

ПРИРОДА

№ 10, 2005 г.

СОЮЗ КЛИНИЦИСТОВ И ТЕОРЕТИКОВ

К 60-летию Российского кардиологического научно-производственного комплекса

© “Природа”

**Использование и распространение этого материала
в коммерческих целях
возможно лишь с разрешения редакции**



Сетевая образовательная библиотека “VIVOS VOCO!”
(грант РФФИ 03-07-90415)

*vivovoco.nns.ru
vivovoco.rsl.ru
vivovoco.ibmh.msk.su*

СОЮЗ КЛИНИЦИСТОВ И ТЕОРЕТИКОВ



К 60-летию Российского кардиологического научно-производственного комплекса



«Нет ни фундаментальной, ни прикладной науки. Есть одна наука, как дерево и плоды, им приносимые». Этой заповеди Луи Пастера придерживался академик Е.И.Чазов, создавая в 1975 г. Всесоюзный кардиологический научный центр АМН СССР, ныне — Российский кардиологический научно-производственный комплекс Росздрава (РКНПК). В его состав входят Институт клинической кардиологии им.А.Л.Мясникова, Научно-исследовательский институт экспериментальной кардиологии и Экспериментальное производство медико-биологических препаратов. Формально кардиоцентру исполняется только 30 лет, однако официально в этом году отмечается его 60-летие, поскольку вырос он из Института экспериментальной и клинической терапии АМН СССР, созданного в 1945 г. и затем переименованного в Институт кардиологии. Все эти годы там трудились и трудятся специалисты самого высокого уровня — клиницисты, физиологи, биофизики, а также молекулярные биологи и генетики. В содружестве теоретиков, экспериментаторов и врачей были не только выяснены и уточнены механизмы формирования атеросклероза, ишемической и гипертонической болезней, сердечной недостаточности и нарушений ритма, но и разработаны новые лекарственные препараты и диагностическая аппаратура. К сожалению, формат нашего журнала не позволяет подробно рассказать обо всех научных достижениях всемирно известного кардиоцентра. Мы публикуем краткий исторический очерк, по сути отражающий развитие отечественной кардиологической школы, а также небольшую подборку научных сообщений, в которую вошли лишь очень немногие результаты последних лет.

Развитие отечественной кардиологии



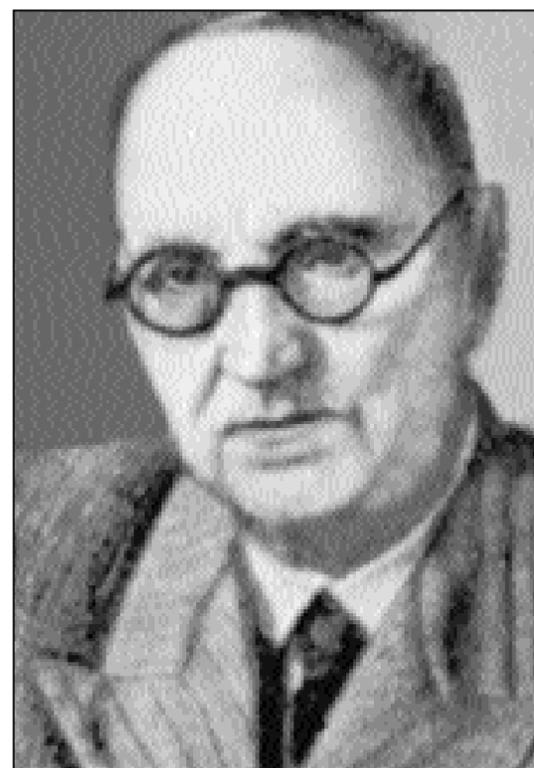
Член-корреспондент РАМН В.В.Кухарчук,
заместитель генерального директора РКНПК Росздрава

Заболевания сердца и сосудов всегда были и остаются одними из самых тяжелых и смертельно опасных недугов человека, а выяснение причин и механизмов их формирования и дальнейший поиск методов диагностики и лечения — основными задачами медицинской науки. Особенно актуальной борьба с этими болезнями стала в середине прошлого века. В те послевоенные годы во всем мире, в том числе и в нашей стране, заметно увеличилось количество людей, перенесших инфаркт миокарда или инсульт, страдавших артериальной гипертензией или стенокардией. Безусловно, это обеспокоило врачей и ученых, которые начали искать причины столь стремительного, сравнимого с эпидемией распространения этих болезней. Так, в США были обследованы жители небольшого городка Фремингема («Фремингемское исследование»), и выяснилось, что развитию сердечно-сосудистых заболеваний способствуют, в первую очередь, курение, повышение артериального давления, гиперхолестеринемия, ожирение, малоподвижный образ жизни, и не в последнюю — психоэмоциональный стресс (угроза ядерной войны, боязнь потерять работу, стремительная урбанизация общества). Все перечисленное получило название факторов риска развития сердечно-сосудистых заболеваний.

