

Миокардиальные цитопротекторы оказывают антиапоптотический эффект на эндотелиоциты сосудистой стенки

А.И. Инжутова

НИИ молекулярной медицины и патобиохимии Красноярского государственного медицинского университета им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого. Красноярск, Россия

Myocardial cytoprotectors demonstrate anti-apoptotic effect on vascular endotheliocytes

A.I. Inzhutova

Research Institute of Molecular Medicine and Pathobiochemistry, V.F. Voyno-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University. Krasnoyarsk, Russia

Цель. Определить влияние миокардиальных цитопротекторов на содержание эндотелиоцитов в состоянии апоптоза и мембран-высвобожденных микрочастиц эндотелиального генеза в периферической крови пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями (ССЗ).

Материал и методы. В исследовании с информированного согласия приняли участие пациенты с ССЗ — гипертонической болезнью (ГБ) без ишемической болезни сердца (ИБС) и с ГБ на фоне ИБС. В качестве группы (гр.) контроля (ГК) была выделена гр. пациентов с рабочим диагнозом нейроциркуляторная дистония (НЦД). У всех пациентов проводили забор периферической венозной крови до назначения и на фоне 3-недельного приема триметазидина МВ. В последующем методом центрифугирования выделяли эндотелиальные клетки и мембран-высвобожденные микрочастицы.

Результаты. Прием триметазидина МВ вызвал статистически значимый регресс содержания слущенных эндотелиоцитов и мембран-высвобожденных микрочастиц в основных гр. (ОГ) и ГК ($p < 0,05$).

Заключение. Триметазидин МВ может быть использован как патогенетическая терапия, направленная на коррекцию гомеостаза сосудистой стенки у больных ССЗ, и в качестве средства профилактики прогрессирования эндотелиальной дисфункции у больных с рабочим диагнозом НЦД.

Ключевые слова: эндотелиальная дисфункция, апоптоз, мембран-высвобожденные микрочастицы, триметазидин МВ.

Aim. To evaluate the effects of myocardial cytoprotectors on the levels of apoptotic endotheliocytes and membrane-derived microparticles of endothelial origin in peripheral blood of the patients with cardiovascular disease (CVD).

Material and methods. The study included CVD patients with arterial hypertension (AH) and coronary heart disease (CHD) or AH only, all of whom gave informed consent. The control group (CG) included patients with neuro-circulatory dystonia (NCD). In all participants, peripheral blood samples were taken at baseline and after 3 weeks of trimetazidine MR therapy, to assess the levels of endotheliocytes and membrane-derived microparticles.

Results. Trimetazidine MR treatment resulted in significantly reduced levels of apoptotic endotheliocytes and membrane-derived microparticles in the two main groups and the CG ($p < 0,05$).

Conclusion. Trimetazidine MR could be used as pathogenetic therapy, correcting vascular wall homeostasis in CVD patients, and also as prevention of endothelial dysfunction progression in NCD patients.

Key words: Endothelial dysfunction, apoptosis, membrane-derived microparticles, trimetazidine MR.

©Инжутова А.И., 2010

e-mail: alyonainzhutova@gmail.com

[Инжутова А.И. — старший научный сотрудник].

Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) сопровождаются нарушением гомеостаза сосудистой стенки, что, в первую очередь, определяется нарушением целостности выстилки эндотелиального слоя, извращением баланса продукции эндотелиоцитами (ЭЦ) вазоконстрикторов и вазодилататоров и естественных антикоагулянтов. Все это в итоге приводит к увеличению проницаемости сосудистой стенки для клеток иммунной системы и биологически активных веществ, образованию атеросклеротических бляшек, пристеночных тромбов [1].

Одним из краеугольных камней нарушения гомеостаза сосудистой стенки является апоптоз эндотелиальных клеток (ЭК), прогрессирующий в условиях гипоксии и повышенной нагрузки на сосуды при артериальной гипертензии (АГ) [1,2].

Увеличение содержания слущенных ЭЦ в периферической крови напрямую коррелирует с прогрессированием эндотелиальной дисфункции (ЭД), а, значит, и тяжестью состояния пациентов с ССЗ. Замещение “раневого дефекта” сосудистой стенки происходит за счет прогениторных ЭК, которые являются полипотентными [3].

