

actor involved in systemic sclerosis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2017; 140: 1448–1451.e6. doi: 10.1016/j.jaci.2017.04.046

11. Чумакова С.П., Уразова О.И., Денисенко О.А., Погонченкова Д.А., Шипулин В.М., Пряхин А.С., Невская К.В., Гладковская М.В. Моноциты крови в поддержании баланса деструктивных и репаративных процессов в сосудистом эндотелии при

ишемической кардиомиопатии. *Комплекс. пробл. сердечно-сосудистых заболеваний*, 2022; 11 (3): 84–96. doi: 10.17802/2306-1278-2022-11-3-84-96

12. Peach C.J., Mignone V.W., Arruda M.A., Alcobia D.C., Hill S.J., Kilpatrick L.E., Woolard J. Molecular Pharmacology of VEGF-A Isoforms: Binding and Signalling at VEGFR2. *Int. J. Mol. Sci.*, 2018; 19 (4): 1264. doi: 10.3390/ijms19041264

DOI 10.52727/2078-256X-2023-19-3-326-328

Нарушение ангиогенеза и структура сосудистой сети миокарда при ишемической кардиомиопатии

С.П. Чумакова¹, О.И. Уразова¹, В.М. Шипулин², И.В. Суходоло¹, А.И. Стельмашенко¹, О.А. Денисенко¹, С.Л. Андреев², М.С. Демин¹

¹ ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Томск, Россия

² НИИ кардиологии, Томский НИМЦ РАН, г. Томск, Россия

Введение. Ишемическая кардиомиопатия (ИКМП) является тяжелым заболеванием, не имеющим на сегодняшний день специфической фармакотерапии и характеризующимся прогрессированием болезни даже после хирургической коррекции коронарного русла и полости левого желудочка [1, 2]. Одним из механизмов ИКМП является эндотелиальная дисфункция коронарных сосудов, но интерес ученых сосредоточен на вазомоторной ее форме [3, 4]. При этом ангиогенная форма эндотелиальной дисфункции, включающая дисбаланс клеточных и гуморальных факторов (VEGF, PDGF, SDF, ангиопоэтинов и др.) ангиогенеза, репаративных и деструктивных процессов в сосудах [5], при ИКМП не изучается.

Цель: выявить особенности формирования сосудистой сети в сердце и дисбаланса медиаторов ангиогенеза в коронарном кровотоке в ассоциации с численностью эндотелиальных прогениторных и десквамированных клеток в крови у больных ишемической болезнью сердца, страдающих и не страдающих ИКМП.

Материал и методы. В исследование вошло 52 больных ИБС со стенокардией напряжения II–IV функционального класса и недостаточностью кровообращения преимущественно II–III функционального класса по NYHA, имевших инфаркт миокарда в анамнезе, которым выполнялась операция коронарного шунтирования: 30 человек с ИКМП (27 мужчин и 3 женщины, средний возраст 61,0 [56,0; 64,0] года) и 22 человека без кардиомиопатии (18 мужчин и 4 женщины, средний возраст 64,0 [59,5; 67,0] года). Диагностические критерии ИКМП соответствовали критериям G.M. Felker et al. [6]. Группу контроля составили 15 практически здо-

ровых доноров (13 мужчин и 2 женщины, возраст 57,63 ± 8,12 года), не имеющих каких-либо заболеваний сердечно-сосудистой системы и жалоб соответствующего характера.

Материалом исследования служили образцы крови из кубитальной вены (периферическая кровь) и крови из коронарного синуса (синусовая кровь), стабилизированные гепарином (25 МЕ/мл), а также биоптаты ушка правого предсердия. Периферическую кровь забирали в объеме 5 мл из кубитальной вены утром натощак как у здоровых доноров, так и у больных ИБС обеих групп исследования в день операции непосредственно перед индукцией в наркоз. Периферическую кровь использовали для иммунофенотипирования эндотелиальных прогениторных клеток (ЭПК). Кровь из коронарного синуса в объеме 5 мл получали только у пациентов с ИБС интраоперационно путем трансмиокардиальной пункции. В крови из коронарного синуса определяли содержание десквамированных эндотелиальных клеток (ДЭК), плазму крови из коронарного синуса использовали для исследования концентрации изучаемых медиаторов. Биоптаты миокарда ушка правого предсердия в объеме не более 10 мм³ получали интраоперационно и использовали для определения удельной площади сосудов морфометрическим методом и экспрессии α -гладкомышечного актина (α -SMA) иммуногистохимическим методом.

