалось в увеличении площади возвышающихся атеросклеротических поражений в аорте и КА на II этапе исследования. Площадь ЛП в аорте и

ЛКА также была существенно большей на II этапе исследований (по сравнению с таковой на I этапе) у мужчин Москвы и Якутска.

#### Литература

1. McGill H. C. (Ed.) *The Geographic pathology of atherosclerosis. Lab. Invest.* 1968; 18 (5): 463-653.
2. Kagan A, Uemura K. *Grading atherosclerosis in aorta and coronary arteries obtained at autopsy. Bull. WHO.* 1962; 27: 667-79.
3. Kagan AR, Sternby NH, Uemura K. et al. *Atherosclerosis of aorta and coronary arteries in five towns. Bull. WHO.* 1976; 53: 483-645.
4. Вихерт АМ, Жданов ВС, Матова ЕЕ, Антекаръ СГ. *Географическая патология атеросклероза. М: Медицина, 1981: 215 с.*
5. Жданов ВС, Вихерт АМ. *Атеросклероз при различных заболеваниях. М: Медицина, 1976: 208 с.*
6. Вихерт АМ. *Группы наблюдений с высокой и низкой степенью атеросклероза. Бюлл. ВОЗ.* 1977; 53(5-6): 461-68.
7. Жданов ВС, Вихерт АМ, Стернби НГ. *Эволюция и патология атеросклероза у человека. М: Триада -Х, 2002: 143 с.*
8. Саввинова ВД, Жданов ВС, Галахов ИЕ. *Особенности эволюции атеросклероза аорты и коронарных артерий у практически здоровых людей Москвы за 40-летний период. Кардиология 2005, 45(6): 24-8.*
9. Воронова ОВ, Жданов ВС, Аргунов ВА и др. *Исследование атеросклероза аорты и коронарных артерий у мужского населения Якутска за 40-летний период. Арх. пат., 2006; 68(1): 6-10.*
10. Жданов ВС, Галахов ИЕ, Маревичев ММ. *Визуально-планиметрическое изучение атеросклероза у практически здоро-*

*вых людей по аутопсийному материалу. В кн.: Актуальные вопросы судебно-медицинской экспертизы. Сб. тез. Рязань, 2007: 73-7.*

11. Оганов РГ, Масленникова ГЯ. *Смертность от сердечно-сосудистых и других хронических неинфекционных заболеваний среди трудоспособного населения России. Кардиоваскулярная терапия и профилактика 2002; 1(3): 4-8.*
12. *Особенности эволюции коронарного атеросклероза у мужчин в городах Европы и Азии за 25-летний период. Тер. Архив, 1999, 9: 29-33.*
13. Zhdanov VS, Sternby NH, Vikbert AM. et al. *Development of atherosclerosis over a 25 year period: an epidemiological autopsy study in males of 11 towns. IntJ. Cardiology 1999; 68: 95-106.*
14. Оганов РГ, Масленникова ГЯ. *Проблема неинфекционных заболеваний в России, роль факторов риска. В кн.: Укрепление здоровья и профилактика неинфекционных заболеваний в России и Канаде. Под ред. И.С. Глазунова и S.Stacheko. 2006: 3-18.*
15. Султаналиев АА. *Сравнительное изучение диффузного утолщения интимы коронарных артерий у детей первого года жизни - Москвы, Фрунзе и Якутска. Арх. пат. 1986, XL111; 4: 38-44.*
16. Lesauskaite V, Tanganelli P, Bianciardi G. et al. *Histomorphometric investigation of the aorta and coronary arteries in young people of different geographic origin. In: WHO/ISFC Study of pathobiol. determinants of atherosclerosis in youth. Final report. 1997: 81-90.*
17. Zhdanov VS, Sternby NH. *Monitoring of atherosclerosis. IntJ. Cardiology, 2004; 95: 39-42.*

В.В.Кухарчук, К.А.Зыков, В.П.Масенко, Э.Ю.Нуралиев, Р.М.Шахнович,  
Е.Б.Ярвая

от имени исследовательской группы "Атеросклероз и воспаление"\*

## Динамика воспалительного процесса у больных с острым коронарным синдромом и больных со стабильной стенокардией. Сообщение 1. Биохимические и иммунологические аспекты

Институт клинической кардиологии им. А.Л.Мясникова

**Цель исследования.** Сравнить динамику течения воспалительного процесса в двух группах больных ишемической болезнью сердца (ИБС): с острым коронарным синдромом (ОКС) и со стабильной стенокардией (СС).

**Материалы и методы.** В исследовании участвовали 200 мужчин, поступившие в блок интенсивной терапии (больные с ОКС) или в клинические отделения (больные с СС). Всем больным в 1, 3 и 21-й дни пребывания в стационаре проводили клинические, биохимические, иммунологические исследования, в ходе которых определяли маркеры воспаления: интерлейкины (ИЛ-1, 2, 6, 10), фактора некроза опухоли- $\alpha$  ( $\alpha$ -ФНО), высокочувствительный С-реактивный белок (вЧСРБ), растворимые сосудистые клеточные молекулы адгезии (sVCAM), неоптерин, мозговой натрийуретический пептид (МНП), инсулин, С-пептид, фибриноген, D-димер, ингибитор активатора плазминоген-1 (ИАП-1).

Инструментальные методы диагностики включали оценку толщины комплекса интима-медиа (ТИМ) и определение кальциевого индекса в коронарных артериях.

\* Исследовательская группа: акад. Е.И.Чазов (руководитель), проф. М.Я.Руда, проф. Ю.А.Карпов, проф. В.Г.Наумов, проф. В.Н.Титов, проф. Е.П.Панченко, проф. В.Е.Синицин, проф. Ф.Т.Агеев, докт. мед. наук Т.В.Балахонова, канд. мед. наук С.И.Проваторов, канд. мед. наук Е.В.Сорокин, канд. мед. наук М.В.Ежов, докт. мед. наук А.Б.Сумароков, канд. мед. наук А.И.Каминный, канд. мед. наук К.А.Зыков, канд. биол. наук А.А.Каротаева, канд. биол. наук О.М.Поносенко, канд. биол. наук И.А.Собенин.



**Результаты.** У больных ОКС отмечено статистически значимое повышение уровня маркеров воспаления по сравнению с больными со СС: вчСРБ, ИЛ-1 $\alpha$ , sVCAM, неоптерина и C-пептида, МНП, инсулина; три последних показателя оставались повышенными на 21-й день наблюдения, что отражает сохраняющуюся активность воспалительного процесса. Уровни маркеров воспаления (ИЛ-1 $\alpha$ , СРБ, МНП, инсулин) при ОКС через 20 дней снизились и их значения приближались к таковым, наблюдавшимся у больных со СС. У пациентов со СС динамики маркеров воспаления в течение 3 нед не зарегистрировано.

**Заключение.** Полученные данные свидетельствуют об обострении воспалительного процесса у больных с ОКС, что подтверждается выраженным повышением уровней основных маркеров воспаления с постепенным их снижением к 21-му дню заболевания.

**Ключевые слова:** острый коронарный синдром, стабильная стенокардия, атеросклероз, воспаление, маркеры внутрисосудистого воспаления.

V.V. Kukharchuk, K.A. Zykov, V.P. Masenko, E.Yu. Nuraliyev, R.M. Shakhnovich, E.B. Yarovaya  
on behalf of the study "Atherosclerosis and Inflammation" group  
AL. Myasnikov Institute of Clinical Cardiology

### TIME COURSE OF CHANGES IN AN INFLAMMATORY PROCESS IN PATIENTS WITH ACUTE CORONARY SYNDROME AND IN THOSE WITH STABLE ANGINA PECTORIS. COMMUNICATION 1. BIOCHEMICAL AND IMMUNOLOGICAL ASPECTS

**Aim.** To compare the time course of changes in an inflammatory process in two groups of patients with coronary heart disease (CHD): acute coronary syndrome (ACS) and with stable angina (SA).

**Materials and methods.** The study covered 200 male patients admitted to an intensive care unit for ACS or to clinical departments for SA. On days 1, 3, and 21 of their hospital stay, all the patients underwent clinical, biochemical, and immunological studies determining the inflammatory markers, such as interleukins (IL)-1, 2, 6, and 10, tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), highly sensitive C-reactive protein (hsCRP), soluble vascular cell adhesion molecules (sVCAM), neopterin, brain natriuretic peptide (BNP), insulin, C-peptide, fibrinogen, D-dimer, type 1 plasminogen activator inhibitor (PAI-1).

Instrumental diagnostic techniques included estimation of the thickness of the intima-media complex (IMC) and determination of the calcium index in coronary arteries.

**Results.** The patients with ACS, unlike those with SA, were observed to have statistically significantly elevated levels of inflammatory markers, such as hsCRP, IL-1 $\alpha$ , sVCAM, neopterin, C-peptide, BNP, and insulin, the three latter remaining higher on observational day 21, which reflects the preserving activity of the inflammatory process. In ACS, the levels of inflammatory markers (IL-1 $\alpha$ , CRP, BNP, insulin) decreased after 20 days and their values approached those seen in patients SA. In the latter, there were no changes in inflammatory markers within 3 weeks.

**Conclusion.** The findings suggest an exacerbation of the inflammatory process in patients with ACS, as confirmed by the significant elevated levels of the major inflammatory markers with their gradual reduction by the 21st day of the disease.

**Key words:** acute coronary syndrome, stable angina, atherosclerosis, inflammation, intravascular inflammatory markers.

Роль воспаления в развитии атеросклероза (АС) обсуждается давно. Еще в середине XIX в. немецкий морфолог Р.Вирхов и австрийский патоморфолог К. Рокитанский считали воспаление иницилирующим фактором повреждения сосудистой стенки, которое сопровождалось артериосклерозом и тромбозом. В 1912 г. Н.Н.Аничков первым в мире в эксперименте показал ведущую роль гиперхолестеринемии в формировании атеромы. Какое-то время воспалительная и липидно-инфильтрационные теории патогенеза АС противопоставлялись. Но в настоящее время не вызывает сомнений, что каждый из этих факторов играет определенную роль в патогенезе АС, и изучению воспаления (одному из главных "виновников" формирования АС) уделяется большое внимание. Однако все еще нет четкого представления о взаимосвязи воспаления и развития острого коронарного синдрома (ОКС), о том, какие маркеры и на какой стадии заболевания лучше отражают его активность или затихание. В обширной литературе, посвященной этому вопросу, данные часто носят весьма противоречивый характер.

Целью настоящего исследования являлся сравнительный анализ динамики иммунологических

и биохимических маркеров воспаления у больных с ОКС и стабильной стенокардией (СС) в течение первых 3 нед их пребывания в стационаре.

#### Материалы и методы

Проводили открытое проспективное исследование, в которое включили мужчин 35–60 лет, давших информированное согласие. В 1-ю группу вошли 89 больных с ОКС, во 2-ю – 111 больных со СС I–III функционального классов по Канадской классификации. Больных с ОКС госпитализировали в блок интенсивной терапии, в котором им в 1-й день проводили клиническое обследование (сбор анамнеза, физическое исследование, оценка факторов риска, запись электрокардиограммы (ЭКГ) в 12 стандартных отведениях, рентгенография органов грудной клетки, эхокардиография, измерение окружности талии). Больным проводили общий анализ крови и мочи, полный биохимический анализ крови, определяли активность креатинфосфокиназы (КФК), МВ КФК, трансаминаз (аспартатамино-трансферазы и аланинаминотрансферазы), уровни тропонина. Больным со СС проводили те же исследования, что и больным с ОКС, кроме определения МВ КФК и тропонина.

\* Данные о результатах длительного наблюдения за динамикой маркеров воспаления у больных, перенесших ОКС в сравнении с больными СС будут представлены в следующем сообщении.

Таблица 1. Клинико-демографическая характеристика больных

Показатели и принимаемые препараты	Группа с ОКС (n=89)		Группа со СС (n=111)		p	Критерий
	Среднее ± SD	SD	Среднее ± SD	SD		
Возраст, г	54,307,85		55,078,34		0,560	t-тест
ИМТ, кг/м <sup>2</sup>	28,054,36		27,693,48		0,570	t-тест
Курение, %	57,38		33,68		0,005*	Критерий Фишера
ИМ в анамнезе, %	27,87		58,95		<0,001*	""
АГ в анамнезе, %	63,33		58,51		0,614	""
Сахарный диабет, %	3,28		9,47		0,203	""
Кальциевый индекс медиана	145		300		0,149	U-критерий Манна-Уитни
квартили	24-512		44-721			
ТИМ правой СА, мм	0,840,18		0,860,23		0,503	t-тест
ТИМ левой СА, мм	0,950,27		0,920,29		0,454	t-тест
АКШ, %	3,28		16,84		0,010*	Критерий Фишера
Баллонная ангиопластика, %	6,56		26,88		<0,001*	""
БАБ, %	88,52		87,23		1,000	""
Ингибиторы АПФ, %	54,10		63,16		0,316	""
Статины, %	14,75		56,84		<0,001*	""

Примечание. СА – сонная артерия. \* Уровни значимости меньше 0,05.

Таблица 2. Динамика уровней липидов

Показатель	Группа с ОКС (n=61)						Группа со СС (n=95)						Результаты анализа повторных измерений, p					
	1-е		3-и		21-е		1-е		3-и		21-е		О С		О О		С С	
	сутки	сутки	сутки	сутки	сутки	сутки	сутки	сутки	сутки	сутки	сутки	сутки	сутки	сутки	сутки	сутки	сутки	
ОХС, ммоль/л	5,91±1,21	5,78±1,06	5,26±1,12	5,70±1,29	5,61±1,23	5,32±1,21	0,757	0,835	0,856	0,415	0,021*	0,434	0,002*					
ХС-ЛПНП, ммоль/л (расчет при уровне ТГ 4,5 ммоль/л)	3,87±1,29	3,57±1,01	3,32±0,96	3,50±1,00	3,43±1,01	3,24±0,90	0,327	0,859	0,759	0,006*	0,000*	0,513	0,080					
л	53	53	53	91	91	91												
ХС ЛПВП, ммоль/л	1,100,38	1,130,30	1,110,20	1,260,37	1,260,40	1,220,37	0,448	0,316	0,358	0,718	0,926	0,940	0,587					
ТГ, ммоль/л медиана	1,80	2,14	1,57	1,73	1,80	1,50	0,934	0,977	0,778	0,462	0,033*	0,590	0,367					
квартили	1,29-2,77	1,50-2,79	1,04-2,50	1,25-2,29	1,27-2,30	1,13-2,30												

Примечание. Здесь и в табл. 3-6: О С – сравнение групп больных с ОКС и со СС; О О – сравнение изменений в группе ОКС; С С – сравнение изменений в группе со С С. л – число пациентов, доступных для анализа повторных измерений. \*Уровни значимости меньше 0,05.

Диагноз ОКС ставили на основании клинической картины, изменений ЭКГ и повышения уровня тропонина; диагноз СС – по наличию типичных ангинозных болей и данных инструментальных исследований: ЭКГ, велоэргометрических проб.

В исследование не включали больных с острым трансмуральным инфарктом миокарда (ИМ), ИМ, перенесенным за 3 мес до включения в исследование, с АГ III степени и поражением органов-мишеней, нарушениями ритма сердца высоких градаций, сердечной недостаточностью III-IV функционального класса по NYHA, недавно перенесенными операциями на сердце, выраженным АС периферических или сонных артерий, обструктивной и дилатационной кардиомиопатией, сахарным диабетом 1-го и 2-го типа, злокачественными новообразованиями, острыми заболеваниями печени, почек, эндокринных желез, с хроническими воспалительными заболеваниями бронхолегочной системы, ревматоидным артритом, острыми воспалительными процессами других органов и систем.

Больным, в соответствии с протоколом, проводили биохимические, иммунологические и гематологические анализы. Из липидных параметров определяли уровни общего холестерина (ОХС), триглицеридов (ТГ), ХС липопротеинов низкой плотности (ХС ЛПНП), ХС липопротеинов высокой плотности (ЛПВП); из иммунологических и других параметров определяли ИЛ-1α, -2, -6, -10,

αФНО, вчСРБ, sVCAM-1, неоптерин, мозговой натрийуретический пептид (МНП), С-пептид, инсулин; из коагулологических параметров определяли фибриноген, D-димер и ингибитор активатора плазминогена I (ИАП I).

Перечисленные параметры определяли у всех больных в 1-й день, через 72 ч и на 21-й день пребывания в стационаре.

Кальциевый индекс коронарных артерий определяли методом электронно-лучевой томографии (ЭЛТ), толщину комплекса интима-медия (ТИМ) сонных артерий измеряли методом высокоразрешающего ультразвука.

Всем больным проводили стандартную терапию в соответствии с рекомендациями ВНОК по лечению ОКС и СС.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакетов статистических программ "Statistica 6.0" и "SPSS 13.0". Гипотезу о нормальности распределения исследуемых показателей проверяли с использованием критерия Шапиро-Уилка. Для каждой из непрерывных величин, в зависимости от их типа распределения, определяли либо среднее (M) и стандартное отклонение (σ), либо медиану и квартили распределения. При сравнении групп больных с ОКС и со СС по основным показателям (в зависимости от типа распределений анализируемых показателей) использовали непарный t-критерий Стьюдента или U-критерий Манна-Уитни. При проведении парных сравнений уровней по-

Таблица 3. Динамика уровней цитокинов

Показатель	Группа с ОКС			Группа со СС			Результаты анализа повторных измерений						
	1-е сутки	3-и сутки	21-е сутки	1-е сутки	3-и сутки	21-е сутки	О С		О С		О С		
							1-е сутки	3-и сутки	21-е сутки	1-3-и сутки	1-21-е сутки	1-3-и сутки	1-21-е сутки
ИЛ-1а, пг/мл	9,47	8,82	2,14	1,36	1,17	1,17	0,008*	0,003*	0,001*	0,421	0,309	0,687	0,261
медиана	1,06–13,70	1,60–12,00	1,27–11,24	1,06–3,01	0,84–3,63	0,95–1,17							
квартили <i>n</i>	17	17	17	42	42	42							
ИЛ-1б, пг/мл	2,32	1,96	2,30	2,14	1,95	1,94	0,537	0,260	0,250	0,034*	0,117	0,896	0,213
медиана	1,96–4,60	1,70–4,83	1,81–5,10	1,27–4,85	1,27–5,60	1,24–4,60							
квартили <i>n</i>	53	53	53	74	74	74							
ИЛ-2, пг/мл	13,67	13,14	13,69	10,26	11,01	10,75	0,476	0,262	0,199	0,403	0,417	0,723	0,479
медиана	8,10–19,07	8,69–18,57	9,42–19,81	5,06–22,86	4,95–22,10	4,90–22,86							
квартили <i>n</i>	35	35	35	89	89	89							
ИЛ-6, пг/мл	6,97	7,57	6,96	8,20	7,84	8,29	0,677	0,538	0,247	0,375	0,699	0,575	0,294
медиана	1,95–10,92	3,28–14,28	2,60–12,00	2,77–11,12	2,92–11,90	2,87–12,59							
квартили <i>n</i>	73	73	73	81	81	81							
ИЛ-10, пг/мл	4,61	4,82	4,62	3,98	4,08	3,80	0,229	0,023*	0,027*	0,003*	0,044*	0,609	0,869
медиана	3,59–5,36	3,62–5,52	3,90–5,62	1,73–5,47	2,04–5,35	2,34–5,51							
квартили <i>n</i>	79	79	79	84	84	84							
а-ФНО, пг/мл	12,47	12,81	12,18	14,06	13,30	12,20	0,996	0,771	0,386	0,349	0,542	0,308	0,087
медиана	9,89–25,40	9,60–26,03	9,87–22,97	9,74–20,40	9,71–21,86	8,10–20,20							
квартили <i>n</i>	72	72	72	87	87	87							

Таблица 4. Динамика уровней ряда гуморальных медиаторов воспаления

Показатель	Группа с ОКС			Группа со СС			Результаты анализа повторных измерений						
	1-е сутки	3-и сутки	21-е сутки	1-е сутки	3-и сутки	21-е сутки	О С		О О		С С		
							1-е сутки	3-и сутки	21-е сутки	1-3-и сутки	1-21-е сутки	1-3-и сутки	1-21-е сутки
вЧСРБ, мг/л	2,80	3,17	1,90	1,33	1,56	1,55	0,015*	0,002*	0,426	0,364	0,536	0,904	0,081
медиана	0,83–6,73	1,22–5,94	0,83–4,50	0,68–4,18	0,71–3,22	0,66–5,42							
квартили <i>n</i>	79	79	79	98	98	98							
sVCAM-I, нг/мл	996,00	1047,00	1109,30	811,50	952,00	898,00	0,010*	0,075	0,000*	0,232	0,002*	0,002*	0,185
медиана	735,5–1185,7834	5–1220,2	880,0–1344,0	616,0–1062,0	667,34–1151,5735	1–1168,8							
квартили <i>n</i>	73	73	73	93	93	93							
Неоптерин, нмоль/л	7,42	7,78	8,83	6,29	6,27	5,80	0,316	0,008*	0,015*	0,076	0,039*	0,364	0,309
медиана	5,45–9,24	6,28–10,49	6,22–11,08	4,75–8,31	4,39–7,77	4,95–8,60							
квартили <i>n</i>	38	38	38	29	29	29							

казателей внутри групп в первые сутки и последующие (3-и и 21-е) сутки применяли парный критерий Вилкоксона. Для анализа таблиц сопряженности 2x2 применяли двусторонний точный критерий Фишера. Для проверки гипотезы об идентичности распределений показателей в динамике использовали критерий Фридмана. Множественные сравнения значений параметров в динамике проводили методом Ньюмена–Кейлса. Для изучения взаимосвязи переменных применяли методы регрессионного и корреляционного анализа. Если не удалось установить нормальность распределения хотя бы одного из сравниваемых показателей, то приводили коэффициент корреляции Спирмена.

## Результаты

В табл. 1 представлена клиническая характеристика пациентов исследуемых групп на момент их включения в исследование. Обе группы были сопоставимы по возрасту, ИМТ, наличию больных с сопутствующими АГ и сахарным диабетом, ТИМ общих сонных артерий. Кальциевый индекс коронарных артерий был недостоверно выше у больных со СС. Значимая разница между группами наблюдалась по частоте курения, ИМ в анамнезе, аортокоронарного шунтирования (АКШ) и баллонной ангиопластики. Курили чаще больные с ОКС. Больные со СС в 2 раза чаще, чем больные с ОКС в анамнезе имели ИМ, в этой же группе статистически значимо чаще ранее были проведены АКШ и баллонная ангиопластика. Больные обеих групп с одинаковой частотой принимали бета-адреноблокаторы (БАБ) и инги-

биторы ангиотензинпревращающего фермента (АПФ), но частота применения статинов была существенно выше во 2-й группе.

В табл. 2 представлена динамика показателей липидного спектра. Большинству больных с ОКС статины назначили в стационаре. При поступлении в стационар только 13 (15%) из них получали статины, а к 21-му дню наблюдения – уже 67 (75%). Больные со СС статины получали в 63 (57%) и 71 (64%) случаях соответственно. Вероятно, это обстоятельство объясняет достоверное снижение уровней ОХС в обеих группах в ходе 3-недельной терапии. Однако уровень ХС ЛПНП достоверно снизился лишь у больных с ОКС, причем уже к 3-м сут наблюдения. У больных со СС снижение уровня ХС ЛПНП не было статистически достоверным. Уровень ХС ЛПВП за период наблюдения в обеих группах не изменился. У больных с ОКС к 21-му дню наблюдения достоверно снижались уровень ТГ в крови и индекс атерогенности, у больных со СС существенной динамики этих показателей не наблюдалось.

В табл. 3 представлена динамика уровней цитокинов в периферической крови. При сравнении двух групп по медиане достоверная разница была выявлена по провоспалительному ИЛ-1а и противовоспалительному ИЛ-10. Концентрация ИЛ-1а была достоверно выше во всех трех точках измерения у больных с ОКС, в этой же группе к 21-му дню наблюдалась отчетливая тенденция к снижению уровня ИЛ-1а. У больных со СС существенной динамики уровня ИЛ-1а в течении не зарегистрировано. Уровень ИЛ-1β в сравниваемых группах достоверно не различался, однако

у больных с ОКС отмечено его значимое снижение на 3-й день, с последующим повышением к 21-му дню наблюдения. Уровни ИЛ-2 и ИЛ-6 при большом разбросе значений не претерпевали существенных изменений, и различий между группами не было. Уровни ИЛ-10 также не имели существенной динамики внутри каждой группы, но при ОКС медиана во всех точках наблюдения была выше, при СС. Уровень  $\alpha$ -ФНО умеренно повышался у больных с ОКС, однако это увеличение не было статистически значимым.

В табл. 4 представлены результаты динамики гуморальных медиаторов воспаления. Уровень вЧСРБ был достоверно выше в 1-е и на 3-и сутки у больных с ОКС, а к 21-му дню наблюдалось его снижение. Достоверной динамики уровня вЧСРБ у больных со СС не было. Группа больных с ОКС оказалась неоднородной по уровню СРБ, о чем свидетельствует большой интерквартильный размах (0,83–6,73 мг/л) в 1-е сутки наблюдения. На наш взгляд, было целесообразно разделить эту группу в зависимости от исходного уровня СРБ на две подгруппы: с уровнем СРБ < 3 мг/л – I подгруппа и с уровнем СРБ  $\geq$  3 мг/л – II подгруппа, в которые вошли 37 (46,8%) и 42 (53,2%) больных соответственно. У 65 (66,3%) больных со СС уровень СРБ был  $\leq$  3 мг/л, а у 33 (33,6%) > 3 мг/л.

У больных с ОКС из II подгруппы уровень ИЛ-6 был достоверно повышен в 1-й день по сравнению с таковым в I подгруппе (медианы 4,53 и 8,9 пг/мл;  $p < 0,0002$ ). К 3-м суткам наблюдения различие оказалось незначимым (6,85 и 8,02 пг/мл), но на 21-й день оно вновь возникло за счет повышения уровня ИЛ-6 у пациентов II подгруппы (8,29 и 5,17 пг/мл;  $p < 0,026$ ) (рис. 1).

При анализе динамики уровня ИЛ-10 в I подгруппе больных с ОКС отмечено его увеличение по сравнению с аналогичным показателем во II подгруппе (4,79 и 4,35 пг/мл соответственно). Данное соотношение сохранялось и на 21-й день

наблюдения (рис. 2). Для характеристики баланса противо- и провоспалительного маркеров воспаления применяли коэффициент, представляющий собой отношение уровня ИЛ-10 к уровню вЧСРБ. Динамика коэффициента ИЛ-10/ вЧСРБ была различной: в I подгруппе он снижался от 1-й к 3-й точке наблюдения, во II подгруппе – повышался. Различия между подгруппами во всех точках наблюдения были достоверными (рис. 3).