На начальных стадиях поражения ЭЦ или при действии кратковременного стресса, например, гипоксического, вследствие спазма мелких сосудов при резком повышении артериального давления (АД), происходит клеточная активация, сопровождающаяся гиперпродукцией биологически активных веществ: вазоконстрикторов (механизм направлен на увеличение доставки кислорода к пораженным тканям, в т.ч. самой сосудистой стенке), хемоаттрактантов (ограничение ишемизированного очага). В самих ЭЦ происходит активация внутриклеточных каскадных систем, направленных на увеличение экспрессии антигенов на поверхности клеток для реализации межклеточных контактов [1].

Одним из проявлений клеточной активации или раннего апоптоза клеток является продукция ими мембран-высвобожденных микрочастиц, обладающих биологическими эффектами, сходными с таковыми клетки-родительницы. Мембран-высвобожденные микрочастицы с размером до 1,0 мкм в диаметре, могут проникать через межклеточные щели между ЭК и становиться источником асептического воспаления в сосудистой стенке [4].

Предположительно, одним из механизмов продукции мембран-высвобожденных микрочастиц является изменение внутриклеточного баланса кальция и нарушение митохондриального дыхания.

Миокардиальные цитопротекторы, к которым относится триметазидин модифицированного высвобождения (МВ) (Предуктал МВ, Лаборатории Сервье, Франция), активируют окислительное декарбоксилирование и усиливают аэробный гликолиз, нормализуют функционирование ионных каналов мембран, препятствуя накоплению внутриклеточного Ca^{2+} .

Целью настоящего исследования было определение изменения содержания ЭЦ в состоянии апоптоза и мембран-высвобожденных микрочастиц эндотелиального генеза в периферической крови пациентов с сердечнососудистой патологией на фоне приема триметазидина МВ.

Материал и методы

В исследовании с информированного согласия приняли участие 102 пациента обоего пола в возрасте 40-60 лет, проходящие лечение в условиях городских поликлиник г. Красноярск. Все пациенты ранее в течение ≥ 2 лет получали стабильную сосудистую терапию, согласно Национальным рекомендациям. В течение последнего года никто из включенных в исследование пациентов не принимал миокардиальные цитопротекторы. Все пациенты были разделены на 2 основных группы (гр.) (ОГ): ИОГ (n=30) — пациенты, страдающие гипертонической болезнью (ГБ) II стадии (стд.) без ишемической болезни сердца (ИБС); ИОГ (n=40) ГБ+ИБС — пациенты, страдающие ГБ II стд. и ИБС, стенокардией напряжения II функционального класса (ФК) в соответствии с классификацией Канадской ассоциации кардиологов.

Гр. контроля (ГК) (n=32) составили пациенты обоего пола в возрасте 30-40 лет, наблюдающиеся в поликлинике с рабочим диагнозом нейроциркуляторная дистония (НЦД) по смешанному типу. Пациенты ГК не получали регулярной сосудистой терапии до включения в исследование. Пациенты ГК указанной выше возрастной категории были отобраны в связи с тем, что молодые люди < 30 лет, как правило, имеют дисгормональные нарушения (им ошибочно выставляется диагноз НЦД), что составляет гр. исключения, кроме того, в этой возрастной гр. репаративные способности эндотелия выше, чем в старшем возрасте. Пациенты старшей возрастной категории (> 60 лет) имеют более низкий порог чувствительности к окислительному стрессу (ОС), снижению иммунитета и нарушению восстановительных процессов, в связи с чем сравнительные данные с пациентами более молодой возрастной гр. не могут быть статистически достоверными (F. Dignat-George, 2003; M. Pirro, 2004; Z. Mamdouh, 2009). Термин “рабочий диагноз НЦД”, используемый в статье, обозначает то, что пациентам был выставлен диагноз Нейроциркуляторная дистония согласно классификации Н.Н. Савицкого (1952г) и уточняющим диагностическим критериям В.И.Маколина (1985г). Однако как самостоятельная нозологическая единица НЦД не включена в перечень МКБ-10. Тем не менее, в алфавитном указателе болезней и травм МКБ-10 сказано, что “нейроциркуляторная дистония, астения” должны относиться к шифру F45.3: включает гр. заболеваний, обозначенных как “соматоформная дисфункция вегетативной нервной системы”. НЦД имеет право быть самостоятельной нозологической единицей, имея конкретные диагностические признаки и способы лечения. В качестве ГК была взята именно эта гр. пациентов в связи с невыраженными процессами ЭД, в то же время, при назначении триметазидина МВ этой категории пациентов клинически отмечен положительный эффект по регрессу симптоматики.