Абсолютное количество ДЭК (CD45⁺CD146⁺) и относительное содержание ЭПК (CD14⁺CD34⁺VEGFR2⁺) в крови определяли методом проточной цитофлуориметрии с использованием моноклональных антител Mouse Anti-Human CD14-FITC, CD34-PE, VEGFR2 (KDR; CD309)-Alexa Fluor 647, CD45-FITC и CD146-Alexa Fluor 647,

согласно инструкциям производителя (BD Biosciences, США). Содержание ДЭК выражали в $\times 10^5/\text{л}$, соотнося их количество с общим количеством лейкоцитов, экспрессирующих CD45⁺ (CD45 – общий лейкоцитарный антиген).

Концентрацию сосудистого эндотелиального фактора роста-A (VEGF-A), тромбоцитарного фактора роста (PDGF), фактора стромальных клеток-1 (SDF-1) определяли с помощью коммерческой тест-системы для иммунофлуоресцентного мультимплексного анализа Magnetic Luminescence Assay Kit for VEGFA, VEGFB, PDGF, SDF1, SCF, FGF1, GM-CSF, MCP1 (Cloud-Clone-Corp., США) и автоматизированного анализатора Bio-Plex Protein Assay System (Bio-Rad, США). Концентрацию ангиопоэтина-2 (Ang-2) и матриксной металлопротеиназы-9 (MMP-9) в плазме крови определяли методом иммуноферментного анализа с помощью коммерческих наборов RayBio Human ANGPT2 ELISA Kit (RayBiotech, США) и Human MMP9 ELISA (Thermo Fisher Scientific, США) согласно инструкциям производителей.

Полученные образцы миокарда фиксировали в 10%-м нейтральном забуференном формалине, парафинизировали и изготавливали гистологические срезы. Иммуногистохимическое окрашивание срезов выполняли с применением первичных антител к αSMA (Spring BioScience, США), вторичных HRP-меченных антител и системы визуализации HRP-DAV «пероксидаза хрена – диаминобензидин» (DAKO, США), затем окрашивали гематоксилином. Подсчет тканевых маркеров производили при увеличении $\times 400$ в 10 случайно выбранных полях зрения, что соответствует 1 мм^2 ткани. С помощью программы обработки графических изображений AxioVision (CarlZeiss, ImageJ) оценивали удельную площадь сосудов и экспрессию αSMA в процентах от площади изученной ткани.

При статистическом описании результатов вычисляли медиану, 25-й и 75-й перцентили.

С целью сравнительного анализа выборочных данных применяли критерий Манна – Уитни. Результаты статистического анализа считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты. Содержание ЭПК в периферической крови у больных ИБС без кардиомиопатии было повышенным относительно уровня здоровых доноров и пациентов с ИКМП (соответственно 0,74 [0,46; 1,23], 0,19 [0,13; 0,32] % ($p < 0,001$) и 0,31 [0,15; 0,64] %, $p = 0,038$), у последних оно не отличалось от нормы ($p = 0,260$). Это свидетельствует об усиленном привлечении ЭПК с репаративным потенциалом из костного мозга в кровь у больных ИБС без кардиомиопатии, что является компенсаторной реакцией при атерогенезе и, очевидно, обеспечивает репаративный ангиогенез, адекватный разрушению эндотелия в сердце. У больных ИКМП данная компенсаторная реакция, по всей видимости, не реализуется, поэтому ангиогенез не эффективен и преобладает разрушение эндотелия. Так, степень разрушения сосудистого эндотелия коронарных сосудов у больных обеих групп хотя и была сопоставимой, но характеризовалась отчетливой тенденцией к превышению ДЭК в крови у пациентов с ИКМП по сравнению с больными ИБС без кардиомиопатии (таблица). С этим согласуется повышенная, относительно больных ИБС без кардиомиопатии, концентрация Ang-2 и MMP-9 в крови из коронарного синуса у пациентов с ИКМП (см. таблицу). Оба медиатора относят к маркерам сердечно-сосудистых заболеваний, атеросклероза и эндотелиальной дисфункции [4]. MMP-9 разрушает компоненты экстрацеллюлярного матрикса, включая фибронектин [7, 8], входящий в состав базолатеральной мембраны сосудов [9]. Ang-2 является негативным регулятором ангиогенеза, поскольку блокирует связывание проангиогенного Ang-1 с их общим рецептором Tie-2, дестабилизирует ранние сосуды, увеличивает их проницаемость [10]. К тому же Ang-2 в отсут-