У больных с ОКС уровень sVCAM был достоверно выше, чем у больных со СС в 1-й ( $p < 0,011$ ), на 3-й и 21-й дни наблюдения ( $p < 0,016$ ), а уровень неоптерина был достоверно выше на 3-й и на 21-й дни наблюдения (табл. 4).

У больных с ОКС в течение всего периода наблюдения сохранялась тенденция к повышению уровня МНП, однако к 21-му дню значение данного показателя снизилось ( $p < 0,055$ ). В группе больных со СС достоверной динамики этого показателя не было. Уровень инсулина был отчетливо выше у больных с ОКС, чем у больных со СС, в 1-й и на 3-й дни наблюдения, к 21-му дню разница между показателями в группах не выявлялась. Уровень С-пептида в течение всего наблюдения был достоверно выше у пациентов с ОКС, чем у пациентов со СС (табл. 5).

Достоверной динамики уровней фибриногена, D-димера и ИАП I во время исследования в обеих группах больных не отмечено.

## Обсуждение

В последние 20 лет получены доказательства важной роли воспаления в возникновении и развитии АС и его клинических проявлений [1, 2]. Становится очевидным, что воспалительные и иммунные механизмы лежат в основе не только появления и дальнейшего развития АС, но и способствуют разрыву атеросклеротической бляшки (АСБ) [3, 4]. Активация клеточных механизмов воспаления при ОКС происходит с участием раз-

Таблица 5. Динамика уровней гуморальных факторов

Показатель	Группа с ОКС			Группа со СС			Результаты анализа повторных измерений						
	1-е сутки	3-и сутки	21-е сутки	1-е сутки	3-и сутки	21-е сутки	О С		О О		С С		
							1-е сутки	3-и сутки	21-е сутки	1-3-и сутки	1-21-е сутки	1-3-и сутки	1-21-е сутки
МНП, пг/мл	219,90	214,60	150,65	120,15	149,76	137,47	0,122	0,150	0,680	0,457	0,054	0,639	0,602
медиана	92,38–449,30	80,83–548,40	72,81–458,10	71,40–437,50	72,76–351,10	80,63–302,20							
квартили л	78	78	78	54	54	54							
Инсулин, мкМЕ/мл	17,20	17,10	10,90	7,88	7,82	9,11	0,000*	0,004*	0,114	0,289	0,958	0,253	0,153
медиана	10,52–23,20	9,84–29,07	7,80–35,50	5,75–10,75	5,85–11,35	6,17–11,50							
квартили л	21	21	21	24	24	24							
С-пептид, нг/мл	2,11	2,26	2,22	1,08	1,31	0,98	0,011*	0,011*	0,031*	0,566	0,821	0,909	0,304
медиана	0,95–3,76	1,14–4,45	0,92–3,33	0,70–1,75	0,80–2,22	0,76–1,99							
квартили л	21	21	21	24	24	24							

Таблица 6. Динамика уровней коагулологических параметров

Показатель	Группа с ОКС			Группа со СС			Результаты анализа повторных измерений						
	1-е сутки	3-и сутки	21-е сутки	1-е сутки	3-и сутки	21-е сутки	О С		О О		С С		
							1-е сутки	3-и сутки	21-е сутки	1-3-и сутки	1-21-е сутки	1-3-и сутки	1-21-е сутки
Фибриноген, г/л	3,51	3,88	4,07	3,67	3,81	3,83	0,910	0,677	0,504	0,255	0,134	0,096	0,062
медиана	3,07–4,47	3,41–4,33	3,39–4,72	3,10–4,20	3,28–4,39	3,28–4,60							
квартили л	16	16	16	57	57	57							
D-димер, мкг/мл	545,50	478,50	964,50	639,00	678,00	644,00	0,212	0,261	0,186	0,215	0,010*	0,718	0,469
медиана	282,50–759,50	299,00–975,50	429,50–1330,00	373,50–1052,00	406,50–1142,50	405,00–1027,50							
квартили л	16	16	16	56	56	56							
ИАП-I, МЕ/мл	18,50	12,95	21,70	19,25	18,80	20,10	0,556	0,110	0,873	0,535	0,569	0,990	0,491
медиана	11,95–26,60	8,60–25,20	11,25–33,05	13,60–28,40	13,50–32,90	14,50–30,10							
квартили л	16	16	16	54	54	54							

ных факторов воспаления. Маркеры воспаления (цитокины, молекулы клеточной адгезии, белки острой фазы) определяются в периферической крови, что отражает воспалительный статус больных с ОКС.

Гиперхолестеринемия, повышенная концентрация ХС ЛПНП в крови играют важную роль в возникновении и поддержании воспалительного процесса. Модифицированные ЛПНП рассматриваются как важнейший элемент начала воспалительных изменений в сосудистой стенке. В настоящем исследовании больных у обеих групп отчетливо повышались уровни ОХС и ХС ЛПНП, даже несмотря на то что у больных со СС 63 (56,84%) пациента принимали статины. При поступлении в клинику лишь 13 (14,75%) больных с ОКС получали статины, однако через 20 дней наблюдения их число увеличилось до 67 (75%). Известно, что статины, наряду с выраженным гиполипидемическим эффектом, обладают и противовоспалительным действием. У больных с ОКС они снижают уровень СРБ [5]. У больных, включенных в исследование, статины (10–20 мг/сут симва-статина или аторвастатина) обусловили статистически достоверное снижение уровня ОХС в обеих группах, что, возможно, смягчило повышение уровней других маркеров воспаления. Уровень ХС ЛПВП в обеих группах не изменялся. В то же время у больных с ОКС к 21-му дню достоверно снизились концентрация ТГ в крови и индекс атерогенности; у больных со СС существенной динамики этих показателей не наблюдалось.

Известно, что связываясь с модифицированными ЛПНП, СРБ накапливается в местах атеросклеротического поражения артерий и может активировать систему комплемента, увеличивать активность Т- и В-лимфоцитов, стимулировать макрофаги и выработку тканевого фактора моноцитами, увеличивать образование свободных радикалов макрофагами и пенистыми клетками, а также вызывать экспрессию моноцитарного хемоаттрактантного белка клетками эндотелия [6, 7]. Степень повышения уровня СРБ, а следовательно, и интенсивность воспалительного процесса сочетаются с повышенным риском коронарных осложнений [8–11]. В нашем исследовании уровень СРБ у больных с ОКС был достоверно выше, чем у больных со СС. Причем повышение уровня СРБ сохранялось к концу 3-й нед наблюдения (хотя различия между группами не были достоверными). G.Liuzzo и соавт. показали, что повышение концентрации СРБ в сыворотке крови сохраняется у 50% больных с ОКС в течение 3 мес после эпизода нестабильной стенокардии и является предвестником повторной дестабилизации АСБ и рецидива ОКС [12].

Нами обнаружена связь между уровнем СРБ у больных с ОКС и уровнями ИЛ-6 и ИЛ-10, что коррелирует с данными Т.В.Наррис и соавт. [13]. Это позволяет рассматривать уровень СРБ у больных с ОКС в качестве референсного маркера. Для оценки баланса между про- и противовоспалительными маркерами мы предлагаем оценивать коэффициент воспаления, который представляет отношение уровней ИЛ-10 и  $\text{vcСРБ}$ .

ИЛ-1 – провоспалительный цитокин, способствующий дестабилизации атеромы за счет повышения прокоагулянтной активности эндотелия

Рис. 1. Динамика уровня ИЛ-6 на фоне повышенного и нормального уровня СРБ в группе больных с ОКС.

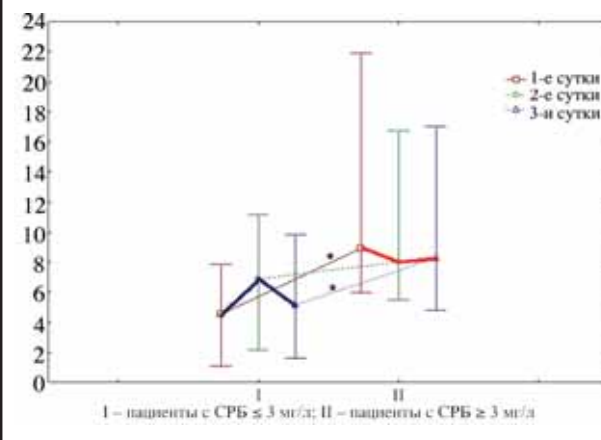


Рис. 2. Динамика уровня ИЛ-10 на фоне повышенного и нормального уровня СРБ в группе больных с ОКС.

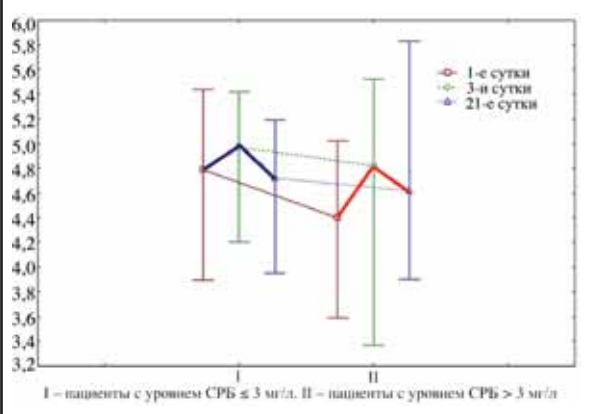
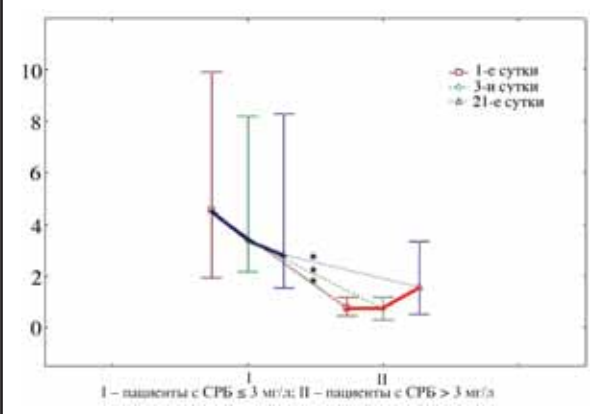


Рис. 3. Динамика отношения уровня ИЛ-10 к уровню СРБ в группе больных с ОКС.



[14]. В нашей работе уровень ИЛ-1 был значительно выше у больных с ОКС, чем у больных со СС, при этом отмечалась явная тенденция к снижению уровня ИЛ-1α к 21-му дню наблюдения.

Многофункциональный цитокин ИЛ-6, наряду с ИЛ-1,  $\alpha$ -ФНО, также является системным медиатором иммунного ответа и воспаления [15]. Результаты исследования, проведенного с участием на 15 тыс. здоровых добровольцев в рамках программы “Physicians Health Study”, свидетельствуют о том, что при исходно повышенном уровне ИЛ-6 риск развития ИМ выше, чем при нормальном [16]. Повышенное содержание ИЛ-6 отмечено у пациентов с ИМ, нестабильной стенокардией и СС, что считается предиктором неблагоприят-

ятного прогноза у больных с ОКС [17]. Уровень ИЛ-6 в нашем исследовании был выше у больных с ОКС, что совпадает с данными других авторов [18], однако эти различия не были достоверны. Отмечалась тенденция к постепенному снижению уровня ИЛ-6 к 21-му дню наблюдения у больных с ОКС. Однако необходимо отметить, что в подгруппе больных с ОКС с уровнем СРБ > 3 мг/л уровень ИЛ-6 был повышенным в 1-й день заболевания, несколько снижался к 3-му дню, а к концу наблюдения вновь повышался. Это отражает, по-видимому, то обстоятельство, что у части больных воспаление персистирует, несмотря на улучшение клинической картины и нормализацию биохимических показателей.

ИЛ-10 – единственный из цитокинов, обладающий противовоспалительными свойствами, секретируется активированными моноцитами/макрофагами и лимфоцитами. Противовоспалительные механизмы этого белка обусловлены подавлением транскрипции провоспалительного ядерного фактора  $\kappa\text{B}$ , что приводит к угнетению синтеза цитокинов, уменьшению дегенерации матриксных металлопротеиназ, снижению экспрессии тканевого фактора [19]. Дефицит ИЛ-10 может способствовать дестабилизации АСБ. В исследовании “CAPTURE” (547 больных) у пациентов с повышенным уровнем ИЛ-10 отмечался сниженный риск смерти или повторного ИМ. У больных с высокими уровнями как СРБ, так и ИЛ-10, риск неблагоприятных событий оказался ниже, чем у больных без повышения уровня ИЛ-10 [9]. В нашем исследовании уровень ИЛ-10 у больных с ОКС на 3-и и 21-е сутки был выше, чем у больных со СС. При анализе динамики уровня ИЛ-10 в зависимости от исходного значения СРБ в подгруппах с уровнем СРБ < 3 мг/л наблюдалась тенденция к повышению уровня ИЛ-10. Данное соотношение сохранялось в течение всего периода наблюдения.

Повышение уровня цитокина  $\alpha$ -ФНО у больных ИБС отмечали еще более 10 лет назад [20]. Позднее было показано, что повышенная экспрессия  $\alpha$ -ФНО у больных, перенесших ИМ, является предиктором высокого риска коронарных осложнений [21]. В нашем исследовании уровень  $\alpha$ -ФНО был незначительно выше у больных с ОКС, что, возможно, обусловлено малым периодом наблюдения и сравнительно небольшим числом обследованных.

Молекулы клеточной адгезии являются ключевым звеном в регуляции межклеточных взаимодействий. Молекула адгезии сосудистых клеток (sVCAM) экспрессируется на поверхности активированного эндотелия у больных с ОКС без подъема ST на ЭКГ в острый период (первые 72 ч в стационаре), их повышенный уровень сохраняется в течение 3–6 мес, а затем к концу 12-го мес наблюдения снижается [22]. В нашем исследовании уровень sVCAM был повышенным у больных с ОКС в течение всего периода наблюдения, что, возможно, отражает наличие воспалительного процесса и через 3 нед.

МНП был выделен и идентифицирован в 1988 г. [23]. Продукция и выброс его в кровоток стимулируется повышением напряжения стенки левого желудочка и при перегрузке объемом [24]. В исследовании “OPUS-TIMI 16” сравнивали уровни МНП у 2525 пациентов с ОКС с подъемом и

без подъема сегмента ST на ЭКГ. Больные с высоким уровнем МНП чаще имели признаки сердечной недостаточности, ишемические изменения на ЭКГ, высокий уровень МВ-КФК и снижение функции почек. Высокие уровни МНП были предикторами повышенного риска смерти в обеих группах больных [25]. В нашем исследовании у больных с ОКС уровень МНП значительно превышал таковой у больных со СС. К 21-му дню наблюдения уровень МНП достоверно снижался.

Роль инсулина в развитии воспаления в сосудистой стенке, согласно имеющимся данным, противоречива. С одной стороны, гиперинсулинемия или инсулинорезистентность провоцируют воспалительный процесс в артериальной стенке за счет повышения уровня свободных радикалов, циркулирующих цитокинов, других проатерогенных факторов. Однако известно, что инсулин может оказывать антиатеросклеротический и противовоспалительный эффект за счет повышения активности NO-синтазы и подавления экспрессии молекул межклеточной адгезии (ICAM-1) [26]. В исследовании “DIGAMI” у 620 больных с острым ИМ и сахарным диабетом инсулин и глюкоза, которые вводили несколько раз в день в течение 3 мес (уровень глюкозы в крови поддерживался и составлял 7–11 ммоль/л), способствовали снижению смертности на 29% в течение 3-летнего периода наблюдения. Возможно, что экзогенный и эндогенный инсулины оказывают разное влияние на сосудистую стенку. В нашем исследовании уровни эндогенного инсулина и С-пептида были повышены. Причем повышенный уровень С-пептида сохранялся в течение всего наблюдения, что, возможно, свидетельствовало о продолжающемся воспалительном процессе у больных с ОКС.

В нашем исследовании содержание в крови фибриногена, D-димера и ИАП I не отличалось достоверной динамикой, хотя уровень фибриногена считается важным маркером острой фазы воспаления у больных ишемической болезнью сердца [27]. Возможно, что этот результат обусловлен недостаточным для статистической значимости числом наблюдений.

Таким образом, результаты проведенного нами исследования динамики воспалительного процесса у больных с ОКС и СС свидетельствуют о важной роли основных биохимических и иммунологических маркеров для оценки интенсивности воспаления в сосудистой стенке.

#### Литература

1. Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340: 115–26.
2. Kuller LH, Tracy RP. The role of inflammation in cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 901.
3. Shah PK. Pathophysiology of coronary thrombosis: role of plaque rupture and plaque erosion. *Progress in Cardiovascular Diseases* 2002; 44: 5.
4. Davies MJ. The pathophysiology of acute coronary syndromes. *Heart* 2000; 83: 361–6.
5. Cannon CP, Braunwald E, McCabe CH et al. Pravastatin or Atorvastatin Evaluation and Infection Therapy (PROVE-IT) – Thrombolysis in Myocardial Infarction 22 Investigators. Intensive versus moderate lipid lowering with statins after acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 2004; 350: 1495–504.
6. Bhakdi S, Torzewski M, Klouche M, Hemmes M. Complement and atherogenesis: binding of CRP to degraded, non oxidized LDL enhances complement activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 2348–54.

7. Pasceri V, Chang J, Willerson JT et al. Modulation of CRP mediated monocyte chemoattractant protein-1 induction in human endothelial cells by anti-atherosclerosis drugs. *Circulation* 2001; 103: 2531–4.
8. Biasucci LM, Liuzzo G, Grillo RL et al. Elevated levels of C-reactive protein at discharge in patients with unstable angina predict recurrent instability. *Circulation* 1999; 99: 855–60.
9. Heeschen C, Hamm CW, Bruemmer J et al. Predictive value of CRP and troponin T in patients with unstable angina: a comparative analysis. CAPTURE Investigators. *JACC* 2000; 35: 1535–42.
10. Morrow DA, Rifai N, Antman EM et al. C-reactive protein is a potent predictor of mortality independently of a combination with troponin T in acute coronary syndromes: a TIMI 11A sub-study. *JACC* 1998; 31: 1460–5.
11. Berk BC, Weintraub WS, Alexander RW. Elevation of C-reactive protein in "active" coronary artery disease. *Am J Cardiol* 1990; 65: 168–72.
12. Liuzzo G, Biasucci LM, Gallimore J et al. The prognostic value of C-reactive protein and serum amyloid A protein in severe unstable angina. *N Engl J Med* 1994; 331: 417–24.
13. Harris TB, Ferrucci L, Tracy RP et al. Associations of elevated interleukin-6 and C-reactive protein levels with mortality in the elderly. *Am J Med* 1999; 106: 506–12.
14. Libby P, Ordovas JM, Auger KR et al. Endotoxin and tumor necrosis factor induce interleukin-1 gene expression in adult human vascular endothelial cells. *Am J Pathol* 1986; 124: 179–86.
15. Castell JV, Gomes-Lechon MJ, David M et al. Interleukin-6 is the major regulator of acute phase protein synthesis in adult human hepatocytes. *FEBS Lett* 1989; 24: 237–9.
16. Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ et al. Inflammation, aspirin and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *N Engl J Med* 1997; 336: 973–9.
17. Biasucci LM, Liuzzo G, Fantuzzi G et al. Increasing levels of IL-1Ra and IL-6 during the first 2 days of hospitalization in unstable angina are associated with increased risk of in-hospital coronary events. *Circulation* 1999; 88: 2079–84.
18. Harris TB, Ferrucci L, Tracy RP et al. Associations of elevated interleukin-6 and C-reactive protein levels with mortality in the elderly. *Am J Med* 1999; 106: 506–12.
19. Szodoray P, Timar O, Veres K et al. TH 1/TH2 imbalance, measured by circulating and intracytoplasmic inflammatory cytokines-immunological alterations in acute coronary syndrome and stable coronary artery disease. *Scand J Immunol* 2006; 64 (3): 336–44.
20. Vaddi K, Nicolini FA, Mehta P et al. Increased secretion of tumor necrosis factor- $\alpha$  and interferon- $\gamma$  by mononuclear leukocytes in patients with ischemic heart disease. *Circulation* 1994; 90: 694–9.
21. Basaran Y, Basaran MM, Babacan KF et al. Serum tumor necrosis factor levels in acute myocardial infarction and unstable angina pectoris. *Angiology* 1993; 44: 332–7.
22. Menoun I, Mathew T, Gracey H et al. Prediction of recurrent events by D-dimer and inflammatory markers in patients with normal cardiac Troponin I (PREDICT) study. *Am Heart J* 2003; 145 (6): 941–2.
23. Sudoh T, Kangawa K et al. A new natriuretic peptide in porcine brain. *Nature* 1988; 332: 78–81.
24. McDowell G, Shaw C et al. The natriuretic peptide family. *Eur J Clin Invest* 1995; 25: 291–8.
25. Morita E, Yasue H et al. Increased plasma levels of brain natriuretic peptide concentrations in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 1993; 88: 82–91.
26. Dandona P et al. Insulin may have anti-inflammatory and anti-Atherosclerotic Effect (?). *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 2572–5.
27. Pearson T et al. Markers of Inflammation and Cardiovascular Disease. *Circulation* 2003; 107: 499–511.

В.А.Дмитриев, Е.В.Ощепкова, В.Н.Титов, А.Н.Рогоза, Т.В.Балахонova,  
О.А.Погорелова, В.П.Масенко, Д.М.Атауллаханова

## С-реактивный белок и интерлейкин-6 при поражении органов-мишеней на ранних стадиях у больных гипертонической болезнью

Институт клинической кардиологии им А.Л.Мясникова, Москва

**Ключевые слова:** гипертоническая болезнь, С-реактивный белок, интерлейкин-6, неспецифичное воспаление

**V.A. Dmitriev, E.V. Oshchepkova, V.N. Titov, A.N. Rogoza, T.V. Balakhonova, O.A. Pogorelova,  
V.P. Masenko, D.M. Ataulakhanova**  
AL. Myasnikov Institute of Clinical Cardiology, Moscow

**C-REACTIVE PROTEIN AND INTERLEUKIN-6 IN TARGET ORGAN DAMAGE IN EARLY-STAGE  
HYPERTENSIVE DISEASE**

**Key words:** hypertensive disease, C-reactive protein, interleukin-6, nonspecific inflammation.

В ряде крупных проспективных эпидемиологических исследований выявлена прогностическая значимость С-реактивного белка (СРБ) – показателя неспецифичного воспаления (НВ) – в отношении развития артериальной гипертонии (АГ) у лиц с нормальным артериальным давлением (АД) [1–3].

На основании результатов этих работ, а также других исследований, свидетельствующих о неблагоприятной прогностической роли повышенного уровня СРБ в отношении риска развития острого инфаркта миокарда, инсульта, СРБ был включен в критерии, по которым проводится стратификация

риска развития сердечно-сосудистых осложнений (ССО) при АГ [4]. Клинических работ по изучению роли СРБ в течении АГ и поражении органов-мишеней значительно меньше, и их результаты противоречивы. В ряде из них, в том числе в наших исследованиях, получены данные, подтверждающие существование неспецифичного воспаления (subclinical inflammation) при АГ [5–7]. В настоящее время нет единого мнения о роли НВ при АГ. Некоторые авторы предлагают рассматривать НВ как патогенетически единую многокомпонентную биологическую реакцию, которая формируется *in vivo* в ответ на нарушение "чистоты внутренней среды" многоклеточного организма и появления в ней эндогенных патогенов [8].

Дискутируется вопрос о том, является ли НВ одной из причин развития сосудистой патологии при АГ или следствием патологических процессов, происходящих в сосудистой стенке и органах-мишенях. В связи с такой постановкой вопроса научный интерес представляет изучение НВ в сопоставлении с поражением органов-мишеней – аспект, который в литературе практически не обсуждался.

Целью данного исследования было изучение взаимосвязи и наличия маркеров НВ (СРБ, интерлейкин-6 – ИЛ-6) с поражением органов-мишеней у больных АГ.

### Материалы и методы

Обследован 81 больной гипертонической болезнью (ГБ) (60 мужчин и 21 женщина) в возрасте от 30 до 65 лет (средний возраст –  $45,1 \pm 1,3$  года): 45 больных с мягкой (I степень;  $159 < \text{систолическое АД} \leq 140$  мм рт. ст.) и 36 с умеренной (II степень;  $179 \leq \text{САД} \leq 160$  мм рт. ст.) формами АГ [9, 10].

Критериями включения в исследование были АГ I–II степени умеренного и высокого риска, мужчины и женщины 30–65 лет, отсутствие предшествующей антигипертензивной терапии в течение 2 нед до начала исследования, острых воспалительных заболеваний и острых респираторных вирусных инфекций в течение 2 мес до начала исследования. Все больные прошли обследование в НИИ кардиологии им. А.Л.Мясникова ФГУ РКНПК Росмедтехнологий с целью верификации диагноза АГ по принятой двухэтапной схеме обследования [9]. В исследование не включали больных с вторичными формами АГ, с заболеваниями желудочно-кишечного тракта, дыхательной и нервной систем, ишемической болезнью сердца (ИБС), нарушениями ритма сердца, инфарктом миокарда и нарушением мозгового кровообращения в анамнезе. При концентрации СРБ  $> 10$  мг/л, согласно рекомендациям Американского общества по изучению СРБ, проводили ее повторное измерение через 2 нед. Если в этом случае обнаруживали повышенную концентрацию СРБ (СРБ  $> 10$  мг/л), уточняли наличие острой или обострение хронической инфекции [11].

Концентрацию СРБ определяли высокочувствительным методом турбидиметрии на биохимическом анализаторе "НІТАСНІ-912" ("Хоффман Ла Рош", Швейцария). Нормальным содержанием СРБ считали величину менее 3 мг/л [11]. ИЛ-6 определяли иммуносорбентным методом ELISA на анализаторе "TECAN", ("BioSource", Бельгия). С помощью метода Гаусса [12] вычисляли нормальную концентрацию ИЛ-6 ( $1,1–8,3$  пг/мл). Содержание СРБ и ИЛ-6 у больных ГБ изучали в зависимости

от признаков раннего ремоделирования миокарда левого желудочка (ЛЖ) и наличия гипертрофии ЛЖ (ГЛЖ). Микроальбуминурию (МАУ) определяли методом турбидиметрии на биохимическом анализаторе "НІТАСНІ-912". Скорость клубочковой фильтрации (СКФ) рассчитывали по формуле Кокрофта–Гаулга:  $(140 - \text{возраст}) \times \text{масса тела} / 0,814 \times \text{креатинин}$  в крови. СКФ  $> 120$  мл/мин расценивали как гиперфильтрацию, уровень  $< 80$  мл/мин как снижение СКФ [13].