Из исследования были исключены пациенты, страдающие эндокринными, системными, онкологическими, инфекционными заболеваниями, а также патологиями, которые могут повлиять на состояние иммунной системы.

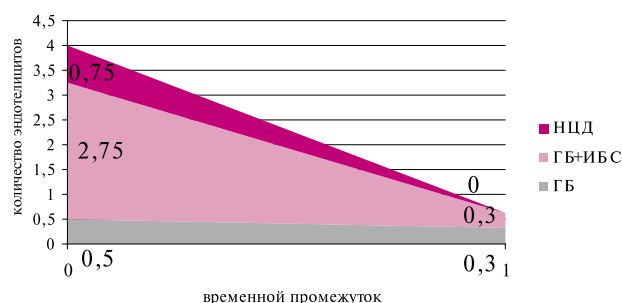


Рис. 1 Динамика содержания ЭЦ в периферической крови пациентов, страдающих ГБ, ГБ + ИБС, и в ГК (НЦД). 0 — до назначения Предуктала МВ, 1 — на фоне 3 нед. приема Предуктала МВ.

Всем пациентам проводили забор венозной крови в момент первичного осмотра перед включением в исследование и повторно на 3 нед. приема триметазида МВ (Предуктал МВ 35 мг, 1 табл. 2 раза в сут.).

4 мл венозной крови центрифугировали по методу М. Pizzo (2007) для выделения мембран-высвобожденных микрочастиц [5]. Методом ультрацентрифугирования получали ЭК из периферической крови [6]. Далее методом фазово-контрастной микроскопии (увеличение $\cdot 900$) производили рутинный подсчет в 10 полях зрения содержания ЭЦ и мембран-высвобожденных микрочастиц.

С целью определения мембран-высвобожденных микрочастиц эндотелиального происхождения производили по стандартному протоколу инкубирование с антителами CD62E (Sigma Aldrich).

Детекцию апоптотических ЭК и мембранных микрочастиц производили с использованием Annexin-V.

Статистическая достоверность определена с использованием критерия Колмогорова-Смирнова в поправке Лиллиефорса.

Результаты

Содержание ЭК в периферической крови до приема триметазида МВ оказалось выше в гр. пациентов с ГБ + ИБС ($2,72 \pm 0,2$ клетки) vs гр. больных ГБ без ИБС ($0,5 \pm 0,2$ клетки) и ГК ($0,75 \pm 0,5$ клетки), что было достоверно ($p=0,043$). На фоне приема Предуктала МВ отмечено снижение содержания ЭК в периферической крови. Статистически достоверное снижение было зафиксировано в гр. пациентов с ГБ + ИБС — 0,3 клетки ($p<0,05$) и в ГК — 0 клеток ($p<0,01$) (рисунок 1).

Процент апоптотических ЭК (слущенных ЭК) статистически значимо снизился во всех исследуемых гр. на фоне приема Предуктала МВ: в гр. пациентов с ГБ с 68,9 % до 42,4 % ($p=0,031$); в гр. пациентов с ГБ + ИБС с 74,5 % до 56,9 % ($p=0,046$); в гр. НЦД с 86,7 % до 11,5 % ($p<0,01$) (рисунок 2).

Высокое содержание мембран-высвобожденных микрочастиц эндотелиального генеза выявлено в гр. пациентов с ГБ без ИБС и в ГК: $67,05 \pm 4,6$ % и $70,6 \pm 8,5$ %, соответственно, по сравнению с гр. больных ГБ + ИБС — $53,06 \pm 2,3$ % ($p=0,039$).

На фоне приема Предуктала МВ содержание эндотелиальных мембран-высвобожденных микрочастиц в обеих ОГ установилось в районе $50 \pm 3,5$ от сово-

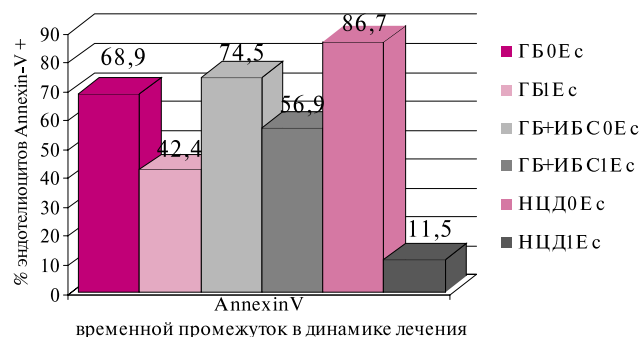


Рис. 2 Процентное содержание апоптотических ЭК в периферической крови изучаемых гр. пациентов до (0) и после приема Предуктала МВ [1].