Содержание ДЭК и медиаторов ангиогенеза в синусовой крови в ассоциации с характеристикой удельной площади сосудов и экспрессии αSMA в миокарде у больных ИБС, страдающих и не страдающих ИКМП

Параметр	Больные		p
	ИБС без ИКМП	ИБС с ИКМП	
Содержание ДЭК CD45 ⁺ CD146 ⁺ , $\times 10^5/\text{л}$	10,17 [6,80; 18,83]	17,98 [10,27; 22,97]	0,156
Содержание VEGF-A, пг/мл	7,80 [3,25; 9,75]	6,89 [3,25; 15,60]	0,918
Содержание SDF-1, пг/мл	40,30 [26,00; 62,00]	46,80 [32,50; 64,00]	0,623
Содержание PDGF, пг/мл	7,60 [3,70; 9,94]	7,86 [2,92; 8,77]	0,736
Содержание ангиопоэтина-2, пг/мл	767,0 [494,0; 988,0]	1111,5 [845,0; 1235,0]	0,002
Содержание MMP-9, пг/мл	5,92 [5,07; 17,42]	16,64 [6,63; 29,12]	0,038
Удельная площадь сосудов, %	5,70 [5,60; 6,70]	6,60 [4,60; 8,90]	0,815
Экспрессия αSMA , %	8,10 [7,60; 11,30]	1,30 [0,60; 2,80]	0,007

ствие избытка VEGF-A способен вызывать регрессию сосудов [11].

Примечательно, что секреция трех медиаторов положительной регуляции ангиогенеза VEGF-A, SDF-1 и PDGF в крови из коронарного синуса у пациентов обеих групп была сопоставимой. Следовательно, обширная диффузная ишемия миокарда при ИКМП (исходя из патогенеза и диагностических ее критериев) и высокая степень деструкции коронарных сосудов при этом заболевании (исходя из уровня Ang-2 и MMP-9 в синусовой крови, см. таблицу) не способны индуцировать проангиогенный медиаторный ответ пораженного ИКМП сердца. Более того, при этом заболевании отмечается изменение структуры сосудистой стенки сердца: несмотря на равную долю сосудов в миокарде при ИБС, осложненной и не осложненной ИКМП, экспрессия α SMA у пациентов с ИКМП была в 6,2 раза ниже, чем у больных ИБС без кардиомиопатии (см. таблицу). Белок α SMA синтезируется гладкомышечными клетками сосудов, которые являются самыми многочисленными в сосудистой стенке, обеспечивая поддержание тонуса сосудов [12, 13]. То есть при ИКМП вновь образованные сосуды являются незрелыми, а имеющиеся, вероятно, теряют тонус, что усугубляет ишемию, вызывает сократительную дисфункцию миокарда и прогрессирование сердечной недостаточности.

Заключение. Развитие ИБС без кардиомиопатии сопровождается компенсаторным усилением мобилизации ЭПК в кровь из костного мозга в ответ на атерогенез. При этом в миокарде образуются зрелые, содержащие достаточное количество гладкомышечных клеток сосуды (экспрессируют α SMA), поэтому активация ангиогенеза при ИБС без кардиомиопатии ограничивает прогрессирование ишемии миокарда. Формирование ИКМП ассоциировано с отсутствием повышенной мобилизации ЭПК в кровь на фоне избытка Ang-2 в миокарде, в котором образуются незрелые сосуды, легко подвергающиеся деструкции с участием MMP-9. При этом пораженное при ИКМП сердце не способно индуцировать проангиогенный медиаторный ответ с участием VEGF-A, SDF-1, PDGF. Такой ангиогенез, очевидно, неадекватен степени повреждения сосудов и формирует порочный круг ишемии миокарда при ИКМП.