Структурные изменения ЛЖ, по данным эхокардиографии (ЭхоКГ), на аппарате SONOS 7500, ("Philips") оценивали по стандартному протоколу у 52 больных АГ. Массу миокарда ЛЖ (ММЛЖ) рассчитывали по формуле R.V.Devereux. Индекс ММЛЖ (ИММЛЖ; в г/м<sup>2</sup>) рассчитывали как отношение ММЛЖ к площади поверхности тела:  $\text{масса тела} \times 0,425 \times \text{рост} \times 0,725 \times 71,84 \times 10\ 000$ ). Нормальные величины ИММЛЖ для мужчин составили  $< 125$  г/м<sup>2</sup>, для женщин  $< 110$  г/м<sup>2</sup>. Индекс относительной толщины МЛЖ (ИОТМЛЖ) рассчитывали по формуле  $\text{ТМЖП} + \text{ТЗСЛЖ} / \text{КДР}$ ; нормальные значения принимали за  $\leq 0,44$  [14–6].

Брахиоцефальные артерии исследовали методом дуплексного сканирования и цветного картирования потоков крови на приборе "ACUSON 128" (линейный датчик L-538 с частотой 5 и 7 МГц) у всех больных АГ. Вазомоторную функцию эндотелия оценивали при УЗИ плечевой артерии с использованием пробы с реактивной гиперемией у 35 больных АГ [17, 18].

Статистическую обработку данных проводили с применением программ "Statistica 6", предусматривающих возможность непараметрического анализа. Для выяснения взаимосвязей между показателями использовали метод линейного корреляционного анализа по Спирмену, для оценки внутригрупповых и межгрупповых различий – непараметрические критерии Манна–Уитни. Достоверными считали различия при  $p < 0,05$ . Учитывая большую вариабельность уровня СРБ, проводили его логарифмирование. Результаты представлены в виде  $M \pm SE$ .

### Результаты

Из 81 больной АГ, вошедших в исследование, у 48 (55%) человек была выявлена I степень повышения АД и у 36 (45%) – II степень. Наличие сопутствующих факторов риска ССО, поражение органов-мишеней позволили классифицировать больных следующим образом: 55% больных с умеренным риском, 45% – с высоким риском развития фатальных ССО. В целом среднее САД составило  $138,7 \pm 1,2$  мм рт. ст., среднее суточное диастолическое АД (ДАД) –  $84,9 \pm 1,2$  мм рт. ст. Показатели суточного ритма АД в целом были в пределах нормы: степень ночного снижения САД составила  $11,6 \pm 1,3\%$ , ДАД –  $14,3 \pm 0,9\%$ . Концентрация СРБ (норма  $< 3$  мг/л) варьировала от 0,1 до  $10^9$  мг/л. Повышенный уровень СРБ выявлен у 55%, повышенный уровень ИЛ-6 – у 30% больных ГБ.

Изменение геометрии миокарда ЛЖ наблюдали у 13 (25%) из 52 больных, у которых повышенное содержание СРБ выявлено в 61% случаев, в то время как у больных с нормальной геометрией ЛЖ – в 54%. В целом по группе установлена положительная корреляционная взаимосвязь между ИОТМ ЛЖ и уровнем СРБ ( $r = 0,28$ ;  $p < 0,05$ ). Концентрация ИЛ-6 в крови больных с ранним ремоделированием миокарда ЛЖ была выше, чем у больных с нормальной геометрией миокарда ЛЖ, но из-за больших инди-



# Жизнь – это путешествие!



 **МОНОПРИЛ®**  
фозиноприл

## ВАШ НАДЕЖНЫЙ СПУТНИК



*Эффективность в лечении артериальной гипертензии и хронической сердечной недостаточности<sup>1,2</sup>*



*Уменьшение риска развития сердечно-сосудистых осложнений<sup>3</sup>*



*Малое число побочных эффектов<sup>4</sup>*



*Удобный прием 1 раз в сутки<sup>5</sup>*

1. Berdah J. et al., Etude de L'Efficacite Et De La Tolerance Du Fosinopril en Medicine Practicienne Chez 19435 Hypertendus (Etude FLIGHT), Ann. Cardiol. Andeiol, 1998;47(3):169-175
2. Erhardt L. et al, Fosinopril attenuates clinical deterioration and improves exercise tolerance in patients with heart failure, Eur Heart J, 1995, 16, 1892-1899.
3. Tatti P et al. Outcome results of the fosinopril versus amlodipine cardiovascular events randomized trial in patients with hypertension and NIDDM. Diabetes Care 1998;21:597-603.

4. David D., Jallad N., Germino FW et al, A Comparison on Cough Profile of Fosinopril and Enalapril in Hypertensive Patients with a History of ACE+Associated Cough, Am J Therap 1995, 2, 806-813.
5. Waugh WJ, Factors to Consider in Selecting an ACE-J, Am J Health Sys Pharm 2000; 57 suppl 1:S26-30.

- Информация предназначена для медицинских специалистов
- Перед назначением препарата ознакомьтесь, пожалуйста, с инструкцией по применению
- За полной информацией обращайтесь в представительство Бристол-Майерс Сквибб в Москве



**Bristol-Myers Squibb**

123001 Москва, Трехпрудный пер., д. 9, стр. 1Б  
Тел.: +7 (495) 755-92-67; факс: +7 (495) 755-92-62

Таблица 1. Концентрация СРБ и ИЛ-6 в зависимости от ИОТМЛЖ

Показатель	Раннее ремоделирование миокарда ЛЖ (n=13)	Нормальная геометрия миокарда левого желудочка (n=39)
СРБ, мг/л	5,3±1,2	5,9±1,3
ИЛ-6, пг/мл	10,7±4,2	4,5±1,7

Таблица 2. Концентрация СРБ и ИЛ-6 в зависимости от наличия гипертрофии миокарда ЛЖ

Показатель	Больные с ГЛЖ (n=20)	Больные без ГЛЖ (n=32)	p
СРБ, мг/л	6,4±1,8	5,4±1,2	н/д
ИЛ-6, пг/мл	10,19±3,08	3,07±1,4	p<0,05

Примечание. н/д – недостоверно.

Таблица 3. Концентрация СРБ и ИЛ-6 в зависимости от наличия атеросклеротического поражения СА

Показатель	Атеросклероз СА (n=35)		Интakтные СА (n=46)
	однососудистое поражение (n=20)	2–3–сосудистое поражение (n=15)	
СРБ, мг/л	10,2±3,9	3,5±1,0	6,9±2,5
ИЛ-6, пг/мл	6,3±1,5	7,6±2,9	6,6±1,8

Таблица 4. Концентрация СРБ и ИЛ-6 в зависимости от состояния вазомоторной функции эндотелия

Показатель	нарушенная (n=11)	пограничная (n=16)	нормальная (n=11)
СРБ, мг/л	18,6±14,9	5,2±0,9	8,0±4,7
ИЛ-6, пг/мл	9,6±1,8	7,8±2,1	3,4±2,3

Таблица 5. Показатели, характеризующие ВФЭ, в зависимости от концентрации СРБ в крови

Показатель	СРБ>3 мг/л (n=26)	СРБ<3 мг/л (n=12)
Исходный диаметр плечевой артерии (D <sub>иск</sub> ), мм	4,7±0,1	5,1±0,2
ЗПВД, %	6,1±0,9	6,90±1,04
Реактивная гиперемия, усл.ед.	1,4±0,1	1,5±0,3
DD <sub>60</sub> [D <sub>60</sub> с–D <sub>иск</sub> ], мм	0,30±0,04	0,34±0,04
DD <sub>90</sub> [D <sub>90</sub> с–D <sub>иск</sub> ], мм	0,32±0,05	0,37±0,04

видуальных колебаний различие не достигло статистической значимости (табл. 1).

ГЛЖ выявлена у 20 (38%) из 52 больных ГБ, из них в 55% (11/20) случаев наблюдалось повышенное содержание СРБ. В группе больных без ГЛЖ повышенная концентрация СРБ в крови наблюдалась у 18 (56%) больных АГ. Следует отметить, что средние концентрации СРБ были повышены как у больных с ГЛЖ, так и без ГЛЖ. Концентрация ИЛ-6 была выше у больных с ГЛЖ (табл. 2).

Проведен анализ уровня СРБ в зависимости от наличия и выраженности атеросклеротического поражения сонных артерий (СА), которое у 35 (44%) из 81 обследованных носило характер гемодинамически незначимых стенозов. Больные ГБ были разделены на 2 подгруппы в зависимости от наличия атеросклеротических бляшек. Повышенное содержание СРБ обнаружено у 50% больных с атеросклерозом СА и у 57% больных без атеросклероза СА. Концентрация ИЛ-6 была выше у больных с атеросклеротическим поражением СА (табл. 3).

Результаты анализа уровней СРБ и ИЛ-6, проведенного с учетом числа пораженных атеросклерозом СА, свидетельствуют о том, что у больных с поражением одной СА содержание СРБ было выше, но не достигло статистически достоверных различий. Уровень СРБ был повышенным у всех больных (табл. 3).

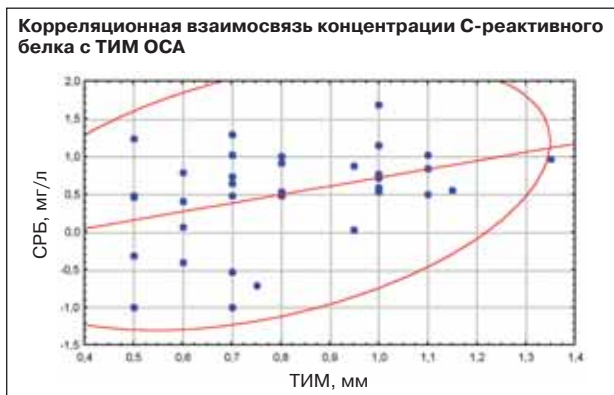
При сопоставлении уровня СРБ, в зависимости от толщины комплекса интима+медиа (ТИМ) общей СА (ОСА), ее увеличение обнаружили у 13 (34%) из 38 больных ГБ. В целом по группе установлена положительная корреляционная взаимо-

связь уровня СРБ с ТИМ ОСА ( $r=0,42$ ;  $p<0,05$ ; см. рисунок). У больных с повышенным уровнем СРБ ТИМ была достоверно больше, чем у больных, у которых уровень СРБ оставался в пределах физиологической нормы ( $0,70\pm0,02$  и  $0,63\pm0,06$  мм соответственно;  $p<0,05$ ).

При проведении анализа концентрации СРБ и ИЛ-6, в зависимости от показателей вазомоторной функции эндотелия (ВФЭ), в целом по группе корреляционной связи СРБ и ИЛ-6 с этими показателями не обнаружили. Все больные ГБ были разделены на 3 подгруппы в зависимости от величины, зависимой от потока вазодилатации: 1) 0–4% (n=11) – нарушенная ВФЭ; 2) 4–8% (n=16) – пограничная ВФЭ; 3) >8% (n=11) – нормальная ВФЭ. При сопоставлении концентрации СРБ и ИЛ-6 в зависимости от величины, зависимой от потока вазодилатации, также достоверных различий не выявлено (табл. 4). Максимальное количество (75%) больных с повышенным уровнем СРБ (у 12 из 16 чел) было в подгруппе с пограничной ВФЭ. С нарушенной ВФЭ уровень СРБ был повышен у 45% (5 из 11) больных и у 54% (6 из 11) больных с нормальной ВФЭ.

Сопоставление концентраций СРБ с диаметром плечевой артерии и кровотоком в ней при исследовании ВФЭ показало, что у больных с повышенной концентрацией СРБ исходный диаметр, ПЗВД, реактивная гиперемия и другие параметры были ниже, чем у больных с нормальной концентрацией СРБ (табл. 5).

МАУ обнаружена у 15 (19%) из 79 больных. В этой группе отмечена тенденция к позитивной связи уровней СРБ с МАУ ( $r=0,51$ ;  $p=0,06$ ). Увеличение



СКФ (гиперфильтрация) наблюдали у 24 (37%) из 65 больных. В группе больных с гиперфильтрацией обнаружили позитивную корреляционную связь уровня СРБ с уровнем ИЛ-6 ( $r=0,88$ ;  $p<0,01$ ) и СКФ ( $r=0,47$ ;  $p<0,01$ ). У больных с нормальной СКФ такой взаимосвязи СРБ и ИЛ-6 не было.

### Обсуждение

Целью данной работы явилось изучение показателей НВ в сопоставлении с развитием органических поражений при ГБ, по-видимому, имеющие единые нейрогуморальные механизмы. Ранее мы показали, что у 55% больных АГ с умеренным и высоким риском в крови обнаруживаются повышенные концентрации СРБ и ИЛ-6, а также тесная связь этих показателей с уровнем АД, что согласуется с данными других авторов и свидетельствует о существовании НВ (low-grade inflammation) при ГБ [3, 5, 19]. Поражение органов-мишеней – закономерный этап течения неконтролируемой АГ, которое приводит к развитию ССО (инфаркт миокарда, инсульт, сердечная и почечная недостаточность). На экспериментальных моделях убедительно показано, что НВ связано с ренин-ангиотензиновой системой (РАС), симпатико-адреналовой системой (САС), эндотелиальной дисфункцией, которые также играют ключевую роль в АГ [20, 21].

Существует несколько механизмов, объясняющих возможную взаимосвязь между НВ и поражением органов-мишеней. Чрезмерная активация РАС, в частности ангиотензина II (АТ II), вызывает неблагоприятные эффекты: вазоконстрикцию, активацию синтеза альдостерона, гипертрофию миокарда, пролиферацию гладкомышечных клеток (ГМК), активацию процессов перекисного окисления липидов и др. АТ II вызывает экспрессию провоспалительных молекул сосудистой стенки, что приводит к накоплению моноцитов в месте ее повреждения. В клетках эндотелия АТ II регулирует экспрессию молекул внутриклеточной адгезии (МВА) и Е-селектина, что способствует развитию дисфункции эндотелия. В ГМК АТ II стимулирует синтез МВА-1, MCP-1 и ИЛ-6 [20], вызывая неспецифичное воспаление в сосудистой стенке. Имеются данные о том, что АТ II непосредственно влияет на синтез другого первичного маркера НВ –  $\alpha$ -фактора некроза опухоли [22].

Ранее ремоделирование миокарда ЛЖ при АГ является фактором неблагоприятного прогноза. В литературе отмечена взаимосвязь маркеров НВ и ремоделирования миокарда ЛЖ, что объяснялось влиянием СРБ на активацию рецепторов АТ II, способствующую развитию дисфункции эндотелия [23]. В нашей работе также выявлена положительная взаимосвязь уровня СРБ с ИОТМ. У больных АГ с ГЛЖ

выявлена достоверно более высокая концентрация ИЛ-6, чем у больных без ГЛЖ.

Ультразвуковое дуплексное сканирование позволяет диагностировать наиболее ранние атеросклеротические поражения (утолщение стенки сосуда, гемодинамически незначимые атеросклеротические бляшки) в сосудах, доступных визуализации (брахиоцефальные, бедренные артерии). По данным ранее проведенных нами исследований, частота выявления атеросклеротических поражений брахиоцефальных артерий (в большинстве случаев гемодинамически незначимых) при мягкой АГ составляет 30%, а при умеренной АГ – 50% [24]. В настоящей работе не получено данных, свидетельствующих о связи между повышенным уровнем СРБ, ИЛ-6 и атеросклерозом СА у больных АГ. Повышенный уровень СРБ встречался как у больных с атеросклерозом СА, так и без него. В Фремингемском исследовании только у женщин установили взаимосвязь между повышенным уровнем СРБ и развитием атеросклероза СА при АГ [25]. Однако высказывается предположение о том, что СРБ является предиктором раннего развития атеросклероза СА [26, 27].

При сопоставлении в нашем исследовании уровней СРБ с ТИМ выявлена достоверная позитивная взаимосвязь между ними, что согласуется с данными других авторов [25, 28–31]. Увеличение ТИМ, согласно отечественным и зарубежным рекомендациям по лечению и диагностике АГ, относится к показателям поражения органов-мишеней при АГ. ТИМ является маркером неблагоприятного прогноза. В настоящее время не представляется возможным определить преимущественное участие в увеличении комплекса ТИМ гипертензивных (отечность стенки, гипертрофия меди и др.) или атеросклеротических процессов, а также их сочетания. Взаимосвязь между уровнем СРБ и ТИМ можно объяснить влиянием медиаторов воспаления на усиление инфильтрации моноцитов в интиму [32] и образованием в ней пенистых клеток [23, 33, 34], что является ранним этапом формирования атеросклеротической бляшки.

Дисфункция эндотелия (ДЭ) является одним из основных механизмов развития и стабилизации АГ [35]. При ДЭ снижается выработка NO, активируется синтез и секреция эндотелина-1, усиливается вазоконстрикторный тонус сосудов, а также активизируются процессы перекисного окисления липидов [36], что приводит к активации синтеза СРБ, которая усугубляет ДЭ [37–41]. В эксперименте установлено, что СРБ, адсорбируясь на эндотелии, оказывает прямое ингибирующее влияние на стенку сосуда и в конечном итоге приводит к уменьшению биодоступности NO [42, 43]. В отдельных клинических работах обнаружена прямая корреляционная зависимость между СРБ и ДЭ у больных с метаболическим синдромом [44] и ИБС [45]. Показана связь дисфункции эндотелия с СРБ у больных с эссенциальной АГ с легкой и умеренной почечной недостаточностью [46]. В данной работе мы оценивали только вазомоторную составляющую функции эндотелия, не касаясь биохимических маркеров функции эндотелия, и не обнаружили взаимосвязи маркеров НВ (СРБ и ИЛ-6) с показателями, характеризующими ВФЭ. Повышенный уровень СРБ встречался у больных как с нормальной, пограничной, так и с нарушенной ВФЭ. Однако наибольшая концентрация СРБ в крови обнаружена у больных с пограничной ВФЭ, что, по-видимому, можно объяснить участием

процессов НВ на ранних стадиях формирования вазомоторной ДЭ. Необходимы дальнейшие исследования по изучению взаимосвязи между процессами НВ и ДЭ, в которых оценку функции эндотелия следует проводить с использованием не только ультразвуковых, но и биохимических показателей, более полно отражающих его функцию.

МАУ считается ранним прогностически неблагоприятным признаком поражения почек у больных АГ [47]. Имеются данные о том, что МАУ является не только ранним маркером поражения почек [48], но и показателем, характеризующим НВ у больных ГБ [49–52]. Вместе с тем связь между этими показателями до конца не изучена. В эксперименте показано, что процессы НВ увеличивают проницаемость альбумина через базальную мембрану клубочка в ответ на повышение АД [53]. В крупном исследовании PREVEND у больных ГБ установлена позитивная связь уровней СРБ и МАУ, что может быть обусловлено дисфункцией эндотелия клубочков и/или нарушением процессов ауторегуляции внутриклубочкового давления [51]. Так, по данным R.Pedrinelli и соавт., у больных АГ с МАУ повышение уровня СРБ встречалось более чем в половине случаев и сочеталось с более высоким уровнем САД (согласно результатам 24-часового СМАД), чем у пациентов без МАУ [54]. Установлено, что повышенный уровень СРБ коррелирует с выраженностью МАУ у больных с метаболическим синдромом и АГ [53–55]. Вместе с тем имеется исследование, в котором не выявлено взаимосвязи МАУ с СРБ у мужчин с АГ [55]. В нашей работе установлена достоверная позитивная взаимосвязь повышенного уровня СРБ с МАУ, которую можно объяснить развитием ДЭ в результате оксидативного стресса моноцитов и полиморфонуклеарных клеток [56, 57], а также повышенной проницаемостью альбумина через базальную мембрану клубочка [53]. Аналогичную взаимосвязь СРБ и МАУ выявляли и другие авторы [49, 58, 59].

Подводя итоги, следует отметить, что СРБ и ИЛ-6 – показатели НВ, играющие важную роль в поражении органов-мишеней на ранних стадиях АГ. В основе данной взаимосвязи, по-видимому, лежат единые нейрогуморальные механизмы развития НВ и поражения органов-мишеней.

#### Литература

1. Chae CU, Lee RT, Rifai N et al. Blood pressure and inflammation in apparently healthy men. *Hypertension* 2001; 38: 399–403.
2. Engstrom G, Janzon L, Berglund G et al. Blood pressure increase and incidence of hypertension in relation to inflammation-sensitive plasma proteins. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*; 2002; 22: 2054–8.
3. Sesso HD, Buring JE, Blake GJ et al. C-reactive protein and the risk of developing hypertension. *JAMA* 2003; 290: 2945–51.
4. European Society of Hypertension European Society of Cardiology Guidelines Committee. *European Society of Hypertension–European Society of Cardiology guidelines for the management of arterial hypertension*. *J Hypertension* 2003; 21: 1011–53.
5. Ощеткова ЕВ, Дмитриев ВА, Титов ВН. и др. Показатели неспецифического воспаления у больных гипертонической болезнью. *Тер. арх.* 2007; 12.
6. Kim Chul Sung, Jung Yul Sub, Bum Soo Kim et al. High Sensitivity C-reactive protein an independent risk factor for essential hypertension. *Am J Hypertension* 2003; 16: 429–33.
7. Li H, Gong YC, Zhu DL. Essential hypertension is associated with subclinical inflammation. *Am J Hypertens* 2004; 22 (2): s323.
8. Титов ВН, Осипов ВГ. Атеросклероз. Роль эндогенного воспаления, белков острой фазы и жирных кислот. М: Фонд "Клиника XXI века", 2003; 156–73.

9. Чазова ИЕ, Ощеткова ЕВ, Чихладзе НМ. Артериальная гипертензия. Принципы диагностики и лечения (пособие для врачей). М, 2005; 35.
10. Национальные рекомендации по профилактике диагностике и лечению артериальной гипертензии. ВНОК, 2004; 2-й пересмотр.
11. Pearson TA, Mensab GA, Wayne Alexander R et al. Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: a statement for healthcare professionals from the centers for disease control and prevention and the American Heart Association. *Circulation* 2003; 107: 499–511.
12. Реброва ОЮ. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTIKA. М: Медиа Сфера, 2002.
13. Cockcroft DW, Gault MN. Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. *Nephron* 1976; 16: 31–41.
14. Ganau A, Devereux RB, Roman MJ et al. Patterns of left ventricular hypertrophy and geometric remodeling in essential hypertension. *J Am Coll Cardiol* 1992; 19 (7): 1559–60.
15. Devereux RB, Koren MJ, de Simone G et al. Left ventricular mass as a measure of preclinical hypertensive disease. *Am J Hypertension* 1992; 5 (6 Pt 2): 175S–181S.
16. Devereux RB. Left ventricular geometry, pathophysiology and prognosis. *J Am Coll Cardiol* 1995; 25 (4): 885–7.
17. Celermajer DS. Testing endothelial function using ultrasound. *J Cardiovasc Pharm* 1998; 32 (3): S29–S32.
18. Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM et al. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet* 1992; 340: 1111–5.
19. Grundy SM. Inflammation, hypertension and the metabolic syndrome. *JAMA* 2003; 22: 3000–2.
20. Braiser AR, Resinos A, Eledrisi MS. Vascular inflammation and the renin-angiotensin system. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 2002; 22: 1257–66.
21. Stenvinkel P. Endothelial dysfunction and inflammation- is there link? *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16: 1968–71.
22. Braiser AR, Jamaluddin M, Han Y et al. Angiotensin II induces gene transcription through cell-type dependent effects on the nuclear factor-kB (NF-kB) transcription factor. *Mol Cell Biochem* 2001; 212: 155–69.
23. Tsioufis C, Stougiannos P, Kakkavas A et al. Relation of left ventricular concentric remodeling to levels of C-reactive protein and serum amyloid A in patients with essential hypertension. *Am J Cardiology* 2005; 96 (2): 252–6.
24. Ощеткова ЕВ. Мягкая артериальная гипертензия и патология магистральных артерий головы. Дис. ... докт. мед. наук. М, 1995.
25. Wang TJ, Byung-Ho Nam, Wilson PVF et al. Association of C-reactive protein with carotid atherosclerosis in men and women: the Framingham heart study. *Arteriosclerosis, Thrombosis and vascular Biology* 2002; 22: 1662–7.
26. Hashimoto H, Kitagawa K, Hougaku H et al. C-reactive protein is an independent predictor of the rate of increase in early carotid atherosclerosis. *Circulation* 2001; 104: 63–7.
27. Schillinger M, Exner M, Mlekusch W et al. Inflammation and carotid artery- risk for atherosclerosis study (ICARAS). *Circulation* 2005; 111: 2203–9.
28. Magyar MT, Szikszai Z, Balla J et al. Early-onset carotid atherosclerosis is associated with increased intima-media thickness and elevated serum levels of inflammatory markers. *Stroke* 2003; 34: 58–63.
29. Makita S, Nakamura M, Hiramori K. The association of C-reactive protein levels with carotid Intima-media complex thickness and plaque formation in the general population. *Stroke* 2005; 36: 2138–42.
30. Muratori I, Corrado E, Di Chiara S et al. Relationship between endothelial dysfunction, intima media thickness hypertension and other cardiovascular risk factors in asymptomatic subjects. *Am J Hypertension* 2005; 18: 160A.
31. Watanabe T, Yasunari K, Nakamura M et al. Carotid artery intima-media thickness and reactive oxygen species in hypertensive patients. *J Hum Hypertension* 2006; 20: 336–4.
32. Torzevski M, Rist C, Mortensen RF et al. C-reactive protein in the arterial intima. Role of C-reactive protein receptor-dependent monocyte recruitment in atherogenesis. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 2000; 20: 2094–9.
33. Blake GJ, Ridker PM. Novel Clinical markers of vascular wall inflammation. *Cir Res* 2001; 89: 763.