купного числа мембран-высвобожденных микрочастиц, что было статистически незначимо между гр. В ГК пациентов после приема Предуктала МВ процент содержания эндотелиальных мембранных микрочастиц составил $17,5 \pm 2,5$, что отличалось от основных гр. с коэффициентом статистической значимости $p=0,018$ (рисунок 3).

Процент содержания в периферической крови апоптотических микрочастиц также снизился под действием Предуктала, что наиболее было выражено в ГК. В ИОГ снижение составило с 43,8 % до 32,5 % ($p=0,048$); во ИОГ с 44,2 % до 39,6 % ($p=0,06$); в гр. НЦД с 66,8 % до 17,5 % ($p<0,01$) (рисунок 4).

Все пациенты на фоне приема Предуктала МВ отметили улучшение состояния. Согласно проведенному клиническому осмотру, у большинства пациентов отмечен регресс предъявляемых жалоб (в 86,7 % $\pm 6,4$ % случаев пациенты через 1 мес. приема триметазида МВ не предъявляли жалоб на повышенное АД, головные боли, дискомфорт за грудиной или в перикардиальной области и т. п.); в 98,3 % $\pm 1,39$ % отметили повышение работоспособности. Пациентами по инструкции врача проводился самостоятельный мониторинг АД в домашних условиях, а также велся дневник измерений уровня АД. По данным анализа дневников мониторинга АД в 79,9 % $\pm 5,3$ % случаев зафиксирована стабилизация (отсутствие “скачков”) уровня АД, что привело к повышению выносливости к стрессовым ситуациям, т. е. отсутствию резкого подъема АД на фоне психоэмоциональных стрессов и физических нагрузках, превышающих обычные. Целевое АД достигнуто совокупно в гр. в среднем у 75,4 % $\pm 4,7$ % пациентов.

Обсуждение

Получены статистически достоверные данные снижения содержания слущенных (апоптотических) ЭК и произведенных ими мембран-высвобожденных микрочастиц в периферической крови как у больных ССЗ, так и в крови пациентов с НЦД. Предуктал МВ, как миокардиальный цитопротектор, повышает устойчивость клеток к стрессогенным факторам, таким как продукция свободных радикалов, изменение содержания внутриклеточных ионов кальция (за счет стабилиза-

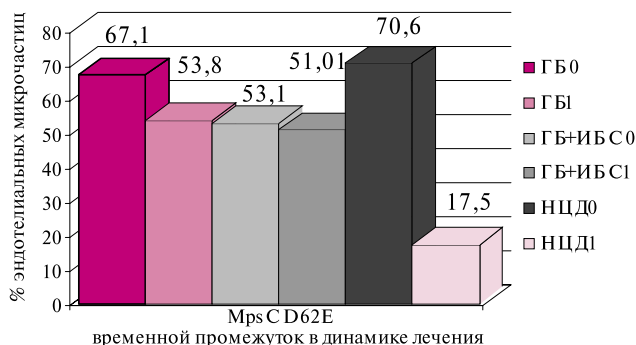


Рис. 3 Изменение содержания мембран-высвобожденных микро-частиц эндотелиального происхождения в периферической крови изучаемых гр. пациентов до (0) и после приема Предуктала МВ [1].

ции мембраны митохондрий), а также оказывает протекцию на течение процессов дыхательной цепи митохондрий. Известно, что в условиях повышенного АД, продукция вазоконстрикторов преобладает над вазодилататорами, однако, вазоконстрикторы, производимые в т.ч. и эндотелием, вызывают не только сокращение гладкомышечных клеток сосудов, но также изменяют функциональное состояние внутриклеточных сигнальных систем, в т.ч. опосредуя активацию рианодинных каналов, изменение состояния мембраны митохондрий и деполяризацию клеточных мембран самих ЭЦ, что приводит к увеличению содержания внутриклеточного кальция. Чрезмерное повышение содержания внутриклеточного кальция ведет с одной стороны к запуску процессов апоптоза в клетке, а с другой принимает участие в усилении генерации свободных радикалов за счет активации соответствующих ферментов. По литературным данным, в ответ на механическое воздействие высокого волнового давления крови на стенку сосуда ЭЦ способны увеличивать продукцию NO, который также в высоких концентрациях обладает вазоконстрикторным свойством и большей частью формирует активные формы кислорода. Предуктал МВ, оказывая влияние на восстановление кальциевого баланса, предупреждает изменения внутриклеточных сигнальных систем, что приводит к стабилизации цитоплазматической клеточной мембраны, оказывает протекцию в отношении запуска запрограммированной клеточной гибели.