Финансирование. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-25-00821, <https://rscf.ru/project/22-25-00821/>.

Литература

1. Del Buono M.G., Moroni F., Montone R.A., Azzaolini L., Sanna T., Abbate A. Ischemic Cardiomyopathy and Heart Failure After Acute Myocardial Infarction. *Curr. Cardiol. Rep.*, 2022; 24 (10): 1505–1515. <https://doi.org/10.1007/s11886-022-01766-6>
2. Шипулин В.М., Пряхин А.С., Андреев С.Л., Шипулин В.В., Чумакова С.П., Рябова Т.Р. и др. Современные клинично-фундаментальные аспекты в диагностике и лечении пациентов с ишемической кардиомиопатией (обзор). *Сиб. журн. клин. и эксперим. медицины*, 2021; 36 (1): 20–29. <https://doi.org/10.29001/2073-8552-2021-36-1-20-29>
3. Poston R.N. Atherosclerosis: integration of its pathogenesis as a self-perpetuating propagating inflammation: a review. *Cardiovasc. Endocrinol. Metab.*, 2019; 8 (2): 51–61. <https://doi.org/10.1097/XCE.0000000000000172>
4. Zhang J. Biomarkers of endothelial activation and dysfunction in cardiovascular diseases. *Rev. Cardiovasc. Med.*, 2022; 23 (2): 73. <https://doi.org/10.31083/j.rcm.2302073>
5. Мельникова Ю.С., Макарова Т.П. Эндотелиальная дисфункция как центральное звено патогенеза хронических болезней. *Казан. мед. журн.*, 2015; 96 (4): 659–665. <https://doi.org/10.17750/KMJ2015-65>
6. Felker G.M., Shaw G.M., O'Connor C.M. A standardized definition of ischemic cardiomyopathy for use in clinical research. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 2002; 39 (2): 208–210. [https://doi.org/10.1016/s0735-1097\(01\)01738-7](https://doi.org/10.1016/s0735-1097(01)01738-7)
7. Chumakova S., Urazova O., Shipulin V., Vins M., Pryakhin A., Sukhodolo I. et al. Galectin 3 and non-classical monocytes of blood as myocardial remodeling factors at ischemic cardiomyopathy. *IJC Heart and Vasculature*, 2021, 33: 100766. <https://doi.org/10.1016/j.ijcha.2021.100766>
8. Zhang X., Chen C.T., Bhargava M., Torzilli P.A. A Comparative Study of Fibronectin Cleavage by MMP-1, -3, -13, and -14. *Cartilage*, 2012; 3 (3): 267–277. <https://doi.org/10.1177/1947603511435273>
9. Hamidi H., Ivaska J. Vascular Morphogenesis: An Integrin and Fibronectin Highway. *Curr. Biol.*, 2017; 27 (4): R158–R161. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.12.036>
10. Ha J.M., Jin S.Y., Lee H.S., Kum H.J., Vafaeinik F., Ha H.K. et al. Akt1-dependent expression of angiotensin 1 and 2 in vascular smooth muscle cells leads to vascular stabilization. *Exp. Mol. Med.*, 2022; 54 (8): 1133–1145. <https://doi.org/10.1038/s12276-022-00819-8>
11. Bowler E., Oltean S. Alternative Splicing in Angiogenesis. *Int. J. Mol. Sci.*, 2019; 20 (9): 2067. <https://doi.org/10.3390/ijms20092067>
12. Cao G., Xuan X., Hu J., Zhang R., Jin H., Dong H. How vascular smooth muscle cell phenotype switching contributes to vascular disease. *Cell Commun. Signal.*, 2022; 20: 180. <https://doi.org/10.1186/s12964-022-00993-2>
13. Xie Y., Liao J., Yu Y., Guo Q., Yang Y., Ge J. et al. Endothelial-to-mesenchymal transition in human idiopathic dilated cardiomyopathy. *Mol. Med. Rep.*, 2018; 17 (1): 961–969. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.8013>