34. Pepys MB, Hirschfield GM. C-reactive protein: a critical update. *J Clin Invest* 2003; 111: 1805–12.
35. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA et al. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43: 109–42.
36. Vaziri ND, Ding Y, Ni Z. Nitric oxide synthase expression in the course of lead-induced hypertension. *Hypertension* 1999; 34: 558–62.
37. Cottone S, Vadala L, Guarnery M et al. Relation of C-reactive protein to oxidative stress and to endothelial dysfunction in essential hypertension. *J Hypertension* 2005; 23 (2): s58.
38. Koffler S, Nickel T, Weis M. Role of cytokines in cardiovascular diseases: a focus on endothelial responses to inflammation. *Clin Sci (Lond)* 2005; 108 (3): 205–13.
39. Komats S, Panes J, Russel JM et al. Effect of chronic arterial hypertension on constitutive and induced intercellular adhesion molecule-1 expression in vivo. *Hypertension* 1997; 29: 683–9.
40. Larousse M, Bragulat E, Segarra M et al. Increased levels atherosclerosis markers in salt sensitive hypertension. *Am J Hypertension* 2006; 19 (1): 87–93.
41. Pasceri V, Willerson JT, Edwards TH et al. Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells. *Circulation* 2000; 102: 2165–8.
42. Clapp BR, Hirschfield GM, Storry C et al. Inflammation and endothelial function: direct vascular effects of human C-reactive protein on nitric oxide bioavailability. *Circulation* 2005; 111 (12): 1530–6.
43. Vallance P, Collier J, Bhatnagar K. Infection, inflammation, and infarction: does acute endothelial dysfunction provide a link? *Lancet* 1997; 349 (9062): 1391–2.
44. Messerli AW, Sesbadi N, Gregory L et al. Relation of albumin/creatinin ratio to C-reactive protein and to the metabolic syndrome. *Am J Cardiol* 2003; 92 (5): 610–12.
45. Sinisalo J, Paronen J, Matilla KJ. Relation of inflammation to vascular function in patients with coronary heart disease. *Atherosclerosis* 2000; 149 (2): 403–11.
46. Perticone F, Maio R, Tripepi G et al. Inflammation mediates the link between endothelial dysfunction and mild to moderate renal insufficiency in essential hypertension. *J Hypertension* 2005; 23 (2): s178.
47. Brantsma AH, Bakker SJ, de Zeeuw D et al. Urinary albumin excretion as a predictor of the development of hypertension in the general population. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17 (2): 331–5.
48. de Ferranti S, Rifai N. C-reactive protein and cardiovascular disease: a review of risk prediction and interventions. *Clinica Chemica Acta* 2002; 317: 1–15.
49. Nakamura M, Onoda T, Itai K et al. Association between serum C-reactive protein levels and microalbuminuria: a population based cross sectional studying northern Iwate, Jap Int Med 2004; 10: 919–25.
50. Pontremolli R, Nicoletta R, Viazzi F et al. Microalbuminuria is an early marker of target organ damage in essential hypertension. *Am J Hypertens* 1998; 11: 430–8.
51. Stuveling EM, Hillege HL, Bakker Stephan JL et al. C-reactive protein and microalbuminuria differ in their associations with various domains of vascular disease. *Atherosclerosis* 2004; 172: 107–14.
52. Tsioufis C, Dimitriadis K, Chatzis D et al. Relation of microalbuminuria to adiponectin and augmented C-reactive protein levels in men with essential hypertension. *Am J Cardiology* 2005; 96: 946–51.
53. Stuveling EM, Bakker Stephan JL et al. C-reactive protein and microalbuminuria. *Hypertension* 2004; 43: 791–6.
54. Pedrinelli R, Dell'Omo G, Di Bello V et al. Low-grade inflammation and microalbuminuria in hypertension. *Arteriosclerosis, Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 2414–9.
55. Pedrinelli R, Penno G, Pucci L et al. Inflammatory microalbuminuria, metabolic abnormalities and cardiovascular risk in non-diabetic hypertensive men. *J Hypertension* 2004; 22 (2): s95.
56. Cottone S, Vadala A, Riccobene R et al. Relationship of microalbuminuria, endothelin-1 and growth factors in human essential hypertension. *Am J Hypertension* 1998; 11: 11A.
57. Giner V, Tormos C, Chaves FJ et al. Microalbuminuria and oxidative stress in essential hypertension. *J Int Med* 2004; 255: 588–94.
58. Koutsogiannis O, Karagiozakis V, Litsaas I. Association between C-reactive protein, fibrinogen and microalbuminuria in essential hypertension. *J Hypertension* 2003; 21 (4): s159.
59. Tsioufis C, Dimitriadis, Taxiarchou D et al. Diverse associations of microalbuminuria with C-reactive protein, interleukin-18 and soluble CD 40 ligand in male essential hypertensive subjects. *Am J Hypertension* 2006; 19: 462–6.

## ОБЗОРЫ

Ю.А. Романов, В.Н. Смирнов

## Стволовые клетки и регенерация сердца

Институт экспериментальной кардиологии

Yu.A. Romanov, V.N. Smirnov  
Institute of Experimental Cardiology, Moscow

## STEM CELLS AND CARDIAC REGENERATION

Как это ни парадоксально, но самый важный в организме орган – сердце практически не в состоянии восстановить мышечную массу, утраченную в результате инфаркта или ишемии-реперфузии. Даже кратковременное прекращение коронарного кровотока приводит к апоптозу кардиомиоцитов (КМЦ) с последующим замещением мышечной ткани рубцовой. Оставшиеся КМЦ претерпевают гипертрофию, ведущую к декомпенсации их функций и к сердечной недостаточности. Однозначного объяснения неспособности сердца восстанавливаться после повреждения не существует. Традиционно, сердце считают статическим органом, не способным к регенерации по-

сле любого повреждения. Согласно существующей концепции, число КМЦ полностью формируется к моменту рождения и в течение жизни не меняется [1–4]. Следовательно, со временем КМЦ могут только гипертрофироваться, чтобы заменить стареющие или погибающие клетки. Поскольку возраст человека может достигать 80–100 лет, то и продолжительность жизни дифференцированной клетки (согласно концепции) должна быть сравнимой с этими сроками.

Согласно современным представлениям, практически все известные тканевые системы содержат локальные клетки-предшественники. Стволовые клетки (СК) были обнаружены в коже, печени,

центральной нервной системе, желудочно-кишечном тракте, скелетной мускулатуре и др. Однако если в отношении этих тканей наличие резидентных предшественников было убедительно доказано в ряде исследований, то информация о существовании стволовых клеток в сердечно-сосудистой системе по-прежнему ограничена [5].

Существуют, однако, наблюдения, которые позволяют усомниться в правильности представления о сердце как органе, полностью неспособном к обновлению. Так, в ряде работ описано существование небольших по размеру и делящихся ("циклирующих") миоцитов [6–9]. Возможность регенерации миокарда после ишемического повреждения также отмечена в ряде исследований [7, 10–13]. Наличие пролиферирующих клеток преимущественно в перинфарктной зоне, т.е. в области живого миокарда, не исключает возможности существования в сердце пула предшественников с миокардиальной направленностью, но и не отвечает на вопрос об их происхождении. Поскольку специфической клеточной популяции, ответственной за восстановление миокарда, в самом сердце обнаружить не удавалось, было высказано предположение о роли циркулирующих в крови предшественников. Серьезным подтверждением участия в регенерации миокарда циркулирующих в крови СК стали данные, полученные при разнополюсной трансплантации сердца [14–19]. Присутствие среди клеток хозяина (XX) клеток, содержащих Y-хромосому, позволило предположить, что новообразованные КМЦ и сосудистые эндотелиальные клетки возникли из мигрировавших клеток реципиента. Сходный химеризм сердца был выявлен и у пациентов, перенесших несопадающую по полу аллогенную трансплантацию костного мозга [19].

Костный мозг содержит несколько клеточных разновидностей. Кроме дифференцированных клеток, таких как эндотелиальные клетки, адипоциты, остеобласты и остеокласты, в нем присутствуют и разные популяции СК. Наиболее представленными являются гемопоэтические СК, мезенхимальных клеток значительно меньше, но, в отличие от первых, они способны дифференцироваться в клеточные типы, отличные от населяющих костный мозг, в том числе и от КМЦ [20].

Клетки костно-мозгового происхождения уже неоднократно пытались использовать для регенерации поврежденного миокарда [21, 22]. Обычно, «клеточный препарат» представлял собой смесь разных клеточных типов, а не собственно СК. Эффективность введения клеточных коктейлей пока не получила полного подтверждения. Тем не менее безопасность использования костно-мозговых клеток при лечении инфаркта миокарда можно считать доказанной благодаря результатам многочисленных клинических исследований [23–33]. Введение суспензии клеток костного мозга, как правило, способствует некоторому улучшению сократительной функции сердца, но механизмы этого явления исследованы недостаточно [34–38]. Один из них может заключаться в формировании новых сосудистых структур или в активации местных клеток-предшественников ангиогенеза за счет паракринных эффектов, оказываемых введенными клетками [34, 40–43]. В то же время остается непонятным, являются ли клет-

ки костномозгового происхождения непосредственными предшественниками клеток сердца, и способны ли они поддерживать пул собственно сердечных СК, если таковые существуют.

Регенерация миокарда требует образования не только КМЦ, но и коронарных сосудов, и, следовательно, не может осуществляться за счет коммитированных предшественников. Восстановление пула КМЦ не может привести к улучшению сократительной функции сердца без усиления трофики, как и образование только сосудов не "оживит" погибшие КМЦ. Физиологическая регенерация миокарда требует присутствия примитивной мультипотентной клетки, способной дифференцироваться одновременно в нескольких направлениях. Наиболее вероятным кандидатом на эту роль являются c-kit-положительные СК. Единичные c-kit-положительные клетки обнаруживаются в сердце человека [17], что позволяет предположить существование истинных СК сердца (СКС), занимающих свою тканевую нишу. Во взрослом сердце клетки с фенотипом стволовых, как правило, группируются с другими ранними или более поздними предшественниками. В непосредственной близости от них выявляются и миоциты ранних стадий дифференцировки [13, 44–47]. Эти клетки не экспрессируют маркеров дифференцированных клеток [45] и в то же время обладают "стволовостью" – клоногенны, способны к самообновлению и полипотентны. Их можно выделить из ткани сердца и размножить в культуре [48, 49]. Более того, трансплантация c-kit-положительных СКС в область инфаркта сопровождается их приживлением, миграцией, пролиферацией и дифференцировкой, ведущей к улучшению функции сердца [50]. Таким образом, СКС, по крайней мере теоретически, могут найти перспективное применение при лечении заболеваний сердца. Ограничением к их использованию можно считать сложность получения из биопсийного материала в силу крайней немногочисленности.

Выявление собственного депо СК в сердце открывает новую возможность регенерации поврежденного миокарда за счет его репопуляции вновь образованными КМЦ и сосудистыми структурами [13, 51]. Использование СКС может оказаться эффективнее применения других клеточных типов, поскольку они уже запрограммированы на образование сердечной ткани. Однако область регенеративной кардиологии только начинает развиваться, и клеточная терапия заболеваний сердца должна применяться крайне осторожно до того времени, когда биология СК будет изучена досконально.

#### Литература

1. Agab R et al. Adenoviral delivery of E2F-1 directs cell cycle reentry and p53-independent apoptosis in postmitotic adult myocardium in vivo. *J Clin Invest* 1997; 100: 2722–8.
2. Chien KR, Olson EN. Converging pathways and principles in heart development and disease. *Cell* 2002; 110: 153–62.
3. MacLellan WR, Schneider MD. Genetic dissection of cardiac growth control pathways. *Annu Rev Physiol* 2000, 62: 289–319.
4. Oh H et al. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 12313–8.
5. Anversa P et al. Stem cells, myocardial regeneration and methodological artifacts. *Stem Cells* 2007; 25: 589–601.
6. Anversa P et al. Myocyte growth and cardiac repair. *J Mol Cell Cardiol* 2002; 34: 91–105.

7. Kajstura J et al. Myocyte proliferation in end-stage cardiac failure in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 8801–5.
8. Anversa P et al. Hypertensive cardiomyopathy: myocyte nuclei hyperplasia in the mammalian rat heart. *J Clin Invest* 1990; 85: 994–7.
9. Urbanek K et al. Intense myocyte formation from cardiac stem cells in human cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 10440–5.
10. Beltrami CA et al. Structural basis of end-stage failure in ischemic cardiomyopathy in humans. *Circulation* 1994; 89: 151–63.
11. Beltrami AP et al. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N Engl J Med* 2001; 344: 1750–7.
12. Olivetti G, et al. Aging, cardiac hypertrophy and ischemic cardiomyopathy do not affect the proportion of mononucleated and multinucleated myocytes in the human heart. *J Mol Cell Cardiol* 1996; 128: 1463–77.
13. Urbanek K et al. Myocardial regeneration by activation of multipotent cardiac stem cells in ischemic heart failure. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 8692–7.
14. Deb A et al. Bone marrow-derived cardiomyocytes are present in adult human heart: a study of gender-mismatched bone marrow transplantation patients. *Circulation* 2003; 107: 1247–9.
15. Glaser R et al. Smooth muscle cells, but not myocytes, of host origin in transplanted human hearts. *Circulation* 2002; 106: 17–9.
16. Muller P et al. Cardiomyocytes of noncardiac origin in myocardial biopsies of human transplanted hearts. *Circulation* 2002; 106: 31–5.
17. Quaini F et al. Chimerism of the transplanted heart. *N Engl J Med* 2002; 346: 5–15.
18. Thiele J et al. Regeneration of heart muscle tissue: quantification of chimeric cardiomyocytes and endothelial cells following transplantation. *Histol Histopathol* 2004; 19: 201–9.
19. Thiele J et al. Mixed chimerism of cardiomyocytes and vessels after allogenic bone marrow and stem-cell transplantation in comparison with cardiac allografts. *Transplantation* 2004; 77: 1902–5.
20. Fukuda K et al. Progress in myocardial regeneration and cell transplantation. *Circ J* 2005; 69: 1431–46.
21. Meyer GP et al. Stem cell therapy: a new perspective in the treatment of patients with acute myocardial infarction. *Eur J Med Res* 2006; 11: 439–46.
22. Rosenzweig A. Cardiac cell therapy – mixed results from mixed cells. *N Engl J Med* 2006; 355: 1274–7.
23. Assmus B et al. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation* 2002; 106: 3009–17.
24. Britten MB et al. Infarct remodeling after intracoronary progenitor cell treatment in patients with acute myocardial infarction (TOPCAREAMI): mechanistic insights from serial contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *Circulation* 2003; 108: 2212–8.
25. Fuchs S et al. Catheter-based autologous bone marrow myocardial injection in no-option patients with advanced coronary artery disease: a feasibility study. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41: 1721–4.
26. Galimanes M et al. Autotransplantation of unmanipulated bone marrow into scarred myocardium is safe and enhances cardiac function in humans. *Cell Transplant* 2004; 13: 7–13.
27. Hamano K et al. Local implantation of autologous bone marrow cells for therapeutic angiogenesis in patients with ischaemic heart disease: clinical trial and preliminary results. *Jpn Circ J* 2001; 65: 845–7.
28. Li TS et al. The safety and feasibility of the local implantation of autologous bone marrow cells for ischemic heart disease. *J Card Surg* 2003; 18: S69–75.
29. Perin EC et al. Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. *Circulation* 2003; 107: 2294–302.
30. Schachinger V et al. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction: final one-year results of the TOPCARE-AMI Trial. *J Am Coll Cardiol* 2004; 44: 1690–9.
31. Seiler C et al. Promotion of collateral growth by GM-CSF in patients with coronary artery disease: a randomised double blind placebo-controlled study. *Circulation* 2001; 104: 2012–5.
32. Stamm C et al. Autologous bone marrow stem cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet* 2003; 361: 45–6.
33. Wollert KC et al. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomized controlled clinical trial. *Lancet* 2004; 364: 141–8.
34. Eisenberg LM, Eisenberg CA. Stem cell plasticity, cell fusion, and transdifferentiation. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2003; 69: 209–18.
35. Eisenberg LM, Eisenberg CA. Adult stem cells and their cardiac potential. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 2004; 276: 103–12.
36. Heil M et al. A different outlook on the role of bone marrow stem cells in vascular growth: bone marrow delivers software not hardware. *Circ Res* 2004; 94: 573–4.
37. Korblyng M, Estrov Z. Adult stem cells and tissue repair. *Bone Marrow Transplant* 2003; 32: S23–4.
38. Mathur A, Martin JF. Stem cells and repair of the heart. *Lancet* 2004; 364: 183–92.
39. Angoulvant D et al. Neovascularization derived from cell transplantation in ischemic myocardium. *Mol Cell Biochem* 2004; 264: 133–42.
40. Behfar A et al. Stem cell differentiation requires a paracrine pathway in the heart. *FASEB J* 2002; 16: 1558–66.
41. Fernandez-Aviles F et al. Experimental and clinical regenerative capability of human bone marrow cells after myocardial infarction. *Circ Res* 2004; 95: 742–8.
42. Jackson KA et al. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest* 2001; 107: 1395–402.
43. Caplan A, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as a trophic mediators. *J Cell Biochem* 2006; 98: 1076–84.
44. Anversa P et al. Primitive cells and tissue regeneration. *Circ Res* 2003; 92: 579–82.
45. Beltrami AP et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 2003; 114: 763–76.
46. Chimenti C et al. Senescence and death of primitive cells and myocytes lead to premature cardiac aging and heart failure. *Circ Res* 2003; 93: 604–13.
47. Nadal-Ginard B et al. A matter of life and death: cardiac myocyte apoptosis and regeneration. *J Clin Invest* 2003; 111: 1457–9.
48. Campos LS. Neurospheres: insights into neural stem cell biology. *J Neurosci Res* 2004; 78: 761–9.
49. Van Vliet P et al. Isolation and expansion of resident cardiac progenitor cells. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2007; 5: 33–43.
50. Dawn B et al. Cardiac stem cells delivered intravascularly traverse the vessel barrier, regenerate infarcted myocardium, and improve cardiac function. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 3766–71.
51. Bearzi C et al. Characterization and growth of human cardiac stem cells. Late-breaking developments in stem cell biology and cardiac growth regulation. *Circulation* 2005; 111: 1720.

\* —————

А.Д.Турашев, Е.Г.Тищенко, А.В.Максименко

## Состояние, деструкция и реконструкция околоклеточной углеводной оболочки люминальной сосудистой поверхности в атерогенезе

Институт экспериментальной кардиологии

*Согласно данным последних исследований, регулятором атерогенных сосудистых нарушений выступает гликозаминогликановая компонента клеточной оболочки эндотелия (гликокаликс, экстрацеллюлярный матрикс, интерстиций), ферменты и ингибиторы ее катаболизма. Рассмотрены причины и последствия разрушения гликокаликса при сосудистом поражении и возможность гликокаликсной реконструкции. Выделена способность гликобелкового окружения клеток регулировать биомеханические свойства сосудов, сборку и репарацию тканей.*

**Ключевые слова:** обзор, сосудистая стенка, атеросклероз, гликокаликс, экстрацеллюлярный матрикс, гликозаминогликаны.

A.D. Turashev, E.G. Tishchenko, A.V. Maksimenko  
Institute of Experimental Cardiology

### THE STATE, DESTRUCTION, AND RECONSTRUCTION OF PERICELLULAR CARBOHYDRATE-RICH COATING THE LUMINAL VASCULAR SURFACE IN ATHEROGENESIS

*There is recent evidence that the glycosaminoglycan component of the endothelial membrane (glycocalyx, extracellular matrix, interstitium), enzymes and inhibitors of its catabolism are a regulator of atherogenic vascular impairments. The causes and sequels of glycocalyx destruction in vascular lesion and a possibility of glycocalyx reconstruction are considered. The capacity of the cellular glycoprotein environment to regulate the biomechanical properties of vessels and the assembly and repair of tissues is identified.*

**Key words:** review, vascular wall, atherosclerosis, glycocalyx, extracellular matrix, glycosaminoglycans

Обогащенная углеводами периферическая зона на поверхности большинства эукариотических клеток представляет собой клеточную оболочку, или гликокаликс. Олигосахаридные цепи гликокаликса ковалентно присоединены к мембранным белкам (гликопротеины) и в меньшей мере – к липидам (гликолипиды). Гликолипиды и протеогликианы могут секретироваться клетками и адсорбироваться на их поверхности. Протеогликианы состоят из большого числа гликозаминогликановых полимерных цепей, присоединенных к белковой основе/кору. Высокая концентрация углеводов на клеточной поверхности служит сетевым барьером для потока растворенных веществ [1] и защищает клетки от поражения [2]. Так, эндотелиальная поверхность капилляров миокарда крыс покрыта слоем углеводов толщиной 0,2–0,5 мкм [2]. Весовое содержание углеводов в плазматических мембранах составляет от 2 до 10%. Из множества природных моносахаридов в мембранных гликопротеинах и гликолипидах встречаются лишь девять, основные из которых глюкоза и глюкозамин, галактоза и галактозамин, манноза и фукоза, а также обычная для терминального положения в углеводной цепи сиаловая кислота.

**Околоклеточная оболочка – гликокаликс и экстрацеллюлярный матрикс на люминальной сосудистой поверхности**

Гликозаминогликановые цепи протеогликанов, участвующие в процессах гомеостаза, имеют полимерную (гиалуроновая кислота и хондроитинсульфат) и сополимерную (гепарансульфат и дерматансульфат) структуру [3] (рис. 1). Эти углеводные производные широко представлены во внеклеточном матриксе, который состоит из ламинина и фибронектина, коллагена и витронектина, протеогликанов (версикан, бигликан, декорин, перлекан, синдекан и др.). Указанные протеогликианы имеют разные посттрансляционные гликозаминогликановые компоненты [4]. Бигликан и декорин представляют собой хондроитинсульфат/дерматансульфат протеогликианы интерстициального матрикса с маломолекулочной белковой основой. Версикан – внеклеточный хондроитинсульфатпротеогликан, перлекан – гепарансульфатпротеогликан базальной мембраны/внеклеточного матрикса. Синдекан – хондроитинсульфат/гепарансульфатпротеогликан [5, 6]. Их локализация разнообразна. Гликозаминогликановый состав коронарных артерий человека меняется в ходе жизнедеятельности. Отмечен рост содержания сульфатированных гликозаминогликанов, особенно хондроитинсульфата и дерматансульфата, при атерогенезе [7]. При этом состав гликозаминогликанов может влиять на стабильность атеросклеротических бляшек [8], обнару-



**Рис. 1. Условное представление структурных звеньев гликозаминогликановых цепей полимерной и сополимерной природы.** Цифры в скобках перед знаком сульфогрупп – возможные позиции сульфатирования в остатках гексуроновых кислот или N-ацетил-гексуроамина. GlcA – глюкуроновая кислота, IdoA – идуроновая кислота, GlcNAc – N-ацетилглюкозамин, GalNAc – N-ацетилгалактозамин.

		Гликозаминогликаны	
Глюкозаминогликаны	<b>Полимеры</b>	$\left( -4 \text{ GlcA}(\beta 1-3) \text{ GlcNAc}(\beta 1) - \right)_n$ отсутствует O-сульфатирование	
	<b>Гиалуроновая кислота</b>	$\left( -4 \text{ GlcA}(\beta 1-3) \text{ GalNAc}(\beta 1) - \right)_n$ (2-SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) (4-SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , 6-SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) <b>Хондроитинсульфат</b>	
Галактозаминогликаны	<b>Сополимеры</b>	$\left( -4 \text{ GlcA}(\beta 1 \text{ IdoA}(\alpha 1) (2\text{-SO}_3^-) \right) \left( -4 \text{ GlcNAc}(\alpha 1) \text{ GlcNSO}_3^- (3\text{-SO}_3^-, 6\text{-SO}_3^-) \right)_n$	
	<b>Гепарин/гепарансульфат</b>	$\left( -4 \text{ GlcA}(\beta 1 \text{ IdoA}(\alpha 1) (2\text{-SO}_3^-) \right) \left( -4 \text{ GalNAc}(\beta 1) - (4\text{-SO}_3^-, 6\text{-SO}_3^-) \right)_n$ <b>Дерматансульфат</b>	

живая накопление гиалуронана и хондроитинсульфата по центрам их эрозии.

Изменение гликозаминогликанового состава может повышать антитромботическую защиту сосудистой стенки [9]. В ветви коронарной артерии, расположенной под внутримиеокардиальным мостиком, где обычно отсутствуют тромботические отложения и атеросклеротические поражения, отмечается повышенное на 47% содержание гликозаминогликанов по сравнению с расположенными рядом пре- и постсегментами сосуда. Повышенное содержание гликозаминогликанов не приводило к утолщению артериальной стенки. Содержание дерматансульфата увеличивалось в 1,8 раза, а гепарансульфата – в 1,6 раза. Последнее следует подчеркнуть особо, как причину повышения атромбогенности сосудистой стенки при ее деформации компрессионными силами волокон миокардиального мостика во время систолического давления, как и при развитии атеросклеротических и тромботических поражений [9]. Присутствие гликозаминогликанов вносит вклад в сосудистую целостность и ремоделирование.

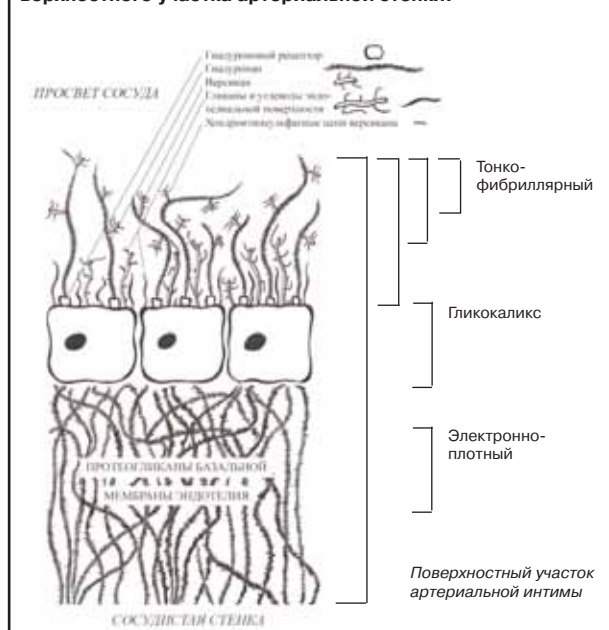
Предполагается, что клетки эндотелиального монослоя кровеносных сосудов, адгезированные на нормальном экстрацеллюлярном матриксе, неподвижны. Компоненты экстрацеллюлярного матрикса, являющиеся частью базальной мембраны необычайно высокой эластичности и растяжимости, синтезируются и секретируются, в частности, эндотелием в ходе ангиогенеза и васкулогенеза. Эндотелий зрелых сосудов способен постоянно ремоделировать экстрацеллюлярный матрикс [10]. Установка артериального шунта у бабуинов при нормальном напряжении сдвига эндотелиального слоя ведет к появлению неоинтимального утолщения, богатого гиалуронаном и версиканом, а вблизи шунта – коллагеном и бигликаном [11]. Высокое напряжение сдвига способствует регрессу неоинтимы с потерей протеогликанов и деградацией версикана. Взаимодействие последнего с интегринами эндотелиальной поверхности генерирует сигналы, которые ингибируют пролиферацию и миграцию эндотелия и стимулируют адгезию клеток друг к другу и к экстрацеллюлярному матриксу. Полагают, что 15–30% частоты развития стенозных рестенозов (в течение 6 мес со времени их установки) обусловлено скорее повышенным накоплением экстрацеллюлярного матрикса, чем клеточной пролиферацией [12]. Отмечено общее присутствие версикана, бигликана, перлекана, гиалуронана. В период до 18 мес после

проведения ангиопластики экстрацеллюлярный матрикс стенозной области похож на не полностью зажившую рану, отличается повышенным содержанием версикана, гиалуронана, коллагена III типа [13]. В дальнейшем (более чем через 18 мес) наблюдали накопление декорина, коллагена I типа и достоверное снижение плотности экстрацеллюлярного матрикса и стенозного стеноза. Сокращение/сжатие экстрацеллюлярного матрикса предлагается как цель терапии для предупреждения стенозных рестенозов. Гликозаминогликаны гликокаликса, экстрацеллюлярного матрикса, интерстиция в приведенных выше случаях предстают компонентом иницирующего взаимодействия.