По полученным данным, в ГК пациентов с НЦД отмечены более выраженные апоптотические процессы в эндотелии: увеличение содержания апоптотических

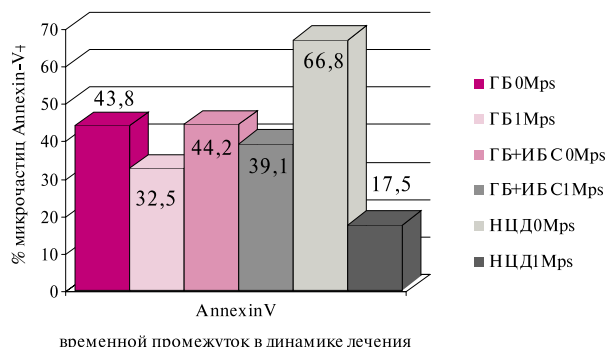


Рис. 4 Динамика регрессии содержания апоптотических мембран-высвобожденных микрочастиц на фоне действия Предуктала МВ.

ких микрочастиц и ЭЦ в периферической крови. Это может быть связано с отсутствием адаптации к периодически возникающему ОС на фоне воздействия повышенного АД, сохранностью репаративного потенциала эндотелиальной выстилки — восстановление эндотелиального слоя здоровыми ЭК вместо апоптотических слущенных ЭЦ. Стоит особо подчеркнуть, что уровень слущенных ЭЦ не был высок и составил всего 0,75 клетки в 100 мкл крови (что свидетельствует о слабой выраженности ЭД). В связи с этим увеличение содержания эндотелиоцитарных, апоптотических микрочастиц свидетельствует в пользу раннего (обратимого) апоптоза, который не приводит к слущиванию ЭК.

Более выраженное действие триметазидина МВ на стабилизацию состояния сосудистой стенки у пациентов ГК с НЦД связано с наименьшим количеством воздействующих патогенных факторов (таких как, высокое АД 2-3 степени по классификации ВОЗ-МОАГ 1999; свободно радикальное окисление, перекисное окисление липидов, хронический ОС, ишемия и др.) и ранними (начальными) изменениями сосудистой стенки у больных с НЦД vs пациентов с ГБ + ИБС.

Вывод

Предуктал МВ может быть использован как патогенетическая терапия, направленная на коррекцию гомеостаза сосудистой стенки у больных ССЗ, и как средство профилактики прогрессирования ЭД у больных с диагнозом НЦД за счет уменьшения выраженности апоптотических процессов на фоне его цитопротекторного эффекта.

Литература

1. Pober JS, Min W, Bradley JR. Mechanisms of endothelial dysfunction, injury, and death. *Pathology: Mechanisms of Disease* 2009; 4: 71-95.
2. Kobayashi N, DeLano FA, Schmid-Schönbein GW. Oxidative stress promotes endothelial cell apoptosis and loss of microvessels in the spontaneously hypertensive rats. *Arterioscl Thromb Biol* 2005; 25: 2114-21.
3. Preston RA, Jy W, Preston JRA. Effects of severe hypertension on endothelial and platelet Microparticles. *Hypertension* 2003; 41: 211-3.
4. Azevedo LCP, Pedro MA, Laurindo FRM. Circulating microparticles as therapeutic targets in cardiovascular. *Diseases Recent Patents on Cardiovascular Drug Discovery* 2007; 2: 41-51.
5. Deregibus MC, Cantaluppi V, Calogero R, et al. Endothelial progenitor cell-derived microvesicles activate an angiogenic program in endothelial cells by a horizontal transfer of mRNA. *BLOOD* 2007; 7(110): 2440-8.
6. Iwata Y, Kuzuya F, Hayakawa M, et al. Circulating endothelial cells fail to induce cerebral infarction in rabbits. *Stroke* 1986; 3(17): 506-9.

Поступила 08/10-2010