### Разрушение гликокаликса

Достаточная чувствительность гликокаликса к изменению окружающих условий позволяет ему служить одним из ранних маркеров клеточного функционирования в патологических ситуациях. Так, после 60-минутной ишемии в гликокаликсе эндотелия в посткапиллярных венулах крысиной брыжейки наблюдается 40%-ное увеличение содержания галактозаминогликанов и 15%-ное повышение содержания глюкозаминогликанов [14]. Реперфузия приводит к быстрой потере гликозаминогликанов эндотелиального гликокаликса [15].

**Рис. 2. Схематическое изображение поперечного среза поверхностного участка артериальной стенки.**



Это свидетельствует о том, что его состав зависит от скорости синтеза эндотелием гликозаминогликанов и их шеддингом (отрывом/срезанием) [14]. Следует отметить, что у человека имеется весьма высокий метаболизм гликозаминогликанов, в частности гиалуроновой кислоты [16, 17]. Так, приблизительно 1/3 имеющегося в организме человека гиалуронана (5 г) разрушается и замещается в течение дня, главным образом, ретикулоэндотелиальной системой [16]. Время полужизни гиалуроновой кислоты в кровотоке составляет 2–5 мин [17], и через систему циркуляции оборачивается каждый день от 10 до 100 мг гиалуронана [16]. Под действием активных форм кислорода на изолированном сердце крысы [18] или морской свинки [19] после ишемии/реперфузии происходит разрушение эндотелиального гликокаликса. Такие его изменения вносят вклад в механизм эндотелиальной дисфункции в постишемизированном миокарде [18, 19] и представляют раннюю ступень воспалительного каскада, связанного с реперфузионным поражением эндотелия [15].

Гликозаминогликаны гликокаликса проявляют защитную функцию против увеличенного поступления атерогенных липопротеинов. С помощью электронной микроскопии гистохимически исследовали состояние эндотелия аорты человека [20]. Оказалось, что на ранних этапах атерогенеза количество гликокаликса на поверхности эндотелиального монослоя артерий увеличивается, проявляя компенсаторно-приспособительный ответ клетки на поступление избыточного количества атерогенных липидов. В области липидной полосы заметно резкое утолщение гликокаликса. На поздних этапах атерогенеза, с образованием фиброзной бляшки, происходит разрушение слоя гликокаликса, вплоть до его полного исчезновения. В зрелых фиброзных бляшках слой гликокаликса также существенно истончается [20]. Потеря гепарансульфата в гликокаликсе культуры эндотелия (после ее обработки гепариназой III) [21] или гиалуроновой кислоты в гликокаликсе бедренных артерий собак (после обработки гиалуронидазой) ведет к снижению продуцирования NO в ответ на напряжение сдвига на поверхности эндотелия. Для такого продуцирования NO гепарансульфат играет роль механорецептора, а гиалуроновая кислота выступает биомеханическим сенсором [22]. С этим согласуется ключевое участие гепарансульфата гликокаликса эндотелия легких в воспалительном каскаде, индуцированном пептидом (полиаргинин), который вызывает реорганизацию цитоскелета с последующей барьерной дисфункцией [23]. Деградацию гликокаликса могут стимулировать и окисленные липопротеины низкой плотности [24]. Это способствует адгезии лейкоцитов к эндотелию, что воспроизводит условия развития атеросклероза, такие как гиперхолестеринемия и присутствие в плазме крови окисленных липопротеинов [25]. Кроме того, разрушение микроциркуляторного гликокаликса приводит к быстрому отеку миокардиальной ткани в модельных экспериментах [2]. Количество адгезированных на эндотелии лейкоцитов уменьшается при введении гепарина или гепарансульфата, которые могут присоединяться к люминальной поверхности [25].

### Реконструкция гликокаликса

Реконструкции гликокаликса способствует адгезия к клеточной поверхности гиалуронана [26, 27]. Локальное введение (через баллонный катетер) гепарина кроликам с гиперхолестеринемией обеспечивало более выраженный антистенотозный эффект, чем внутривенное введение гепарина (люминальный стеноз у них после ангиопластики составлял 9 и 18%, на 28-е сутки – 30 и 45%, а в группе контроля, в которой проводили только ангиопластику, – 17 и 72% соответственно) [28]. Обнаруженный эффект свидетельствовал о возможном концентрировании гликозаминогликанов на пораженном сосудистом участке, более эффективно проявляющийся при локальном введении и использовании гликозаминогликановых фрагментов (соответствующие по времени показатели стеноза для низкомолекулярного гепарина составили 11 и 15%). При использовании меченного флюоресцеином декстрансульфата (гликозаминогликановый аналог), внутриартериально введенного через баллонный катетер за 5 мин до поражения (ишемия/реперфузия) миокарда свиней, выявлена локализация этого агента в пораженном сосуде/миокарде, соответствующая снижению содержанию гепарансульфатпротеогликана в результате повреждения [29]. Отмеченная локальная направленная цитопротекция декстрансульфатом указывала на важность восстановления поврежденного протеогликанового слоя, что обеспечивает достоверное снижение размера инфаркта миокарда у животных. Восстановление микроциркуляторного гликокаликса у хомяков (после его деструкции гиалуронидазой) достигается инфузией смеси гиалуроновой кислоты и хондроитинсульфата [30]. При раздельном использовании указанных гликозаминогликанов реконструкции гликокаликса не выявлено. Учитывая способность гиалуронана создавать матрицы со свойствами молекулярного сита, он может играть важную роль в регуляции и установлении проницаемости апикального гликокаликса для макромолекул, а гиалуронидаза регулировать тканевую проницаемость [30].

Отличие прямоцепочечной гиалуроновой кислоты/гиалуронана от других гликозаминогликанов заключается в отсутствие ковалентной пришивки/присоединения этого полимера к белковой основе, его высокой молекулярной массе ( $10^5$ – $10^7$  Да), отсутствие сульфатирования его молекул и в осуществлении синтеза не в аппарате Гольджи [16, 17, 31], а скорее на внутренней стороне плазматической мембраны. Как и другие гликозаминогликаны, гиалуроновая кислота одновременно выполняет в организме структурные и регуляторные функции. Первые связаны с взаимодействием с другими гликозаминогликанами экстрацеллюлярного матрикса, важными для структуры и сборки некоторых тканей, и проявляемые в сосудистой стенке (рис. 2). Вторые заключаются в связывании воды и солей, во взаимодействии с другими биомолекулами (белки, липиды, липопротеины, рецепторы клеточной поверхности) для влияния на внутриклеточную передачу сигнала или интернализацию гиалуроновой кислоты [16, 31]. Гидратированные цепи гиалуронана способствуют организации пути для клеточного движе-

ния [31], а разрушение эндотелиального гликокаликса капилляров ведет к быстрому отеку миокардиальной ткани [2]. Гидратированное состояние самой гиалуроновой кислоты облегчает диффузию белков и электролитов. Высокие количества гиалуронана характерны для эмбриогенеза и заживления ран [16].

На поздних стадиях заживления ран в полностью дифференцированных тканях, таких как костная и хрящевая, появляются отложения другого гликозаминогликана – хондроитинсульфата [17]. В эволюции многоклеточных организмов хондроитинсульфат появился прежде гиалуроновой кислоты. Одно из возможных объяснений этого заключается в том, что позднее появление гиалуроновой кислоты может совпадать с потребностью обособления полипотентных стволовых клеток, которые остаются недифференцированными на протяжении жизни организма. Благодаря этому обеспечивается резервуар недифференцированных клеток для более позднего восстановления и распространения, заполнения дефектов, заживления ран и как особый способ адаптивной репарации [17]. Организм без гиалуроновой кислоты не может иметь такой компенсаторный механизм, возможно, потому что все его клетки остаются полипотентными. Организм же, занимающий более высокий уровень на эволюционной шкале, построен в основном на дифференцированными клетками. Запас плюропотентных клеток может поддерживаться в плоде (зародыше) в виде стволовых клеток окружением, богатым гиалуроновой кислотой, используя такие клетки из резерва организма. Альтернативно гиалуроновая кислота может способствовать миграции плюропотентных клеток плода на заметные расстояния, в чем нет необходимости у более примитивных организмов [17]. В целом способность синтезировать гиалуронан является недавней инновацией в эволюции многоклеточных организмов [32].

Гиалуронан представлен в экстрацеллюлярном матриксе, на клеточной поверхности и внутри клеток [16, 17, 32]. В тканях он является важным структурным компонентом внеклеточного матрикса, как, например, в хрящах. Для образования клеточной оболочки гиалуронан присоединяется к клеточной поверхности через его рецепторы (CD44, RHAMM/receptor for hyaluronan-mediated motility/, TSG-6/tumor necrosis factor-stimulated gene 6/) или другие связывающие гиалуронан-белки (гиалоадгерины) и гиалуронан-синтазы [32]. Большинство из них содержит один или два участка связывающего модуля, известного как протеогликановый tandemный (повтор/proteoglycan tandem repeat), состоящего из двух  $\alpha$ -спиралей и двух тройных антипараллельных  $\beta$ -слоев, расположенных вокруг большого гидрофобного ядра, что отвечает С-типу лектинового модуля [16]. Участком для гиалуронанового связывания может быть мотив ВХ7В, где В – остаток основной, а Х – любой аминокислоты, которая не является отрицательно заряженной. Рецепторное связывание гиалуронана может ассоциироваться с внутриклеточным сигналингом [16, 32] (здесь не рассмотрен) и с его заякориванием на поверхности клетки для образования ее полисахаридной оболочки. Удержание гиалуроновой кислоты способствует захвату и

встраиванию внеклеточных связывающих гиалуронан-белков (рис. 2), таких как хондроитинсульфатпротеогликаны разной локализации версикан, агрекан, бревикан, нейрокан, в непосредственное окружение клетки [16]. Сывороточный гиалоадгерин интер- $\alpha$ -трипсиновый ингибитор (I $\alpha$ I) и TSG-6 образуют прочный комплекс, который может способствовать сшивке молекул гиалуронана, чтобы стабилизировать образование матрикса. Таким образом, способность протеогликанов взаимодействовать с компонентами гликокаликса и внеклеточного матрикса (гиалуронаном, гликолипидами и гликобелками, нерастворимыми фибриллярными белками и ассоциированными белками плазмы) позволяет регулировать биомеханические свойства сосудов, формируя гелевую оболочку клеточного микроокружения.

### Исследование выполнено при частичной поддержке Росздрава и РФФИ (гранты №06-04-48058 и 07-04-12057-офи).

#### Литература

- Huxley VH, Williams DA. Role of a glycocalyx on coronary arteriole permeability to proteins: evidence from enzyme treatments. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 278(4): H1177–85.
- Van den Berg BM, Vink H, Spaan JA. The endothelial glycocalyx protects against myocardial edema. *Circ Res* 2003; 92 (6): 592–4.
- Bourin M-C, Lindahl U. Glycosaminoglycans and the regulation of blood coagulation. *Biochem J* 1993; 289 (Pt 2): 313–30.
- Siegel G. Connective tissue: more than just a matrix for cells. *Comprehensive human physiology* (Greger R, Windhorst U, eds). Berlin–Heidelberg: Springer-Verlag 1996; 1: 173–224.
- Rapraeger A, Jalkanen M, Endo E et al. The cell surface proteoglycan from mouse mammary epithelial cells bears chondroitin sulfate and heparan sulfate glycosaminoglycans. *J Biol Chem* 1985; 260 (20): 11046–52.
- Williams KJ, Fuki IV. Cell-surface heparan sulfate proteoglycans: dynamic molecules mediating ligand catabolism. *Curr Opin Lipidol* 1997; 8 (5): 253–62.
- Yla-Herttuala S, Sumuuruori H, Karkola K et al. Glycosaminoglycans in normal and atherosclerotic human coronary arteries. *Lab Invest* 1986; 54 (4): 402–7.
- Kolodgie FD, Burke AP, Farb A et al. Differential accumulation of proteoglycans and hyaluronan in culprit lesions: insights into plaque erosion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22 (10): 1642–8.
- Shinjo SK, Prates NEVB, Oba SM et al. Distribution and composition of glycosaminoglycans in the left human coronary arterial branches under myocardial bridge. *Atherosclerosis* 1999; 143 (2): 363–8.
- Mebta D, Malik AB. Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. *Physiol Rev* 2006; 86 (1): 279–367.
- Kenagy RD, Fischer JW, Lara S et al. Accumulation and loss of extracellular matrix during shear stress-mediated intimal growth and regression in baboon vascular grafts. *J Histochem Cytochem* 2005; 53(1): 131–40.
- Chung IM, Gold HK, Schwartz SM et al. Enhanced extracellular matrix accumulation in restenosis of coronary arteries after stent deployment. *J Am Coll Cardiol* 2002; 40 (12): 2072–81.
- Farb A, Kolodgie FD, Huang JY et al. Extracellular matrix changes in stented human coronary arteries. *Circulation* 2004; 110 (8): 940–7.
- Mulivor AW, Lipowsky HH. Inflammation- and ischemia-induced shedding of venular glycocalyx. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 286 (5): H1672–80.
- Platts SH, Linden J, Duling BR. Rapid modification of the glycocalyx caused by ischemia-reperfusion is inhibited by adenosine A2A receptor activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 284 (6): H2360–7.
- Camenisch TD, McDonald JA. Hyaluronan: is bigger better? *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000; 23 (4): 431–3.
- Stern R. Devising a pathway for hyaluronan catabolism: are we there yet? *Glycobiology* 2003; 13 (12): 105R–15R.

18. Czarnowska E, Karwatowska-Prokopczuk E. Ultrastructural demonstration of endothelial glycocalyx disruption in the reper-fused rat heart. Involvement of oxygen free radicals. *Basic Res Cardiol* 1995; 90 (5): 3573–64.
19. Beresewicz A, Czarnowska E, Maczewski M. Ischemic preconditioning and superoxide dismutase protect against endothelial dysfunction and endothelium glycocalyx disruption in the postischemic guinea-pig hearts. *Molec Cell Biochem* 1998; 186 (1–2): 87–97.
20. Tararak EM, Sukhova GK. Electron microscopic study of the state of glycocalyx and endocytosis in human aortic endothelium during atherogenesis. *Angiol Vasc Surgery* 1999; 5 (Suppl.): 204–17.
21. Florian JA, Kosky JR, Ainslie K et al. Heparan sulfate proteoglycan is a mechanosensor on endothelial cells. *Circ Res* 2003; 93 (10): e136–42.
22. Mochizuki S, Vink H, Hiramatsu O et al. Role of hyaluronic acid glycosaminoglycans in shear-induced endothelium-derived nitric oxide release. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 285 (2): H722–6.
23. Dull RO, Dinavahi R, Schwartz L et al. Lung endothelial heparan sulfates mediate cationic peptide-induced barrier dysfunction: a new role for the glycocalyx. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003; 285 (5): L986–95.
24. Vink H, Constantinescu AA, Spaan JAE. Oxidized lipoproteins degrade the endothelial surface layer: implications for platelet-endothelial cell adhesion. *Circulation* 2000; 101 (13): 1500–2.
25. Constantinescu AA, Vink H, Spaan JAE. Endothelial cell glycocalyx modulates immobilization of leukocytes at the endothelial surface. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23 (9): 1541–7.
26. Underhill CB, Toole BP. Binding of hyaluronate to the surface of cultured cells. *J Cell Biol* 1979; 82 (2): 475–84.
27. Evanko SP, Angello JC, Wight TN. Formation of hyaluronan- and versican-rich pericellular matrix is required for proliferation and migration of vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19 (4): 1004–13.
28. Tomaru T, Fujimori Y, Morita T et al. Local delivery of antithrombotic drug prevents restenosis after balloon angioplasty in atherosclerotic rabbit artery. *Jpn Circ J* 1996; 60 (12): 981–92.
29. Banz Y, Hess OM, Robson SC et al. Locally targeted cytoprotection with dextran sulfate attenuates experimental porcine myocardial ischaemia/reperfusion injury. *Eur Heart J* 2005; 26 (21): 2334–43.
30. Henry CBS, Duling BR. Permeation of the luminal capillary glycocalyx is determined by hyaluronan. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1999; 277: H508–14.
31. Toole BP. Hyaluronan is not just a goo! *J Clin Invest* 2000; 106 (3): 335–6.
32. Tammi MI, Day AJ, Turley EA. Hyaluronan and homeostasis: a balancing act. *J Biol Chem* 2002; 277 (7): 4581–4.

Е.Г.Тищенко, А.Д.Турашев, А.В.Максименко

## Регуляторные эффекты взаимодействия гликозаминогликанов углеводной выстилки люминальной сосудистой поверхности с низко- и высокомолекулярными лигандами

Институт экспериментальной кардиологии

Гликобелковое окружение клеток люминальной сосудистой поверхности способно регулировать биомеханические свойства сосудов, сборку и репарацию тканей, связывать низко- и высокомолекулярные лиганды. Гидратация гликозаминогликанов определяет развитие тканевых отеков и опосредует антикоагулянтную активность экстрацеллюлярного матрикса. Отмечено связывание гликозаминогликанов с хемокинами, факторами роста, другими белками, липопротеинами для реализации регуляторной функции. Показано наличие особых структурных участков связывания у таких реактантов и зависимость биологических эффектов, вызываемых гликозаминогликанами, от величины их молекулярной массы.

**Ключевые слова:** обзор, сосудистая стенка, гликокаликс, внеклеточный матрикс, низко- и высокомолекулярные лиганды, сосудистые осложнения.

**E. G. Tishchenko, A. D. Turashev, A. V. Maksimenko**

*Institute of Experimental Cardiology*

*Running title: Interaction of the carbohydrate-rich vascular tunic with ligands, Moscow*

### REGULATORY EFFECTS OF THE INTERACTIONS OF THE GLYCOSAMINOGLYCANS OF THE CARBOHYDRATE-RICH LINING OF THE LUMINAL VASCULAR SURFACE WITH LOW AND HIGH MOLECULAR-WEIGHT LIGANDS

The cellular glycoprotein environment of the luminal vascular surface can regulate the biomechanical properties of vessels, the assembly and repair of tissue, to bind low and high molecular-weight ligands. Hydration of glycosaminoglycans determines the development of tissue edemas and mediates the anticoagulant activity of the extracellular matrix. Glycosaminoglycan binding to chemokines, growth factors, other proteins, lipoproteins for regulatory function is observed. It is shown that such reagents have special structural binding sites and that the biological effects of glycosaminoglycans are related to the size of their molecular weight.

**Key words:** review, vascular wall, glycocalyx, extracellular matrix, low and molecular ligands, vascular complications.

Данные современных исследований свидетельствуют о многоплановой роли гликозаминогликанового компонента гликокаликса, экстрацеллюлярного матрикса и интерстиция в организме. Имеющиеся сведения не позволяют видеть в углеводном покрытии только гидратированную подложку для клеточного удержания и организации пути их передвижения. Важно ее участие в построении тканей, обеспечении существования окологлазочной оболочки, функционирование в процессах передачи сигнала в клетку. Такая ситуация обуславливает развитие гликозаминогликановых исследований по многим направлениям с участием специалистов разных областей знания.

Обнаружение молекулярных партнеров, взаимодействующих с гликозаминогликанами, – гиалуронина, синтаз, гиалуронидаз, других ферментов и ингибиторов их метаболизма расширяет сферу изучения и увеличивает число его объектов. Значимость таких исследований подчеркивается влиянием гликозаминогликанов на процессы морфогенеза, эмбриогенеза, интерстициального гомеостаза и клеточного поведения.

**Связывание низкомолекулярных веществ.** К белковой основе/кору протеогликанов ковалентно присоединены линейные гликозаминогликановые цепи разной степени сульфатирования. Анализ протеогликанового состава версикана нормальной и атеросклеротически пораженной стенки артерий обнаружил его гетерогенность [1]. Отрицательный заряд сульфогрупп влияет на участие ионов, пространственного осмотического градиента, объема гидратации в функционировании фибриллярной сети, внеклеточного гелевого матрикса как биологического сита в процессах клеточной пролиферации, адгезии, подвижности, коагуляции крови. В норме (регулируя, в частности, тромбиновую активность) интерстиций живых тканей поддерживается в относительно дегидратированном состоянии. Механизм этой поддержки сложен и зависит от гликозаминогликанов. В патологических условиях (воспаление и др.) возбужденные ткани (включая артериальные) разбухают, препятствуя тканевому потоку/перфузии, затрудняя проникновение нутриентов и лекарственных средств. Ферментативное удаление из внеклеточной гелевой оболочки гликозаминогликанов снижает набухание тканей и способствует в результате такого частичного дегидратирования регуляции скорости важных биологических реакций. В целом, гидратационный объем гелевого матрикса поддерживается балансом сил, включающих эластичность разных полимерных компонентов, их химическую аффинность, фиксированный заряд, осмотические взаимодействия ионизованного растворителя.

Предположительно, макромолекулярные взаимодействия, определяющие развитие атерогенеза, должны быть направлены, в частности, на относительно дегидратационное состояние интерстиция, преобладающее в норме *in vivo*. Поскольку эти силы внутренне сопряжены с механическими и структурными факторами, соответствующими количеству и пространственному распределению гликозаминогликанов в интактных тканях, то изменения в составе и распределении гликозаминогликанов будут влиять на объем гидратации. Действительно, гистологически обнаруженные нарушения в атеросклеротических тканях, такие как диффузионное утолщение и дезорганизация фибриллярных элементов в интиме, указывают на дисрегуляцию локального водного гомеостаза. Было установлено, что в сравнении с нормальной у атеросклеротически пораженной (IV тип поражения, согласно классификации Американской ассоциации сердца) ткани аорты наблюдается уменьшение степени сульфатирования хондроитинсульфата [1]. Из-за этого снижается антикоагулянтный резерв экстрацеллюлярного матрикса, так как связывание антитромбина с хондроитинсульфатом затрудняется необходимостью дегидратации – удаления большего количества молекул воды с белковой поверхности (в реакции последовательного ингибирования фактора Ха). Пространственное расположение гликозаминогликановых цепей может заполнять экстрацеллюлярный матрикс и способствовать белковому взаимодействию простым сокращением эффективного объема доступного для диффузии. Однако варьирование степени сульфатирования гликозаминогликанов может влиять на баланс воды в экстрацеллюлярном матриксе изменением количества растворителя, способного обильно гидратировать белковую поверхность [2]. Так, косольвент (дополнительно растворенное в системе вещество) принуждает белки к частичной дегидратации (благодаря собственной гидратации) и сдвигает равновесие в сторону меньшего содержания связанной воды в гидратационном слое белков. Это является следствием термодинамической стабильности и связи между связыванием воды и образованием белковых комплексов, которое и направляет равновесие к кажущемуся повышению аффинности белок-белкового взаимодействия [2]. Вместе с тем разработка новых антикоагулянтов на основе пентасакhariда из гепариновой последовательности показала, что увеличение степени сульфатирования последней ведет к усилению ее аффинности к антитромбину (без учета влияния гидратации) и повышению времени полужизни в кровотоке [3]. Вероятно, для надежного выяснения роли переноса воды в рассматриваемой ситуации необходимы ис-

**Формализованный состав и структура центров белково-гликозаминогликановых взаимодействий (на примере гепарина).**

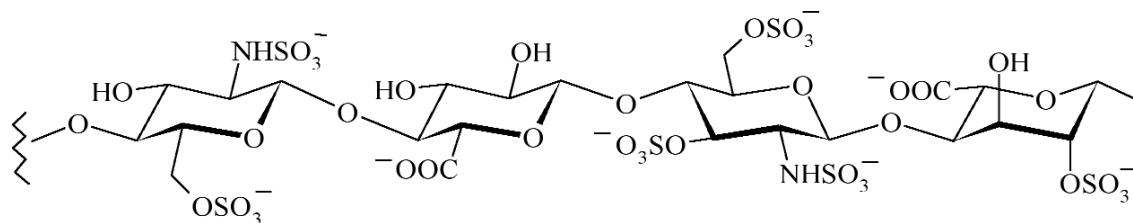
Виды связывающих гепарин-центров в белках

XBVXBX X – гидропатическая кислота, чаще Ser или Gly

и

XBVXBXVX B – основная аминокислота, в основном, Arg или Lys

**Гепариновый пентасакхарид**



следования других реакций коагуляционного каскада [2], а также пара- и трансцеллюлярного (посредством аквапоринов) транспорта воды [4].

**Связывание высокомолекулярных веществ.** Гликозаминогликаны являются антеннами клеточной поверхности для связывания с хемокинами [5]. С одной стороны, повышение локальной концентрации хемокинов на клетке вблизи рецептора способствует их взаимодействию (передающему сигнал на клеточный G-белок в цитозоле), когда хемокин может переходить с поверхностного гликозаминогликана на рецептор, с другой – комплекс хемокина с растворимым гликозаминогликаном не способен связываться с рецептором. Так, гликозаминогликаны могут регулировать взаимодействие рецепторов с хемокинами, концентрируя последние на поверхности клеток и создавая конкуренцию за хемокин между клеточным рецептором и растворимым гликозаминогликаном [5]. Образование депо макромолекулярных лигандов, связанных с поверхностными клеточными гликозаминогликанами, удается не только регулировать биологическую активность, но и защищать лиганды от инактивации, например, предотвращая неферментативное гликозилирование основного фактора роста фибробластов благодаря связыванию с гепарансульфатом (но не с хондроитинсульфатом) [6]. Связывание с белками позволяет протеогликанам участвовать в нормальных условиях в клеточном и тканевом развитии.

При патофизиологических условиях содержащие хондроитинсульфат/гепарансульфат протеогликаны (бигликан, версикан, пеоликан и др.) могут инициировать повышенное связывание (в интактном и окисленном виде) липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) и образовывать внеклеточные преатеромные липидные отложения в интиме и внутри меди. Такое закоривание ЛПНП может сопровождаться образованием тройного комплекса протеогликан/липопротеины/ $Ca^{2+}$ , ведущим к кальцификации артерий [7]. Отмечалось, что хондроитинсульфат протеогликан макрофагов связывает окисленные ЛПНП. В условиях окислительного стресса содержание этого протеогликана на макрофагах увеличивается, что наряду с захватом ЛПНП может ускорять развитие атеросклероза [8]. Кроме того, экзогенно введенные гепарансульфат или хондроитинсульфат могут встраиваться в клеточное окружение, увеличивая захват окисленных ЛПНП [9]. Было показано, что гликозаминогликаны (гепарансульфат, хондроитинсульфат) ускоряют активацию плазминогена урокиназой, влияя на k-KAT, а ЛПНП или липопротеин(а) ингибируют их эффект [10]. Это подчеркивает многоплановость опосредованной регуляторной функции гликозаминогликанов.

Таким образом, гликозаминогликаны, представленные в гликокаликсе, экстрацеллюлярном матриксе, интерстиции, участвуют в связывании биомолекул разного типа, действуя на них аллостерически и мостиковым или подложковым образом. Предполагалось, что в зависимости от структуры и состава протеогликанов (последовательность сахаров, вид белка) они могут индивидуализировать свои функции в организме [11].

**Центры взаимодействия на гликозаминогликанах.** Результатом многочисленных исследований стало обнаружение уникальной пентасахаридной последовательности (см. рисунок) в гепа-

рине [12], которая опосредует низкоаффинное связывание гликозаминогликана с антитромбином. Происходящие при этом с последним конформационные изменения усиливают их связывание. Оно способствует образованию тройного комплекса антитромбин–гепарин–протеаза (тромбин или фактор Ха), в котором осуществляется возвращение к низкоаффинному связыванию углевода с белком, опосредуя специфическое взаимодействие ингибитора с ферментом на углеводной подложке или матрице. Полученные данные позволяют использовать синтетические аналоги связывающей антитромбин пентасахаридной последовательности гепарина в качестве антикоагулянтов для лечения венозных тромбозов [3]. Связывающие гепарин центры белков характеризуются наличием кластеров положительно заряженных основных аминокислот (аргинин или лизин – Arg или Lys соответственно), которые образуют ионные пары с пространственно ориентированными отрицательно заряженными сульфо- и карбоксильными группами гликозаминогликановой цепи. Аминокислотные последовательности связывающих гепарин центров были определены в витронектине, аполипропротеинах В и Е, 4-м тромбоцитарном факторе [12]. Они представлены в виде двух мотивов, характерных участков аминокислотной последовательности белков, – ХВВХВХ и ХВВВХХВХ, где В – остаток основной, а Х – отрицательно незаряженной аминокислоты (наиболее часто серин или глицин – Ser или Gly соответственно; см. рисунок). Первый мотив организуется в  $\beta$ -слой, а второй сворачивается в  $\alpha$ -спираль. Из двух  $\alpha$ -спиральных и двух антипараллельных  $\beta$ -слоев вокруг гидрофобного ядра состоит лектиновый модуль С-типа, осуществляющий связывание гиалуронана [13]. Хотя одного связывающего модуля достаточно для взаимодействия с гиалуронаном (TSG-6), некоторые белки имеют их по два (белки в протеогликанах – агрекане, версикане, нейрокане). Рецептор опосредованной гиалуронаном подвижности (RHAMM) имеет другой мотив связывания гиалуронана ВХ7В [13]. Отмечалось, что гексасахаридная последовательность дерматансульфата может способствовать связыванию гепаринового кофактора II и аллостерическим образом вызывать затем селективную инактивацию тромбина [14]. Ингибированию поддается тромбин в растворе и связанный с фибрином или с поверхностью пораженного сосуда.

Приведенные результаты избирательного взаимодействия белков с гликозаминогликанами выявляют роль связывающих гликозаминогликан доменов в сосудистой биологии и открывают перспективы для разработки фармакологического контроля процессов, протекающих в сосудистой стенке.

**Эффекты целых и фрагментированных гликозаминогликанов.** Известны антикоагулянтные свойства гликозаминогликанов, проявляемые ими в поли- и олигомерном виде, начиная с некоторого порогового значения молекулярной массы производного [14, 15]. Следует отметить, что биологические эффекты гиалуронана заметно варьируют в зависимости от его молекулярной массы. Так, высокомолекулярные гиалуроновые полисахариды, как молекулы пространственного наполнения и гидратации тканей, являются ангиогенными, противовоспалительными и иммуносупрессивными [16]. Фрагменты гиалуронана с молекулярной массой 20 кДа уже стимулируют синтез

воспалительных цитокинов. Меньшие фрагменты (6–20 кДа) гиалуроновой кислоты оказывают ангиогенными, провоспалительными и иммуностимулирующими [13, 16]. Гиалуронановые фрагменты с молекулярной массой 200 кДа улучшают *in vitro* выживание эозинофилов периферической крови, а гиалуроновая кислота (молекулярная масса – от 3000 до 6000 кДа) имеет существенно меньший эффект [13]. Фрагменты гиалуронана могут обладать биологической активностью, отличной от полимерной формы. Низко-, но не высокомолекулярный гиалуронан стимулирует продукцию металлоэластазы в клетках МН-S и экспрессию индуцибельной NO-синтазы в эндотелиальных и купферовских клетках печени крыс [13]. Связывание высокомолекулярной гиалуроновой кислоты с CD44 ингибируется ее олигосахаридными фрагментами, состоящими из 6–18 сахаров. Это подчеркивает то, что именно гексамер гиалуронана занимает лимитирующий участок связывающего центра белка. С увеличением длины цепи гиалуронана (20–30 сахаров) степень ингибирования повышается [13]. Механизм зависимости эффектов от молекулярной массы гиалуронановых производных пока неизвестен. Необходимо особо отметить зависимость экспериментальных данных от количества используемого гиалуронана [17], применяемых лотов гиалуроновой кислоты (имеющих различия в зависимости от производителей) [13]. Поэтому следует весьма внимательно и осторожно подходить к интерпретации таких данных, включая некоторые контрольные эксперименты с гиалуронаном и сульфатированными гликозаминогликанами.

**Работа выполнена при частичной поддержке Росздрава и РФФИ (гранты №07-04-12057-офи, 06-04-48058 и 06-08-00011).**

#### Литература

1. McGee M, Wagner WD. Chondroitin sulfate anticoagulant activity is linked to water transfer: relevance to proteoglycan structure in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23 (10): 1921–7.

2. Di Cera E. Atherosclerosis: testing the water. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23 (10): 1713–4.
3. Weitz JI. New anticoagulants for treatment of venous thromboembolism. *Circulation* 2004; 110 (9 Suppl. 1): 119–26.
4. Kuschert GSV, Coulin F, Power CA et al. Glycosaminoglycans interact selectively with chemokines and modulate receptor binding and cellular responses. *Biochemistry* 1999; 38 (39): 12959–68.
5. Nissen NN, Shankar R, Gamelli RL et al. Heparin and heparan sulphate protect basic fibroblast growth factor from non-enzymic glycosylation. *Biochem J* 1999; 338 (Pt 3): 637–42.
6. Siegel G, Malmsten M, Klussendorf D, Leonhardt W. Physicochemical binding properties of the proteoglycan receptor for serum lipoproteins. *Atherosclerosis* 1999; 144 (1): 59–67.
7. Kaplan M, Aviram M. Macrophage plasma membrane chondroitin sulfate proteoglycan binds oxidized low-density lipoprotein. *Atherosclerosis* 2000; 149 (1): 5–17.
8. Kaplan M, Williams KJ, Mandel H, Aviram M. Role of macrophage glycosaminoglycans in the cellular catabolism of oxidized LDL by macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18 (4): 542–53.
9. Edelberg JM, Weissler M, Pizzo SV. Kinetic analysis of the effects of glycosaminoglycans and lipoproteins on urokinase-mediated plasminogen activation. *Biochem J* 1991; 276 (Pt 3): 785–91.
10. David G, Danneels A, Duerr J et al. Heparan sulfate proteoglycans. Essential co-factors in receptor-mediated processes with relevance to the biology of the vascular wall. *Atherosclerosis* 1995; 118 (Suppl.): S57–67.
11. Munoz EM, Linhardt RJ. Heparin-binding domains in vascular biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24 (9): 1549–57.
12. Nenci GG. Dermatan sulphate as an antithrombotic drug. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2002; 32 (5–6): 303–7.
13. Bianchini P. Therapeutic potential of non-heparin glycosaminoglycans of natural origin. *Semin Thromb Hemost* 1989; 15 (4): 365–9.
14. Mehta D, Malik AB. Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. *Physiol Rev* 2006; 86 (1): 279–367.
15. Camenisch TD, McDonald JA. Hyaluronan: is bigger better? *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000; 23 (4): 431–3.
16. Stern R. Devising a pathway for hyaluronan catabolism: are we there yet? *Glycobiology* 2003; 13 (12): 105R–15R.
17. Tammi MI, Day AJ, Turley EA. Hyaluronan and homeostasis: a balancing act. *J Biol Chem* 2002; 277 (7): 4581–4.

П.В.Галицин, А.Ю.Литвин, И.Е.Чазова

## Синдром обструктивного апноэ во время сна и дисфункция эндотелия

Институт клинической кардиологии им. А.Л.Мясникова

**P.V. Galitsin, A.Yu. Litvin, I.E. Chazova**  
A.L. Myasnikov Institute of Clinical Cardiology

### SLEEP OBSTRUCTIVE APNEA AND ENDOTHELIAL DYSFUNCTION

Причины и механизмы возникновения и развития синдрома обструктивного апноэ во время сна (СОАС) изучены недостаточно.

По данным разных авторов распространенность СОАС в общей популяции составляет около 1–4% [1–3]. Однако 80–90% случаев этого синдрома ос-

тается клинически недиагностированным [4]. Среди лиц 20–70 лет частота выявления СОАС составляет 5–10% у мужчин и 2–5% у женщин [5–7]. При наличии СОАС обнаруживается множественная сердечно-сосудистая патология: атеросклеротическое поражение артерий, артериальная гипертензия (АГ),

цереброваскулярные заболевания (инсульты, когнитивные расстройства), нарушения сердечного ритма, сердечная недостаточность и легочная гипертензия [8–10].

Ведущее значение в возникновении СОАС придается АГ. По данным эпидемиологического исследования, взаимосвязь АГ и СОАС не зависит от влияния других факторов, но связана с высоким риском развития инсульта и внезапной смерти [11]. При изучении результатов Wisconsin Sleep Cohort Study у 709 включенных в это исследование за 4 года наблюдения отмечена статистически достоверная связь между СОАС и АГ, которая была независима от таких сопутствующих факторов, как индекс массы тела (ИМТ), окружность талии и бедер, возраст, пол, употребление алкоголя, курение. Отношение шансов развития АГ в группе наблюдения с индексом апноэ/гипопноэ (ИАГ) 0,1–4,9 в час составило 1,42; с ИАГ 5,0–14,9 в час – 2,03 и с ИАГ 15 и более в час – 2,89. Полученные в исследовании данные позволили авторам рассматривать СОАС как фактор риска развития АГ и других сердечно-сосудистых заболеваний в общей популяции [12].

Высокая распространенность нарушений дыхания во время сна у лиц с АГ, по данным разных авторов, составляет 22–48%, а частота выявления АГ у пациентов с апноэ во время сна достигает 50% [13].

Распространенность СОАС относительно высокая и в других группах пациентов с сердечно-сосудистой патологией: у 20% больных с инфарктом миокарда, ишемической болезнью сердца (ИБС), инсультом, психоневрологическими нарушениями и у 13% больных с застойной сердечной недостаточностью, желудочковыми аритмиями [14–18].

Впервые связь между СОАС и АГ упоминалась в 1972 г. [19]. В 1993 г. была опубликована работа, в которой авторы поставили вопрос о существовании такой связи [20]. В многоцентровом исследовании Sleep Heart Health Study, по данным наблюдений, более чем за 6 тыс. пациентов среднего и пожилого возраста, обнаружена статистически значимая корреляция между нарушениями дыхания во сне и АГ, частично связанная с ИМТ. Статистическая достоверность сохранялась и при сравнении отношения шансов для АГ между группами пациентов с тяжелой степенью СОАС (ИАГ > 30) и без нарушений дыхания во сне (ИАГ < 1,5) оно составила 1,37, независимо от демографических и антропометрических переменных, включая ИМТ, окружность шеи, отношение величин окружностей талии и бедер, употребление алкоголя и курение [21]. Некоторые авторы считают, что СОАС можно рассматривать как возможную причину возникновения АГ [22, 23]. Обсуждается связь эффекта лечения СОАС с нормализацией показателей артериального давления (АД) у лиц с мягкой и умеренной АГ, что рассматривается как вклад СОАС в развитие АГ [24]. При ретроспективном анализе данных 180 клинических испытаний (с 1995 по 2002 г.) у пациентов с СОАС и АГ проводили оценку результатов долгосрочного применения СРАР (терапия постоянным положительным давлением в конце выдоха) на протяжении 12,1 ± 2,4 мес, которая показала достоверное снижение как систолического, так и диастолического АД до значений, существенно снижающих сердечно-сосудистый риск [25].

Этиологическую связь СОАС с АГ, ИБС и застойной сердечной недостаточностью (ЗСН) видят в повышении симпатической активности и десатура-

ции [14, 26–28], нарушении зависимой от эндотелия вазодилатации [29–31]; увеличении периферического сосудистого сопротивления [32, 33], повышении отрицательного внутригрудного давления и понижении чувствительности хеморецепторов к углекислому газу (см. рисунок) [16].

При анализе сердечно-сосудистых функций у больных с СОАС отмечаются выраженные гемодинамические нарушения: повышение частоты сердечных сокращений, сердечного выброса и АД во время сна. Существенный вклад в нарушения гемодинамики вносят отрицательное внутригрудное давление (ниже 75 мм рт. ст.), гипоксия и пробуждения, связанные с апноэ и гипопноэ.

Подъем АД у пациентов с СОАС происходит в пределах 5–7 с после эпизода апноэ и совпадает с активацией коры головного мозга, пиком вентиляции и снижением насыщения артериальной крови кислородом. В исходе эпизода апноэ гипервентиляция индуцирует повышение венозного возврата и повышение периферической вазоконстрикции.

У пациентов с СОАС при функциональных и лабораторных исследованиях выявлены системная и легочная гипертензия [34, 35], увеличение нагрузки на левый желудочек [36], снижение фибринолитической активности крови [37] и нарушение вентиляции [38, 39].

Изучая вклад СОАС в развитие дневной АГ, многие авторы отмечали повышение активности симпатической нервной системы (СНС) во время сна с последующим повышением концентрации норадреналина в плазме крови, наряду с пониженной чувствительностью барорецепторов сосудистой стенки к изменениям АД [16, 40–44]. Было отмечено, что у лиц с СОАС повышение активности СНС и снижение барорецепторной чувствительности связаны с хеморефлекторной активацией по причине гиперкапнии, гипоксии при апноэ и не зависят от влияния фактора ожирения [28].

Однако не у всех пациентов с СОАС и гиперактивацией СНС в дневное время наблюдали высокий уровень АД в течение дня. В ряде исследований [45–47] показано, что несмотря на высокий уровень циркулирующих катехоламинов (норадреналина и адреналина) у многих пациентов с СОАС дневной АД не повышается.

В развитии АГ, по мнению некоторых исследователей, кроме дисфункции системы автономного

**Таблица 1. Функции эндотелия**

**ЗФ:**

- поддержание сосудистого тонуса и структуры (вазодилаторы/вазоконстрикторы)
- регуляция роста сосудистых клеток (промоутеры/ингибиторы роста)
- регуляция тромботических и фибринолитических свойств (про-/антиагреганты)
- опосредование воспалительных и иммунных механизмов (в т.ч. регуляция адгезии лейкоцитов и тромбоцитов, выработка про-/противовоспалительных факторов, моделирование окисления липидов, регуляция сосудистой проницаемости)

**Таблица 2. Вазоактивные вещества, выделяемые эндотелием (по С. Pepine, 1997)**

**Вазоактивные вещества, выделяемые эндотелием:**

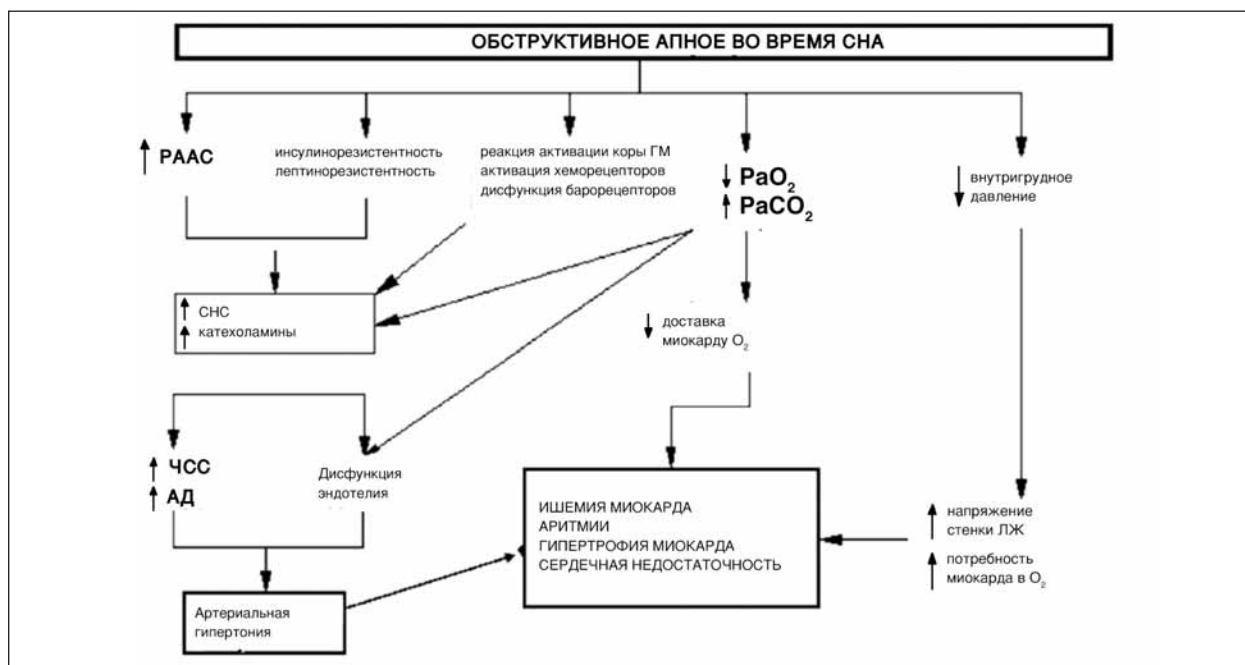
*вещества, расслабляющие гладкомышечные клетки сосудов:*

- продуцируемый эндотелием гиперполяризующий фактор (EDHF);
- простаглицлин, брадикинин, ацетилхолин, серотонин, гистамин, субстанция P, натрийуретический пептид типа C, адреномедулин;
- продуцируемый эндотелием расслабляющий фактор (EDRF).

*вазоконстрикторные вещества, выделяемые эндотелием:*

- эндотелин-1, ангиотензин II, тромбоспан А2, арахидоновая кислота, простагландины H2 и G2, тромбин, супероксид-анион (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) и др.





контроля, могут быть также вовлечены зависимые от эндотелия системы регуляции сосудистого тонуса [48], в особенности дисфункция системы релаксации сосудистой стенки, регулируемой оксидом азота (NO), продуцируемым эндотелием.

Представления об эндотелии как о статическом монослое клеток, являющимся полупроницаемым барьером между кровотоком и тканями, в настоящее время существенно изменились: эндотелий рассматривается как метаболически активная структура в поддержании гомеостаза между клеточной адгезией, миграцией, клеточной пролиферацией, тромбозом и фибринолизом [49–51] и как регулятор релаксации артериальных гладких мышц [52] (табл. 1, 2).

Дисфункция эндотелия характеризуется нарушенной зависимой от него релаксацией сосудов (способностью расширяться и обеспечивать увеличение кровотока) и повышенной адгезивностью (способностью привлекать элементы крови) эндотелиальной выстилки сосуда [51]. Считается, что обе характеристики дисфункции эндотелия (нарушенная вазодилатация и повышенная адгезивность) во многом обусловлены уменьшенным действием (снижением биологической активности) основного вазодилатора, выделяемого клетками эндотелия – эндотелиального расслабляющего фактора (EDRF), т.е. NO [52]. Другими словами, нарушение функции эндотелия представляет собой ослабление вазомоторного ответа на вазоактивные стимулы и является независимым маркером риска развития сердечно-сосудистых осложнений.

В связи с этим нельзя исключить, что общность патогенетических механизмов, наиболее значимым из которых многие исследователи считают эндотелиальную дисфункцию, лежит в основе тесной взаимосвязи АГ и СОАС.

Данные о снижении циркуляции NO в периферической крови и повышении периферической сосудистой резистентности у пациентов с СОАС ограничены. Существуют сведения о повышении периферического сосудистого сопротивления (ПСС) у пациентов с СОАС: при плетизмографии было показано, что эпизоды апноэ и гипопноэ значительно коррелировали с повышением ПСС в условиях стандартного полисомнографического исследования

[43]. Авторы пришли к выводу, что число эпизодов повышения ПСС, отмеченное в ночное время, может быть использовано в качестве показателя выраженности синдрома, как и ИАГ. Ухудшение функции вазодилатации в дневное время (по данным плетизмографии) значимо ассоциировалось с эпизодами нарушений дыхания во время сна [29, 32, 54]. Сообщалось об увеличении концентрации в крови в ночное время мощного вазоконстриктора эндотелина-1 у пациентов с СОАС, что значимо коррелировало с показателями среднего АД [55]. Известно и о значимом снижении концентрации NO в плазме крови у пациентов с АГ по сравнению с его концентрацией у здоровых лиц [56, 57].

При анализе данных исследования Sleep Heart Health/Cardiovascular Health Study в возрастной группе старше 68 лет отмечены статистически достоверные корреляции между тяжестью СОАС (оцененной по ИАГ и индексу гипоксемии) и приростом (в %) диаметра плечевой артерии в пробе с реактивной гиперемией. Хотя данные корреляции ослабли после учета других факторов риска, статистическая достоверность сохранялась даже при учете ИМТ [58]. Было высказано предположение о том, что снижение зависимой от потока вазодилатации обусловлено не только дисфункцией эндотелия, но и повышением активности симпатической нервной системы [59]. При обследовании пациентов детского возраста с первичным храпом, т.е. менее чем с одним эпизодом апноэ/гипопноэ за 1 ч, по скорости пульсовой волны оценивали артериальную эластичность. По данным многофакторного регрессионного анализа, первичный храп был определен как единственно значимый фактор для повышения скорости пульсовой волны, а следовательно, и снижения сосудистой эластичности. Исследователи сочли, что сосудистая дисфункция связана со многими механизмами нарушений дыхания во время сна, включающихся в этой системе и приводящих от первичного храпа к СОАС [60].

Снижение в плазме крови уровня NO у пациентов с СОАС устранялось с помощью применения CPAP [61, 62], причем влияние этой терапии, приводившей к снижению повышенного уровня АД, связывают с улучшением эндотелиальной функции [62]. При на-

блюдении за небольшой группой пациентов с СОАС без сопутствующих ССЗ были достоверно отмечены значимо более низкие значения зависимой от потока вазодилатации по сравнению с таковой в контрольной группе в ответ на введение ацетилхолина и практически сопоставимые значения при пробе с натрия нитропруссидом (экзогенный донор NO) и верапамилом [63]. У пациентов с СОАС выявлено и повышение концентрации в крови эндогенных вазоактивных субстанций, вызывающих вазоконстрикцию (эндотелина), т.е. дисбаланс эндотелиального синтеза вазодилататоров и вазоконстрикторов. Повышение синтеза эндотелина, по-видимому, в ответ на гипоксемию вносит немаловажный вклад в длительную вазоконстрикцию. Приблизительно после 4 ч нарушения дыхания во время сна отмечено повышение как уровня эндотелина в крови, так и АД [55]. Применение СРАР-терапии значительно снижает уровни эндотелина и АД в течение нескольких часов.

У пациентов с СОАС отмечено также повышение уровней и иммунновоспалительных маркеров эндотелиальной функции – С-реактивного белка [64], сывороточного амилоида [65] и нейтрофилов [66], что патофизиологически может быть связано с нарушениями дыхания во сне и гипоксемией [66, 67]. Кроме того, есть данные, свидетельствующие о роли оксидативного стресса и повышения уровня растворимых молекул адгезии в развитии СОАС [68]. Воспалительные механизмы играют важную роль в возникновении и развитии ССЗ [69] и являются значимыми медиаторами в развитии эндотелиальной дисфункции (ЭД) у больных с СОАС.

ЭД у пациентов с СОАС носит многофакторный характер. Гипоксия, гиперкапния с последующей активацией СНС и подъемами АД, сопровождающимися обструктивное апноэ, могут служить мощными стимулами для выделения вазоактивных медиаторов, ухудшающих функцию эндотелия. Однако и у пациентов с изолированным СОАС (без сопутствующих ССЗ) также имеется нарушение эндотелиальной функции, сопоставимое с изменениями при АГ, гиперлипидемии, сахарном диабете, курении и ожирении [63]. Отмечалось и независимое от ожирения развитие ЭД у пациентов с СОАС [70]. В то время как коморбидные с СОАС состояния могут привести к ЭД, сам СОАС можно рассматривать как независимый ФР нарушения функции эндотелия и как следствие АГ. Существует возможность терапевтического воздействия на важный патогенетический механизм развития сердечно-сосудистых осложнений – ЭД путем коррекции нарушений дыхания во время сна с помощью СРАР. Однако эффективность этой терапии напрямую может быть связана с длительностью ее воздействия [71].

Таким образом, можно говорить о неоднозначности существующих данных о многофакторности развития ЭД у пациентов с СОАС и АГ, что требует комплексной глубокой оценки имеющихся данных и проведения масштабных, хорошо спланированных исследований.

#### Литература

- Grote L, Schneider H. *Schlafapnoe und kardiovaskuläre Erkrankungen*. Thieme Verlag, 1996.
- Young T, Dempsey J, Skatrud J et al. The occurrence of sleep-disordered breathing among middle-aged adults. *New Engl J Med* 1993; 328 (17): 1230–5.
- Skomro RP, and Kryger MH. Clinical presentations of obstructive sleep apnea syndrome. *Prog Cardiovasc Dis* 1999; 41 (5): 331–40.

- Young T, Finn L, Palta M. Estimation of the clinically diagnosed proportion of sleep apnea syndrome in middle-aged men and women. *Sleep* 1997; 20 (9): 705–6.
- Guilleminault C, Dement WC. *Sleep apnea syndromes and related sleep disorders. Sleep disorders: Diagnosis and treatment*. (Eds.). Wiley 1978.
- Lavie P. Incidence of sleep apnea in a presumably healthy working population: A significant relationship with excessive daytime sleepiness. *Sleep* 1983; 6: 312–8.
- Peter JH, Fuchs E, Koebler U, et al. Studies in the prevalence of sleep apnea activity: Evaluation of ambulatory screening results. *Eur J Respir Dis* 1986; 146: 451–8.
- Olson LJ, Somers VK. Modulation of Cardiovascular Risk Factors by Obstructive Sleep Apnea. *Chest* 2006; 129: 218–20.
- Meyer JS, Ishikawa Y, Hata T et al. Cerebral blood flow in normal and abnormal sleep and dreaming. *Brain Cogn* 1987; 6: 266–94.
- ICSD-International Classification of Sleep Disorders: Diagnostic and Coding Manual. American Sleep Disorders Association. Allen Press 1990.
- Peppard PE, Young T, Palta M et al. Longitudinal study of moderate weight change and sleep disordered breathing. *JAMA* 2000; 282: 3015–21.
- Peppard PE, Young T, Palta M et al. Prospective Study of the Association between Sleep-Disordered Breathing and Hypertension. *N Engl J Med* 1999; 342: 1378–84.
- Ringler J, Basner RC, Shannon R et al. Hypoxemia alone does not explain blood pressure elevations after obstructive apneas. *J Appl Physiol* 1990; 69 (6): 2143–8.
- Brooks D, Kozar L, Render-Telzebra C et al. Obstructive sleep apnea as a cause of systemic hypertension. *J Clin Investigat* 1997; 99 (1): 106–9.
- Hla KM, Bidwell T, Palta M et al. Sleep apnea and hypertension: a population based study. *Ann Int Med* 1994; 120: 382–8.
- Hall MJ, Bradley TD. Cardiovascular disease and sleep apnea. *Curr Opin Pulm Med* 1995; 1 (6): 512–8.
- Naughton M. Heart failure and obstructive apnea. *Sleep Med Rev* 1998; 2 (2): 93–103.
- Schäfer H, Koebler U, Ploch T. Sleep-related myocardial ischemia and sleep structure in patients with obstructive sleep apnea and coronary heart disease. *Chest* 1997; 111 (2): 387–9.
- Cocagna G, Mantovani M, Brignani E, et al. Continuous recording of the pulmonary and systemic arterial pressure during sleep in syndromes of hypersomnia with periodic breathing. *Bull Eur Physiopathol Res* 1972; 8: 1159–72.
- Carlson J, Davies R, Eblenz K et al. Obstructive sleep apnea and blood pressure elevation. What is the relationship? *Blood Pressure* 1993; 2: 166–82.
- Nieto FG, Young T. Association of sleep disorders breathing, sleep apnea and hypertension in a large community-based study. *JAMA* 2000; 283 (14): 1829–36.
- Brooks EA. clinical study of the effects of sleep and rest on blood pressure. *Arch Intern Med* 1912; 97–102.
- O'Donnell CP, Schwartz AR, Smith PI et al. Reflex modulation of renal sympathetic nerve activity in response to apnea. *Am J Respir Critical Care Med* 1996; 153 (4): 406.
- Mayer J, Becker H, Brandenburg U et al. Blood pressure and sleep apnea: results of long-term nasal continuous positive airway pressure therapy. Department of Medicine, Philipps-Universität, Marburg, FRG 1999.
- Dbillon S, Chung T, Fargher N et al. Sleep Apnea, Hypertension, and the Effects of Continuous Positive Airway Pressure. *Am J Hypertens* 2005; 18 (5): 594–600.
- Narkiewicz K, Somers VK. The sympathetic nervous system and obstructive sleep apnea: implications for hypertension. *J Hypertens* 1997; 15 (12): 1613–9.
- Silverberg DS, Oksenberg A. Essential hypertension and abnormal upper airway resistance during sleep. *Sleep* 1997; 20 (9): 794–806.
- Narkiewicz K, van de Borne PJ, Montano N et al. Contribution of tonic chemoreflex activation to sympathetic activation and blood pressure in patients with obstructive sleep apnea. *Circulation* 1998; 97: 943–5.
- Carlson JT, Rangemark C. Attenuated endothelium-dependent vascular relaxation in patients with sleep apnea. *J Hypertens* 1996; 14 (5): 577–84.
- Hedner J. Vascular function in OSA. *Sleep* 1996; 19 (10): 213–7.
- Saarelainen S, Seppala E. Circulating endothelin-1 in obstructive sleep apnea. *Endothelium* 1997; 5 (2): 115–8.

32. Remsburg S, Launois SH. Patients with obstructive sleep apnea have an abnormal peripheral vascular response to hypoxia. *J Appl Physiol* 1999; 87 (3): 1148.
33. Schnall RP, Sblitner A. Periodic, profound peripheral vasoconstriction—a new marker of obstructive sleep apnea. *Sleep* 1999; 22 (7): 939–46.
34. Haurylkiewicz I, Cieslicki J. Pulmonary circulation at rest and during exercise in patients with obstructive sleep apnea before and after one year of treatment with CPAP. *Pneumonol Alergol Pol* 1996; 64 (9–10): 638–43.
35. Schafer H, Eblenz K. Atrial natriuretic peptide levels and pulmonary artery pressure awake, at exercise and asleep in obstructive sleep apnea syndrome. *J Sleep Res* 1999; 8 (3): 205–10.
36. Levy PA, Guilleminault C. Changes in left ventricular ejection fraction during REM sleep and exercise in chronic obstructive pulmonary disease and sleep apnea syndrome. *Eur Respir J* 1991; 4 (3): 347–52.
37. Rangemark C, Hedner JA. Platelet function and fibrinolytic activity in hypertensive and normotensive sleep apnea patients. *Sleep* 1995; 18 (3): 188–94.
38. Bittencourt LR, Moura SM. Assessment of ventilatory neuromuscular drive in patients with obstructive sleep apnea. *Braz J Med Biol Res* 1998; 31 (4): 505–13.
39. Greenberg HE, Scharf SM. Depressed ventilatory load compensation in sleep apnea. Reversal by nasal CPAP. *Am Rev Respir Dis* 1993; 148 (6): 1610–5.
40. Shepard JW. Hypertension, cardiac arrhythmias, myocardial infarction, and stroke in relation to obstructive sleep apnea. *Clin Chest Med* 1992; 13 (3): 437–58.
41. Morgan BJ. Acute and chronic cardiovascular responses to sleep disordered breathing. *Sleep* 1996; 19 (10): 206–9.
42. Zwillich CW. Obstructive sleep apnea causes transient and sustained systemic hypertension. *Int J Clin Pract* 1999; 53 (4): 301–5.
43. Fletcher EC. Effect of episodic hypoxia on sympathetic activity and blood pressure. *Res Physiol* 2000; 119 (2–3): 189–97.
44. Garcia-Rio F, Racionero MA. Sleep apnea and hypertension. *Chest* 2000; 117 (5): 1417–25.
45. Lapinski M, Przybylowski T. Diurnal blood pressure rhythm and urinary catecholamine excretion in obstructive sleep apnea and essential hypertension. *J Hypertens* 1993; 11 (5): 292–3.
46. Marrone O, Riccobono L. Catecholamines and blood pressure in obstructive sleep apnea syndrome. *Chest* 1993; 103: 722–7.
47. Hedner J, Darpo B. Reduction in sympathetic activity after long-term CPAP treatment in sleep apnea: cardiovascular implications. *Eur Res J* 1995; 8: 222–9.
48. Hedner J. Vascular function in OSA. *Sleep* 1996; 19 (10): 213–7.
49. Cooke JP. The endothelium: a new target for therapy. *Vasc Med* 2000; 5: 49–53.
50. Малая Л.Т. и др. Эндотелиальная дисфункция при патологии сердечно-сосудистой системы, 2000.
51. Иванова О.В., Соболева Г.Н., Карнов Ю.А. Эндотелиальная дисфункция – важный этап развития атеросклеротического поражения сосудов. *Тер. арх.* 1997; 6: 75–8.
52. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of the arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 299: 373–6.
53. Schnall RP, Sblitner A. Periodic, profound peripheral vasoconstriction—a new marker of obstructive sleep apnea. *Sleep* 1999; 22 (7): 939–46.
54. Guilleminault C, Robinson A. Sleep-disordered breathing and hypertension: past lessons, future directions. *Sleep* 1997; 20 (9): 806–11.
55. Phillips BG, Narkiewicz K, Pesek CA, et al. Effects of obstructive sleep apnea on endothelin-1 and blood pressure. *J Hypertens* 1999; 17: 61–8.
56. Hisbikawa K, Nakaki T. Role of L-arginine-nitric oxide pathway in hypertension. *J Hypertens* 1993; 11 (6): 639–45.
57. Kelly JJ, Tam SH. The nitric oxide system and cortisol-induced hypertension in humans. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1998; 25 (11): 945–6.
58. Nieto F, Herrington DM. Susan redline sleep apnea and markers of vascular endothelial function in a large community sample of older adults. *Am J Res Crit Care Med* 2004; 169: 354–60.
59. Imadojemu VA. Impaired vasodilator responses in obstructive sleep apnea are improved with continuous positive airway pressure therapy. *Am J Res Crit Care Med* 2002; 165 (7): 950–3.
60. Daniel K, Kwok Ka-Li, Herrington D et al. Endothelial Dysfunction and Sleep Apnea. *Am J Res Crit Care Med* 2004; 15.
61. Schulz R, Schmidt D, Blum A et al. Decreased plasma levels of nitric oxide derivatives in obstructive sleep apnoea: a response to CPAP therapy. *Thorax* 2000; 55: 1046–51.
62. Ip MS, Lam B, Chan LY et al. Circulating nitric oxide is suppressed in obstructive sleep apnea and is reversed by nasal continuous positive airway pressure. *Am J Res Crit Care Med* 2000; 162: 2166–71.
63. Masabiko K, Roberts-Thomson P, Bradley G et al. Impairment of endothelium-dependent vasodilation of resistance vessels in patients with obstructive sleep apnea. *Circulation* 2000; 102: 2607.
64. Shamsuzzaman AS, Wimmicki M, Lanfranchi P et al. Elevated C-reactive protein in patients with obstructive sleep apnea. *Circulation* 2002; 105: 2462–4.
65. Svatikova A, Wolk R, Shamsuzzaman AS et al. Serum amyloid A in obstructive sleep apnea. *Circulation* 2003; 108: 1451–4.
66. Tamura DY, Moore EE, Partrick DA et al. Acute hypoxemia in humans enhances the neutrophil inflammatory response. *Shock* 2002; 17: 269–73.
67. Meier-Ewert HK, Ridker PM, Rifai N et al. Effect of sleep loss on C-reactive protein, an inflammatory marker of cardiovascular risk. *J Am Coll Cardiol* 2004; 43: 678–83.
68. Dyugovskaya L, Lavie P, Lavie L. Increased adhesion molecules expression and production of reactive oxygen species in leukocytes of sleep apnea patients. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165: 934–93.
69. Ridker PM. Clinical application of C-reactive protein for cardiovascular disease detection and prevention. *Circulation* 2003; 107: 363.
70. Wolk R, Abu SM, Virend K. Somers obesity, sleep apnea, and hypertension. *Hypertension* 2003; 42: 1067–74.
71. Ip MS, Tse HF, Lam B et al. Endothelial function in obstructive sleep apnea and response to treatment. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 169 (3): 348–53.

\* —————

Е.И. Чазов

## Кардиология: ее официальное признание в Советском Союзе

*E.I. Chazov*

*Cardiology: official recognition in the Soviet Union*

На различных пресс-конференциях как на Родине, так и за рубежом, особенно в период нашего активного сотрудничества с американскими коллегами в 1960–80-е годы, мне не раз задавали вопрос о том, когда и как зарождалась и оформлялась кардиология в нашей стране. В США, Германии или Франции невозможно было дать ответ общего характера, сославшись, например, на афоризм известного французского поэта Поля Валерии: "В будущее мы входим, оглядываясь на прошлое". Но я, действительно, не знал как отвечать.

За рубежом даже медицинская общественность в 1950–60-е годы не имела представления о том, что собой представляет не только наша кардиология, но и, вообще, медицина. Большинству ничто не говорили фамилии Коротков, Аничков, Образцов, Стражеско. После того, как рухнул "железный занавес", страну стали активно посещать иностранные ученые и специалисты, в том числе медицинского профиля. По просьбе А.Л.Мясникова мне приходилось их знакомить с Институтом терапии.

Во время одного из посещений лаборатории группа американских кардиологов, заинтересовавшихся моими работами в области инфаркта миокарда, упорно утверждала приоритет американского врача J. Heggick в первом описании инфаркта миокарда, сделанном им в 1912 г. И это было общим мнением врачей Запада. Нам потребовалось 10 лет, чтобы восстановить справедливость. В 1976 г. в Кардиологическом центре по советско-американскому соглашению о сотрудничестве в области медицины работал сотрудник профессора Е.Браунвальда доктор J. Muller из Бостона. Задача состояла в изучении возможности гиалуронидазы влиять на течение инфаркта миокарда. Естественно, он знакомился с нашей отечественной литературой и на основании документальных данных убедился в том, что первые описания клинической и патолого-анатомической картины инфаркта миокарда принадлежат В.П.Образцову и Н.Д.Стражеско. В августе 1977 г. в журнале "American Journal of Cardiology" появилась его статья, утвердившая наш приоритет.

Какое же событие в медицине следует считать зарождением отечественной кардиологии? На это может претендовать создание Н.С.Коротковым звукового метода измерения артериального давления, о котором он сообщил 7 ноября 1905 г. в Медико-хирургической академии в Петербурге. Теоретики и клиницисты, разрабатывающие проблему атеросклероза, будут отстаивать мнение о том, что по значимости и вкладу в мировую медицинскую науку работы Н.Н.Аничкова, опубликованные в 1910–1912 гг., определили формирование кардиологического направления в отечественной медицине и развертывании научных исследований в области кардиологии. Патриарх кардиологии, первый президент Международного общества кардиологов, организатором которого он был, Поль Уайт, большой друг А.Л.Мясникова и нашего Кардиоло-

гического центра, связывал начало российской кардиологии с работами одного из основоположников электрофизиологии А.Ф.Самойлова. Несколько лет А.Ф.Самойлов проработал в Бостоне, где читал лекции и продолжал свои исследования.

В 1964 г., когда мы с А.Л.Мясниковым в рамках сотрудничества находились в США, П.Уайт категорически настоял на том, чтобы мы во время пребывания в Бостоне остановились в его доме. Это были для меня, молодого врача и начинающего ученого, незабываемые дни. Прекрасный общительный и добрый человек, замечательный врач, лечивший президента США Д.Эйзенхауэра в связи с инфарктом миокарда, эрудированный ученый П.Уайт для меня навсегда остался в памяти как представитель того поколения американских врачей, которые еще не стремились к большим гонорарам и которые служили больным согласно клятве Гиппократова. Он с восторгом говорил об А.Ф.Самойлове, с которым работал молодым врачом, о его прекрасных трудах, способствовавших не только развитию электрофизиологии, но и практической электрокардиографии. Когда А.Ф.Самойлов вернулся в Казань, он продолжал поддерживать контакты с П.Уайтом. После смерти А.Ф.Самойлова П.Уайт опубликовал в "Казанском медицинском журнале" (1931 г., №4–5) большую статью, посвященную памяти, как он писал, "не только личного друга, но и полезного соратника".

Можно долго перечислять имена выдающихся терапевтов, хирургов, создававших основы кардиологии в нашей стране, – Г.Ф.Ланг, Д.Д.Плетнев, А.Л.Мясников, В.Ф.Зеленин и др. Но хотя понятия "кардиология", "кардиолог" появились в медицинском обиходе еще в 1940-е годы, формально они были приняты в 1960–70-е годы, о чем я и хотел бы рассказать в этой статье.

Вероятно, надо начать с создания журнала "Кардиология", первый номер которого вышел в свет в конце февраля 1961 г. Несомненно, что его появление было приметой времени: проблемы кардиологии стали широко обсуждаться не только в терапевтическом обществе, но и в среде хирургов, начавших все активнее, по примеру зарубежных коллег, проводить операции на сердце. Но как всегда бывает при таких событиях, остаются "за кулисами" невидимые широким кругам личностные, да и просто случайные факторы.

Журнал "Кардиология" в значительной степени был научно-организационной амбициозностью моего учителя А.Л.Мясникова, который, в отличие от своих конкурентов – В.Н.Виноградова (главный редактор журнала "Терапевтический архив"), В.Х.Василенко (главный редактор журнала "Клиническая медицина"), Е.М.Тареева (главный редактор журнала "Советская медицина"), не имел "своего" журнала. Большую роль сыграл и его друг П.Уайт, который убеждал Александра Леонидовича создать в Советском Союзе кардиологический журнал и общество кардиологов. Именно его письмо, которое

А.Л.Мясников приложил к своему обращению в Министерство здравоохранения СССР, сыграло важную роль в создании журнала "Кардиология". Талантливый, эрудированный ученый А.Л.Мясников был неважным организатором, но четко представлял значимость тех или иных работ для науки и клиники, которые должны были украшать журнал и привлекать к нему читателей.

В сентябре 1960 г. в Риме состоялся III Европейский конгресс кардиологов, на котором впервые выступали представители Советского Союза. Большим успехом пользовался доклад А.Л.Мясникова, в котором сообщалось и о наших исследованиях причин возникновения коронарного тромбоза и были представлены механизмы самопроизвольной реканализации тромбов в коронарных сосудах. Эмоциональный, всегда интуитивно понимавший значимость новых клинических или теоретических данных, Александр Леонидович после возвращения из Рима пригласил нескольких своих сотрудников и заявил: "Сейчас самое интересное и самое важное для клиники – это все, что касается инфаркта миокарда. Первый номер "Кардиологии" должен быть посвящен именно этой проблеме, здесь мы не только не отстаем, но и в целом ряде вопросов являемся лидерами. Это надо сохранять".

Так, в первом номере журнала, наряду с материалами таких корифеев советской медицины, как А.Л.Мясников, Б.В.Петровский, А.Н.Бакулев, В.В.Закусов, появилась статья кандидата медицинских наук Е.И.Чазова и патологоанатома Ю.Г.Тинякова "О некоторых защитных механизмах, предупреждающих коронарный тромбоз в условиях здорового организма". Вскоре журнал "Кардиология", отличавшийся высоким уровнем публикуемого материала, стал одним из ведущих медицинских изданий. Однако самым главным является то, что впервые официально (так как его учредителем было Министерство здравоохранения) кардиология была признана одной из важнейших областей медицинских знаний и медицинской практики.

Все чаще и чаще вопросы борьбы с сердечно-сосудистыми заболеваниями обсуждались на заседаниях терапевтического и хирургического научных обществах, на съездах и конференциях. Расширялись связи советских ученых и врачей с кардиологами и ведущими зарубежными специалистами. Проблемы сердечно-сосудистых заболеваний, с учетом их распространенности и тяжелых последствий, становились общегосударственными. Сложилась благоприятная обстановка для создания в СССР общества кардиологов. А.Л.Мясников обратился к министру здравоохранения С.В. Курашову с письмом, в котором обосновал необходимость создания в нашей стране научного общества кардиологов.

Это обращение было также спровоцировано П.Уайтом, который не скрывал, что его настойчивое стремление создать в нашей стране кардиологическое общество объясняется не только дружеской поддержкой А.Л.Мясникова, которого он считал не только выдающимся кардиологом, но и своим другом, а также тем, что для него как создателя Международного общества кардиологов было важно, чтобы в него вошли представители сверхдержавы, еще недавно бывшей *terra incognita*. Интернационалист П.Уайт, считал, что медицина не знает границ и необходимо, чтобы профессионалы объединялись, независимо от национальности, религиозной или партийной принадлежности. Он был первым представителем американской медицины, который посетил Советский Союз после смерти И.Сталина. Необходимость создать наше кардиоло-

гическое общество в сжатые сроки он объяснял тем, что очередной съезд Международного общества кардиологов должен был пройти в 1966 г., иначе официального признания пришлось бы ждать еще 4 года (съезды тогда проходили раз в 4 года).

Следует отдать должное тем временам: тогда решение вопросов не затягивалось на месяцы. Вскоре появилось соответствующее решение, которое предусматривало создание организационного комитета учредительной кардиологической конференции во главе с академиком АМН СССР профессором А.Л.Мясниковым. Не знаю, чем руководствовался Александр Леонидович, предложив провести учредительную конференцию в Ленинграде. Официально он заявил, что Петербург, Ленинград, был колыбелью кардиологии в нашей стране, так как в этом городе работали И.П.Павлов, А.А.Коротков, Г.Ф.Ланг и продолжал трудиться Н.Н.Аничков. Однако в разговоре со мной он с грустью признался, что Ленинград – это его *alma mater*: в этом городе он сформировался как врач и ученый, там прошли лучшие годы его жизни и именно в Ленинграде он хочет оставить память о себе, как о создателе общества кардиологов.

Организацией конференции занималась Военно-медицинская академия, в частности ученик А.Л.Мясникова профессор З.М.Вольнский и сотрудники его кафедры А.П.Голиков, Е.Е.Гогин, М.К.Минушкин и др. Наконец настал долгожданный день 1 февраля 1963 г., когда в Ленинграде в тесном и неудобном конференц-зале Военно-медицинского музея открылась учредительная кардиологическая конференция, во время которой 274 делегатам из всех республик и регионов страны предстояло создать Общество кардиологов Советского Союза.

Научная часть конференции, предложенная А.Л.Мясниковым, была посвящена проблеме инфаркта миокарда. Она открылась докладом А.Л.Мясникова "Патогенез инфаркта миокарда", в котором он, как всегда с блеском, обобщил результаты работ, проведенных в Институте терапии, касающихся механизмов возникновения инфаркта миокарда: исследования А.В.Трубецкого и Е.Б.Новиковой, И.К.Шхвацабая – о роли центральной и вегетативной нервной системы, симпатико-адреналовой реакции; А.П.Зыско – о роли катехоламинов в этом процессе; Е.И.Чазова, Л.Ф.Николаевой и Т.Н.Кожевниковой – о механизмах возникновения коронарного тромбоза; Н.Н.Кипшидзе – о роли физического напряжения и др.

Надо отметить, что хотя основной задачей конференции было создание кардиологического общества, ее научная составляющая была важна и интересна для разработки стратегии борьбы с инфарктом миокарда. Доклады В.Н.Виноградова и В.Г.Попова о зависимости эффекта терапии осложнений инфаркта миокарда от времени начала лечения, П.Е.Лукомского о поиске новых (в частности биохимических) маркеров развивающегося инфаркта миокарда, А.Н.Бакулева о разработке методов хирургического лечения ишемической болезни сердца, Б.В.Петровского об аневризме сердца, наше сообщение о тромболитической терапии, данные Ю.С.Петросяна и Л.С.Зингермана о возможностях коронарографии не только определили пути поиска и внедрения новых методов диагностики и лечения инфаркта миокарда, но и во многом помогли разработать эффективную систему лечения больных с этой патологией.

Второй день работы конференции был посвящен организационным вопросам. Это было одно из самых напряженных заседаний в моей жизни.

По традиции председатель оргкомитета любой учредительной конференции избирается первым руководителем создающейся общественной организации. Большинство делегатов не сомневались, что председателем кардиологического общества будет избран лидер отечественных кардиологов академик АМН СССР А.Л.Мясников. Лишь небольшой группе посвященных было известно, что Министерство здравоохранения и другие властные структуры, включая аппарат ЦК КПСС, выдвинули другую кандидатуру – члена-корреспондента АМН СССР профессора П.Е.Лукомского. Хороший врач, в прошлом главный терапевт Минздрава и Лечсанупра Кремля, профессор 2-го Московского медицинского института, активно занимавшийся проблемами сердечно-сосудистых заболеваний, не мог, конечно, соперничать с таким признанным международным кардиологическим сообществом лидером кардиологии, как Александр Леонидович. Лишь в одном Павел Евгеньевич превосходил Александра Леонидовича – он был членом Коммунистической партии. Но, конечно, не это решило вопрос о руководстве обществом. Надо было знать Александра Леонидовича, в котором талант ученого сочетался с независимым и честным характером, своим "я" в принципиальных вопросах, которые вызывали раздражение у вышестоящих чиновников. Да и его жизненное кредо, заключавшееся в том, что его жизнь и поведение – это его личное дело, на фоне партийных стандартов было вызывающим.

Уже после смерти Александра Леонидовича в дружеской обстановке ректор 1-го Московского медицинского института В.В.Кованов рассказал мне историю, которая вывела из равновесия бывшего тогда министра С.В.Курашова. Александр Леонидович, в целом, неординарный талантливейший человек любил все красивое – живопись, классическую музыку и красивых женщин. У него не было глубоких романов. Его отношения с женщинами отличались благородством человека из интеллигентного прошлого. Обаятельный, импозантный мужчина, он любил появляться в театре, на художественных выставках с молодой красивой аспиранткой и ловить восторженные взгляды присутствующих. Его обаятельная красивая жена Инна Александровна, которую он, несомненно, любил и называл среди близких "моя Мэри Пикфорд", медицинская сестра, точная копия американской кинозвезды, благосклонно относилась к этим публичным выходам Мясникова. Однажды он оказался в сопровождении аспирантки в филармонии рядом с министром Курашовым и его женой. То ли внимание присутствовавших, как всегда, привлек Мясников с молодой красавицей, а не министр и его жена, то ли, действительно, жена министра была из провинциальных моралисток, но утром в кабинете В.В.Кованова раздался звонок, и возмущенный министр сообщил ректору об аморальном поведении профессора его института. В.В.Кованову ничего не оставалось, как пригласить Мясникова и передать разговор с Курашовым.

Мясникову кто-то из министерства уже рассказал о реакции министра и его разговоре с ректором. Эмоциональный, вспыльчивый Александр Леонидович с порога, не дав сказать Кованову ни слова, заявил: "Передайте Вашему министру, что это мое личное дело с кем ходить и куда ходить. И пусть он занимается лучше здравоохранением. Если Вам надо отчитаться перед ним, то я готов в любое время покинуть кафедру и целиком перейти в институт". (Институт терапии тогда находился в составе Академии медицинских наук.) Кованов, не

в интересах которого было лишиться одного из корифеев терапии, перевел разговор из эмоционального плана в дружеский, спокойно заявив: "Дорогой Александр Леонидович, если я узнаю, что Вы перестали ходить с красавицами в филармонию и театры, я просто спрошу: "Не пора ли Вам на пенсию?"

Этот случай передает отношение Минздрава к А.Л.Мясникову. Так, с 60-летием одного из выдающихся терапевтов страны от имени Минздрава юбиляра поздравлял мелкий чиновник – один из помощников министра. Однако нужен был какой-то прецедент, который бы объяснил выбор Минздравом кандидатуры П.Е.Лукомского. И здесь сыграл самый страшный и самый низкий человеческий фактор – зависть. По крайней мере, так оценивал среди ближайшего окружения сложившуюся ситуацию сам Александр Леонидович. В разгар подготовки конференции к министру пришли три профессора, среди которых был и руководитель IV Главного управления профессор А.М.Марков – человек, близкий Н.С.Хрущеву, и от имени общественности заявили, что нельзя А.Л.Мясникову, возглавляющему журнал "Кардиология" и Совет по сердечно-сосудистым заболеваниям АМН СССР, позволить монополизировать целую область медицины и рекомендовали для избрания П.Е.Лукомского. Предлагая эту кандидатуру, они практически были уверены, что А.Л.Мясников не будет выступать против, учитывая его дружеские отношения с П.Е.Лукомским и то, что его сын Леонид работает ассистентом на возглавляемой Лукомским кафедре. Такова была закулисная сторона учредительной конференции.

Однако вернемся в тесный, душный конференц-зал Военно-медицинского музея, в котором началось обсуждение организационных вопросов. Царила напряженная, гнетущая обстановка. У меня сложилось впечатление, что делегаты, узнав о предложении Минздрава, чувствовали себя неловко. Председательствовал известный ленинградский хирург П.А.Куприянов. После выступления И.А.Рывкина, сотрудника нашего Института терапии, рассказавшего об основаниях для создания общества кардиологов и его принципах, начались прения. Здесь Куприянов и представители Минздрава оказались в сложном положении. Слово попросил известный кардиолог профессор С.В.Шестаков из Куйбышева, который предложил, вопреки мнению Минздрава, выбрать председателем правления общества А.Л.Мясникова. Его выступление было аргументированным и резким. П.А.Куприянов явно растерялся. Он не знал, как реагировать на это предложение, и не нашел ничего лучшего, как заявить, что мнение Минздрава, согласованное с вышестоящими органами, следует учитывать прежде всего.

Мне, молодому кандидату наук, тогда впервые пришлось столкнуться с подобной ситуацией и увидеть, как вопреки своему мнению (не говорю уже о совести) многие делегаты, в кулуарах возмущавшиеся сложившейся ситуацией, публично поддержали предложение Минздрава избрать П.Е.Лукомского. Среди них были и бывшие ученики Александра Леонидовича. Я видел, как он переживал измену самых близких ему людей. Естественно, в этой обстановке он снял свою кандидатуру и предложил избрать Лукомского. Так был избран первый председатель правления Общества кардиологов.

П.Е.Лукомский понимал, что без поддержки мощного административного и финансового потенциала Института терапии, без тесной связи с А.Л.Мясниковым он не сможет организовать рабо-

ту общества, создать его ячейки на местах. Не знаю, согласовал ли он с А.Л.Мясниковым мою кандидатуру на пост генерального секретаря общества, но он ее предложил и попросил поддержать, несмотря на то что я, вместе с другим учеником Александра Леонидовича Н.Н.Кипшидзе, демонстративно воздержался при голосовании. Заседание закончилось избранием 78 членов правления. Формально не только Общество кардиологов, но и в целом кардиология была признана самостоятельной областью отечественной медицины.

Началась обычная для научных медицинских обществ жизнь. В 1965 г. скоропостижно скончался Александр Леонидович. Лидером кардиологии в нашей стране стал П.Е.Лукомский, избранный в 1963 г. академиком АМН СССР.

На первом после образования общества кардиологов СССР конгрессе Международного общества кардиологов, который состоялся 2 ноября 1966 г., кардиологи нашей страны были торжественно приняты в мировое сообщество коллег по профессии. Конгресс проходил в Индии, в Нью-Дели, в стране, которая находилась в дружеских отношениях с Советским Союзом. Советскую делегацию тепло встречали представители не только индийской медицины, но и других стран. К этому времени у меня, например, сложились дружеские отношения со многими американскими кардиологами, в частности с Б.Лауном, Е.Браунвальдом, Д.Стамлером, которые были делегатами конгресса. Ранее А.Л.Мясников познакомил меня с А.Киссом, другими лидерами американской кардиологии, и со многими я встречался во время нашего с А.Л.Мясниковым визита в США в 1964 г. Такие же знакомства были и у других членов нашей делегации – П.Е.Лукомского, Ф.З.Меерсона, В.В.Закусова, Г.М.Соловьева, А.М.Вихерта.

Генеральный секретарь конгресса профессор С.Падмавати устроила небольшой дружеский прием в честь советской делегации. Все материалы, представленные нами в качестве докладов, были опубликованы в материалах конгресса. Нас было не так много, около 20 человек, но резонанс участия в конгрессе представителей Советского Союза был значительным не только в кулуарах, но и в печати. Пожалуй, ни на одном из последующих конгрессов я не чувствовал такого внимания, дружеского отношения и поддержки, как на конгрессе в Нью-Дели. Международное общество кардиологов приняло нас в свои ряды как одних из лидеров мировой кардиологии.

К сожалению, в системе отечественного здравоохранения становление кардиологии как еще одной медицинской специальности и службы шло очень медленно. Прошло 12 лет после организации Общества кардиологов, когда "лед тронулся", причем связано это было не со стратегией Министерства здравоохранения в области борьбы с сердечно-сосудистыми заболеваниями, а с принятым Правительством страны решением о строительстве за счет средств, собранных во время субботника 1971 г., кардиологического центра. В декабре 1975 г. был образован Всесоюзный кардиологический научный центр Академии медицинских наук СССР.

До сих пор не могу понять, почему такой прогрессивный ученый и организатор здравоохранения, как академик Б.В.Петровский, занимавший в тот период пост министра здравоохранения, не спешил ввести кардиологию как отдельную специальность и структуру в систему здравоохранения. Официальные заявления Общества кардиологов,

группы ведущих ученых о необходимости создания такой службы в системе здравоохранения доброжелательно принимались Министерством здравоохранения, но дальше этого дело не шло.

В середине 1970-х годов у Л.И.Брежнева возникли проблемы со здоровьем, потребовавшие медицинского вмешательства. Мне нередко приходилось посещать его на даче в Заречье. Обычно это происходило утром до завтрака и, как правило, заканчивалось чаепитием, которое организовывала супруга Леонида Ильича, Виктория Петровна. Для Брежнева это была возможность пообщаться не с лечащими врачами, а с представителями медицины, успехи или недостатки которой во многом влияли на настроение простых граждан страны. Почему-то обычно, говоря о Л.И.Брежневе, вспоминают последние 2–3 года его жизни, когда он стал дряхлым стариком. Однако я помню другого Леонида Ильича, трезво, с полным пониманием значимости обсуждавшего важнейшие проблемы науки, медицины и жизни страны.

В один из таких визитов Брежнев вспомнил о перенесенном инфаркте миокарда, который возник у него в Молдавии в период работы секретарем республиканского ЦК. С обсуждения современных методов лечения разговор перешел на проблемы здравоохранения в целом. Я рассказал ему о нашем предложении создать специальную кардиологическую службу в системе здравоохранения, так как уже в то время смертность от сердечно-сосудистых заболеваний занимала одно из первых мест среди других ее причин. Внимательно выслушав наши предложения, он удивился, что Минздрав никак не может решить вопрос о создании такой службы. "Знаешь, напиши официально мне о вашем предложении, – сказал он в заключение, – особенно о лечении больных с инфарктом, и попроси решить вопрос о создании кардиологической службы в стране".

Через 2 дня эти предложения, которые включали, наряду с созданием головного центра кардиологической службы – ВКНЦ, создание двух институтов кардиологии в Российской Федерации, институтов в республиках, кардиологических диспансеров и отделений в больницах, а также ряд других организационных вопросов, лежали на столе у Генерального секретаря ЦК КПСС. Через неделю наши предложения с визой Л.И.Брежнева обсуждались на всех уровнях правительственной и партийной иерархии.

Естественно, было задето самолюбие Б.В.Петровского, так как предложения о совершенствовании здравоохранения поступили не из Минздрава, а от самих кардиологов. Чтобы как-то сгладить ситуацию, Минздрав немедленно обратился с предложением принять постановление ЦК КПСС и Совета Министров "О мерах по дальнейшему улучшению народного здравоохранения", в котором одним из главных вопросов являлось создание системы кардиологической службы. Нам было безразлично, в какой форме будут приняты наши предложения. Вскоре постановление было принято, а 30 октября 1978 г. Б.В.Петровский издал приказ № 1038, в котором официально вводилась специальность "врач-кардиолог", утверждались положения о кардиологическом диспансере, кардиологическом отделении стационара, кардиологическом кабинете поликлиники и т.д. Так кардиология официально стала составной частью системы здравоохранения нашей страны.



# Образовательный Мастер-курс по артериальной гипертензии и сердечно-сосудистому риску



Москва, 12–13 сентября 2007 г.



Европейское общество по артериальной гипертензии проводит новый цикл образовательного Мастер-курса по артериальной гипертензии и сердечно-сосудистому риску 2007–2008 г. при поддержке компании Berlin-Chemie Menarini. Заседания Мастер-курсов проходят в течение второй половины 2007 г. и первой половины 2008 г. в европейских странах. Их цель – ознакомление с последними дости-

жениями в диагностике и лечении артериальной гипертензии, а также в профилактике общего сердечно-сосудистого риска и обмен мнениями между специалистами. Основная тема для выступлений и дискуссий – «Рекомендации по лечению артериальной гипертензии», подготовленные с участием Европейского общества по артериальной гипертензии и Европейского общества кардиологов, которые были представлены в июне 2007 г.

12–13 сентября 2007 г. в Москве прошло очередное заседание образовательного Мастер-курса по артериальной гипертензии и сердечно-сосудистому риску, в котором приняли участие: заведующий кафедрой внутренних болезней, член Совета Европейского общества гипертензии Э. Амброзиони (Италия), академик РАМН и РАН Е.И. Чазов, руководитель Центра исследований сердечно-сосудистых заболеваний Великобритании Э. Хагерти, академик РАМН Р.Г. Оганов, д.м.н., профессор И.Е. Чазова, д.м.н., профессор С.А. Бойцов, д.м.н., профессор А.И. Мартынов и другие известные ученые.

## Программа по борьбе с артериальной гипертензией

*Е.И. Чазов,*

*д.м.н., профессор, академик РАМН и РАН,  
Генеральный директор РКНПК, Москва*

Академик Е.И. Чазов в своем докладе рассказал о ситуации, сложившейся с лечением артериальной гипертензии (АГ) в нашей стране.

В 2001 г. правительство приняло специальную программу по борьбе с АГ. Ее итог – в 2004–2006 гг. снижена смертность от ишемической болезни сердца и от инсульта. В 2006 г. сохранена жизнь 23,2 тыс. больным ишемической болезнью сердца и 31,6 тыс. больным цереброваскулярными болезнями. Тем не менее в 2006 г. умерло от ишемической болезни 602 тыс. человек и от цереброваскулярных заболеваний – 433 тыс.

Е.И. Чазов задал вопрос: «Что делать, как активизировать усилия, какие условия обеспечат активное снижение смертности и улучшение ситуации?».

Как показывает опыт, существует целый ряд мероприятий, которые обуславливают успех в борьбе с АГ. Основа борьбы с АГ – это профилактика. Затем следует эффективное лечение АГ по современным рекомендациям. Последнее условие диктует необходимость повышения квалификации врачей различных уровней и в первую очередь – первичного звена здравоохранения. Кроме того, в борьбе с артериальной гипертензией важная роль принадлежит обучению больных и информированности населения. В этом направлении работа ведется совместно с союзом журналистов России (в частности, в 2006 г. в СМИ было опубликовано 5 тыс. статей о необходимости борьбы с АГ).

Отдельно Е.И. Чазов остановился на вопросах эффективности лечения АГ, где, безусловно, есть успехи. Эффективность лечения за 2001–2006 гг. увеличилась в два раза – с 12 до 20%. Тем не менее эти 20% не должны устаривать кардиологов.

Евгений Иванович подчеркнул, что в США на пике успеха уровень эффективности лечения достигал 35–40%. По его мнению, к этой планке мы и должны стремиться. При этом речь идет об эффективности лечения в стране в целом, а не в определенных клиниках или больницах.

Е.И. Чазов отметил положительную работу Всероссийского научного Общества кардиологов по созданию стандартов лечения, по обучению врачей, в первую оче-

редь первичного звена, наиболее эффективным методам лечения. Эти усилия (не только Общества кардиологов, но и региональных институтов, кафедр) позволили изменить частоту использования различных лекарственных препаратов. Так, например, в 1999 г. 37% больных лечились устаревшими, мало активными препаратами. Сегодня в России 66% больных получают ингибиторы АПФ, 30% – бета-адреноблокаторы, 12% – антагонисты кальция, 40,4% – диуретики.

Евгений Иванович напомнил, что используя стандарты лечения, специалисты не должны игнорировать индивидуальные особенности конкретного большого процесса, наличие ассоциированных заболеваний, индивидуальную чувствительность к тем или иным препаратам.

## Эпидемиология артериальной гипертензии

*Р.Г. Оганов,*

*д.м.н., профессор, академик РАМН, директор НИЦ  
профилактической медицины МЗ РФ, главный  
кардиолог России*

Свой доклад Р.Г. Оганов начал с напоминания, что повышенное артериальное давление (АД), нормальное АД являются, в определенной степени, условными понятиями. Однако зависимость между АД и сердечно-сосудистыми осложнениями имеет прямолинейный характер – чем выше АД, тем чаще возникают сердечно-сосудистые осложнения. А если учесть, что риск больного с АГ зависит не только от уровня АД, но и от сопутствующих заболеваний, других факторов риска, то становится еще более очевидным условность деления «нормальное – повышенное» давление. В настоящее время все чаще используется термин «оптимальное АД» и избегается термин «нормальное давление».

Распространенность АГ нарастает с возрастом. В среднем 40% взрослого населения России можно причислить к лицам, страдающим АГ. Это высокая распространенность заболевания. Но в этом наша страна мало отличается от стран Европы и США, где распространенность АГ также высока. Главное отличие от западных стран заключается в уровне контроля АД, т.е. в доведении повышенного АД до нормы. В России до 2004 г. этот показатель был на уровне 11–12%. И только за последние годы произошли определенные изменения.



По подсчетам ВОЗ, в преждевременной смертности населения Российской Федерации АГ занимает первое место. Около 20 лет назад было показано, что если привлечь пациентов к регулярному лечению и попытаться контролировать АД, то это может привести к снижению смертности от мозгового инсульта на 48%. АГ остается фактором риска и после того, как пациент уже перенес мозговой инсульт и транзиторную ишемическую атаку. Имеется ряд исследований, которые показывают, что если среди лиц, перенесших мозговой инсульт, проводить активное лечение по снижению АД, то это приводит к снижению риска повторного инсульта на 28%.

Р.Г. Оганов отметил, что когда мы говорим о борьбе с АГ, мы все время подчеркиваем важность лечения этого заболевания. Но лечение не приводит к снижению распространенности, потому что число новых случаев не уменьшается.

Поэтому хочется улучшить не только контроль АГ, но и сократить ее распространенность. Таким образом, необходима первичная профилактика АГ. Возникает вопрос: «Что же для этого предпринять?».

Во-первых, нужно заниматься обучением врачей. Затем организовать работу по выявлению больных АГ, привлечь их к регулярному лечению. Не менее важная роль принадлежит обучению больных АГ методам измерения АД, основам лечения. Но этого недостаточно. Нужно обучать все население страны методам первичной профилактики АГ, необходимо обеспечить население современными лекарствами и аппаратами для измерения АД.

Р.Г. Оганов обратил внимание на популяционную стратегию, так как АГ – заболевание массовое и стратегия борьбы с ним должна быть также массовой. Если в популяции снизить уровень АД на 10% и уровень общего холестерина на 10%, то это приведет к снижению смертности от сердечно-сосудистых заболеваний на 45%.

## Проблема лечения артериальной гипертензии в России

*И.Е. Чазова,*

*д.м.н., профессор, руководитель отдела системных гипертензий РКНПК*

Частота АГ среди женского населения России составляет 40,1%, у мужчин – 37,2%. Эти значения выше, чем уровень заболеваемости АГ в развитых странах, который сейчас составляет 37%, и значительно выше, чем этот показатель в развивающихся странах – 22,9%. Планируется рост числа больных с АГ. В 2025 г. в развивающихся странах будет 1,5 млрд больных с АГ, в развитых странах – 413 млн пациентов. Цифры впечатляющие. Но АГ привлекает внимание не только из-за своей распространенности, но и из-за того, что является важнейшим фактором риска сердечно-сосудистых осложнений, в наибольшей степени мозгового инсульта. Наша страна занимает одно из лидирующих мест в мире по риску возникновения мозгового инсульта. Во многом это обусловлено тем, что в нашей стране АГ достаточно плохо лечится. Например, по данным НИЦ профилактической медицины, в последнее время произошло увеличение числа больных с АГ, которые знают о наличии у них заболевания. Для мужчин эти цифры увеличились с 37 до 75% к 2005 г., у женщин рост был менее заметный, и сейчас не 58, а 80% женщин, имеющих АГ, знают о наличии болезни. И, несмотря на то что пациенты стали чаще лечиться, и медикаментозно, и немедикаментозно, эффективность лечения еще очень мала. Сейчас только 9,4% мужчин с АГ лечатся эффективно, у женщин эти значения составляют 13%. Трудно объяснить это одной причиной. Очевидно, это связано с тем, что пациенты в нашей стране лечатся, может быть, не совсем качественными препаратами, не всегда соблюдают режим приема лекарственных средств и часто не понимают, что отмена лекарственных препаратов может привести к самым печальным последствиям. В пожилом возрасте, несмот-

ря на то что частота назначаемых лекарственных препаратов растет, охват лечения увеличивается, эффективность лечения с возрастом снижается. Это обусловлено и большей распространенностью систолической АГ, которая труднее контролируется, чем диастолическая. К сожалению, пожилые пациенты не имеют возможности покупать качественные эффективные лекарства, а должны довольствоваться более дешевыми, но не всегда безопасными и эффективными лекарственными препаратами.

И.Е. Чазова ответила на вопрос: «Есть ли у нас в России возможности лечить больных с АГ?». Да, теоретически, у нас есть все возможности для лечения больных с этой патологией. Первой линией для лечения больных с АГ является семь классов лекарственных препаратов: диуретики, бета-блокаторы, антагонисты кальция, ингибиторы АПФ, альфа-адреноблокаторы и др. Все они активно назначаются. Какие же препараты чаще используют наши врачи? По данным фармакоэпидемиологического исследования ПИФАГОР, которое было проведено несколько лет назад, в нашей стране наиболее часто, в 32% случаев, назначаются ингибиторы АПФ. На втором месте стоят бета-адреноблокаторы – 27%. Далее следуют диуретики – 21% и антагонисты кальция – 15%. Отрадно то, что препараты центрального действия, которые не имеют доказательной базы и вызывают очень частые побочные эффекты, назначаются у нас все меньше и меньше. И.Е. Чазова выразила надежду, что процент назначения препаратов центрального действия будет и в дальнейшем сокращаться.

## Значение международных контактов для решения проблемы лечения артериальной гипертензии в России

*С.А. Бойцов,*

*д.м.н., профессор, первый заместитель Генерального директора РКНПК*

С.А. Бойцов отметил значимость международных контактов для решения проблем АГ в России: «Если бы не было этих контактов, понимание самой проблемы, правильных подходов к диагностике и лечению АГ было бы крайне затруднительным. В течение последних двух десятилетий сформировалась устойчивая международная система, которая предполагает последовательность документов и порядка действий – сначала рождается международный документ как результат анализа большого количества международных исследований и реальной клинической практики, и затем эти международные документы являются основой для формирования национального документа. Существуют и другие примеры, когда национальные рекомендации рождаются по своему пути, например, так было в Великобритании. Процесс создания российских национальных рекомендаций должен проходить с учетом мнения наших зарубежных коллег, в первую очередь членов консультативного совета по АГ, и соответствующих специалистов, которые принимали участие в разработке европейского документа».



# Календарь проведения научных мероприятий

## Российские научные мероприятия 2007–2008 гг.

<p><b>2007 г.</b> <b>Сентябрь</b> <b>13–15</b> Третий аритмологический симпозиум по интервенционному лечению нарушений ритма сердца Москва</p> <p><b>20–21</b> Высокотехнологичные методы диагностики и лечения сердечно-сосудистых и эндокринных заболеваний. Всероссийская конференция с международным участием Санкт-Петербург</p> <p><b>Октябрь</b> <b>9–11</b> Российский национальный конгресс кардиологов и конгресс кардиологов стран СНГ. Москва</p>	<p><b>Декабрь</b> <b>5–7</b> 9-я Конференция Общероссийской общественной организации "Общество специалистов по сердечной недостаточности" Москва</p> <p><b>2008 г.</b> <b>Март</b> <b>4–5</b> Всероссийская научно-практическая конференция "Гипертоническая болезнь и вторичные артериальные гипертонии" Москва</p> <p><b>Апрель</b> <b>14–18</b> XV Российский национальный конгресс "Человек и лекарство" Москва</p>
---	---

## Международные научные мероприятия 2007–2008 гг.

<p><b>2007 г.</b> <b>Сентябрь</b> <b>1–5</b> Конгресс Европейского общества кардиологов Вена, Австрия</p> <p><b>Октябрь</b> <b>7–10</b> 10-й Международный конгресс по нарушениям сердечного ритма Венеция, Италия</p> <p><b>10–13</b> 18-й Международный кардиологический конгресс Пекин, Китай</p> <p><b>14–16</b> Интенсивная кардиологическая помощь. "V Международный съезд" Тель-Авив, Израиль</p> <p><b>Ноябрь</b> <b>4–7</b> Научная сессия Американской ассоциации сердца Орландо, США</p> <p><b>28.11–2.12</b> 14-й Международный конгресс "Кардиоваскулярная фармакотерапия 2007" Анталия, Турция</p> <p><b>Декабрь</b> <b>5–8</b> Евроэхо 2007 Лиссабон, Португалия</p>	<p><b>2008 г.</b> <b>Март</b> <b>29.03–1.04</b> Научная сессия Американского общества кардиологов Чикаго, США</p> <p><b>Май</b> <b>13–17</b> Съезд Американского общества по артериальной гипертонии Новый Орлеан, США</p> <p><b>18–21</b> Всемирный конгресс кардиологов Буэнос-Айрес, Аргентина</p> <p><b>Июнь</b> <b>14–17</b> Европейский конгресс по сердечной недостаточности Милан, Италия</p> <p><b>14–19</b> Конгресс Европейского общества по артериальной гипертонии Берлин, Германия</p>
---	--

# Издательство «Медиа Медика»



- «Consilium Medicum»**
- для практикующих врачей
  - 12 номеров в год
  - каждый номер посвящен различным разделам медицины
  - тираж 55 000 экз.



- «Гинекология»**
- для практикующих акушеров-гинекологов
  - 6 номеров в год
  - гл. редактор В.Н.Прилепская
  - тираж 15 000 экз.



- «Современная Онкология»**
- для практикующих онкологов
  - 4 номера в год
  - гл. редактор И.В.Поддубная
  - тираж 5 000 экз.



- «Справочник Поликлинического Врача»**
- только для поликлинических врачей, рассылается по всем взрослым поликлиникам России, и врачам индивидуально
  - 15 номеров в год
  - тираж 45 000 экз.



- «Болезни сердца и сосудов»**
- для практикующих врачей
  - 4 номера в год
  - тираж 15 000 экз.



- «Психиатрия и Психофармакотерапия»**
- для психиатров и терапевтов
  - 6 номеров в год
  - гл. редактор П.В.Морозов
  - тираж 35 000 экз.



- «Обзорение психиатрии и мед. психологии им. Бехтерева»**
- для психиатров и терапевтов
  - 4 номера в год
  - самый старый журнал по психиатрии (с 1894 г.)
  - тираж 10 000 экз.



- «Психические расстройства в общей медицине»**
- для психиатров и терапевтов
  - 4 номера в год
  - гл. редактор проф. А.Б.Снулевич
  - тираж 10 000 экз.



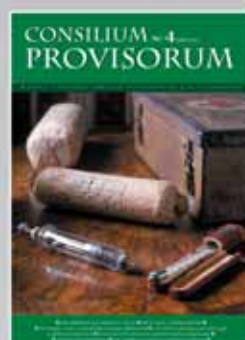
- «Инфекции и антимикробная терапия»**
- для практикующих врачей общей практики
  - 4 номера в год
  - гл. редактор С.В.Яковлев
  - тираж 15 000 экз.



- «Инфекции в хирургии»**
- для практикующих врачей общей практики
  - 4 номера в год
  - гл. редакторы: И.А. Ерюхин, Б.Р. Тельфанд
  - тираж 20 000 экз.



- «Кардиологический вестник»**
- для кардиологов
  - 2 номера в год
  - гл. редактор И.Е.Чазов
  - тираж 3 000 экз.



- «Consilium Provizorum»**
- для провизоров, рассылка по аптекам России
  - 6 номеров в год
  - тираж 15 000 экз.



- «Первостольник» (газета)**
- для провизоров, развлекательно-образовательная
  - 12 номеров в год
  - тираж 50 000 экз.



- «Массаж. Эстетика тела»**
- для профессиональных массажистов
  - 6 номеров в год
  - тираж 15 000 экз.



- Стоматологическая газета (лицензионный проект)**
- для стоматологов
  - 6 номеров в год
  - гл. редактор Э.А.Базиян
  - тираж 15 000 экз.



- «Системные гипертензии»**
- для кардиологов
  - 2 номера в год
  - гл. редактор И.Е.Чазова
  - тираж 20 000 экз.



Хирургия – 2 номера



Педиатрия – 2 номера



Болезни органов дыхания – 2 номера



Гастроэнтерология – 2 номера

Приложения к журналу «Consilium Medicum». Ежегодно выходят приложения по следующим тематикам:

Тираж приложений – 20 000 экз, аудитория – врачи-специалисты (педиатры, хирурги, гастроэнтерологи и т.д.)

# Небиволол, 5 мг № 14

# Небилет

2,5—5 мг 1 раз в сутки



**НОВЫЕ  
ВОЗМОЖНОСТИ  
В ЛЕЧЕНИИ**

- \* Уникальный двойной механизм действия
- \* Единственный высокоселективный  $\beta_1$ -адреноблокатор, восстанавливающий функцию эндотелия
- \* Доказанный ангио- и кардиопротективный эффект
- \* Непревзойденная безопасность у пациентов с сахарным диабетом и хроническими обструктивными заболеваниями легких



**БЕРЛИН-ХЕМИ  
МЕНАРИНИ**

<http://www.berlin-chemie.ru>