Естественно, аналогичные исследования проводили и в нашей стране. Специально для поиска методов диагностики и лечения наиболее распространенных внутренних болезней, в том числе сердечно-сосудистых, в апреле 1945 г. при Академии медицинских наук СССР был создан Институт экспериментальной и клинической терапии. Располагался он тогда в небольшом здании на Большой Серпуховской улице. Возглавил институт академик АМН СССР Владимир Филиппович Зеленин — известный кардиолог, прославившийся

в изучении стенокардии и внедривший в практику метод электрокардиографии. Три года спустя его сменил на посту директора выдающийся клиницист, ученик знаменитого Г.Ф.Ланга академик АМН СССР Александр Леонидович Мясников, с именем которого связано активное развитие отечественной кардиологии. Александру Леонидовичу удалось собрать уникальный коллектив высококлассных специалистов фундаментальной и клинической медицины, ученых с мировым именем. Да и сам Мясников обладал высоким международным авторитетом, он (единственный в нашей стране) удостоен высокой международной награды кардиологов — «Золотой стетоскоп» (1965). Александр Леонидович всячески способствовал укреплению международных связей и признанию заслуг наших ученых за рубежом, именно он смог наладить тесные научные связи между советскими и американскими кардиологами; особую роль в этом сыграла его дружба с выдающимся американским кардиологом П.Уайтом.

В то время внимание исследователей было сконцентрировано главным образом на двух заболеваниях — артериальной гипертензии и атеросклерозе. В частности, были глубоко изучены нейрогуморальные факторы и их роль в формировании артериальной гипертензии, а также начаты исследования по характеристике нарушений липидного обмена у больных атеросклерозом различной локализации. Однако столь же необходимо было решать проблемы острого инфаркта миокарда, нарушений ритма сердца, сердечной недостаточности, внедрять в клиническую практику высокотехнологичные и информативные методы обследования больных. Александр Леонидович все это прекрасно понимал, но на небольшой площади в старом строении осуществить такую программу было невозможно. В 1959 г. по решению правительства институту выделили новое здание в центре города — в Пет-



В.Ф.Зеленин (1881—1968).

Институт экспериментальной
и клинической терапии на
Большой Серпуховской улице.

Здесь и далее фото
из архива РКНПК

роверигском переулке, куда и переехал весь коллектив.

Круг изучаемых проблем существенно расширился. Начались активные исследования по диагностике и лечению острого инфаркта миокарда — заболевания, равносильного в то время смертному приговору, поскольку в половине случаев оно заканчивалось летальным исходом. Для организации этих работ Мясников пригласил из 1-го Московского медицинского института своего ученика Евгения Ивановича Чазова. Под его руководством группа сотрудников занялась поиском механизмов возникновения коронарного тромбоза и метода его лечения (Л.Ф.Николаева, Т.Н.Кожевникова), а также изучением патогенеза некроза миокарда (И.К.Шхвацабая, Н.Н.Кипшидзе).

В отделении неотложной кардиологии, которое также возглавлял Е.И.Чазов, был организован один из первых в мире блоков интенсивной терапии, где можно непрерывно следить за основными параметрами сердечно-сосудистой системы, что позволяло быстро принимать решения в сложных ситуациях. Важную роль в этой работе сыграли сотрудники отделения М.Я.Руда, А.П.Зыско, В.А.Богословский. Впервые был применен радиоизотопный метод для оценки динамики нек-

роза миокарда (А.А.Крамер). Практически в то же время начали проводиться ангиографические исследования коронарных и почечных артерий, что существенно расширило возможности клиницистов в диагностике ишемической болезни сердца (ИБС) и реноваскулярной гипертензии (Л.С.Матвеева, Г.Г.Арабидзе, В.П.Мазаев). Не менее важным достижением стало создание дистанционных диагностических центров для передачи ЭКГ по телефону (Н.А.Мазур). Совершенствовались методы электрокардиографической диагностики ИБС — съемка ортогональных скорректированных отведений, регистрация векторкардиограммы (З.З.Дорофеева, И.Ф.Игнатъева). В отделении хронической ишемической болезни сердца разрабатывались принципы дифференцированного медикаментозного лечения ИБС (Л.А.Мясников, В.И.Метелица).

В отделе артериальной гипертензии занимались выяснением роли патологии почек в развитии этой болезни (А.А.Некрасова, Ю.А.Серебровская, И.А.Учитель); были выделены формы ренин-зависимой и независимой артериальной гипертензии (И.К.Шхвацабая, С.Е.Устинова), разработаны схемы дифференцированной терапии этого заболевания (Е.В.Эрина). В отделе симптоматических артериальных гипертензий изучались особеннос-



А.Л.Мясников (1899—1965).



Институт кардиологии им.А.Л.Мясникова в Петроверигском переулке.

ти патогенеза, характер гемодинамических нарушений при различных формах вторичной гипертензии, разрабатывались подходы к их лечению (Н.А.Ратнер, Г.Г.Арабидзе, С.П.Абугова, Г.А.Глезер, Г.Л.Спивак, О.М.Елисеев).

В лаборатории патологической анатомии изучалась эпидемиология атеросклероза (А.М.Вишерт, Е.Е.Матова), а в лаборатории биохимии — роль в развитии этого заболевания ферментов, катализирующих реакции переаминирования (М.Г.Крицман, М.В.Бавина, Н.В.Перова). Над различными проблемами кровообращения работало несколько групп в лаборатории физиологии, возглавляемой М.Г.Удельновым, который заложил основы современного подхода в изучении электрофизиологии сердца. Особенно выделялась группа А.В.Трубецкого, изучавшая вопросы коронарного кровообращения и его регуляции. В лаборатории электрофизиологии (Л.В.Розенштраух) шла интенсивная работа по выявлению механизмов возникновения пароксизмальных форм тахикардии, мерцания и трепетания предсердий, проводились исследования по оценке действия отечественных антиаритмических препаратов этмозина и этацизина.

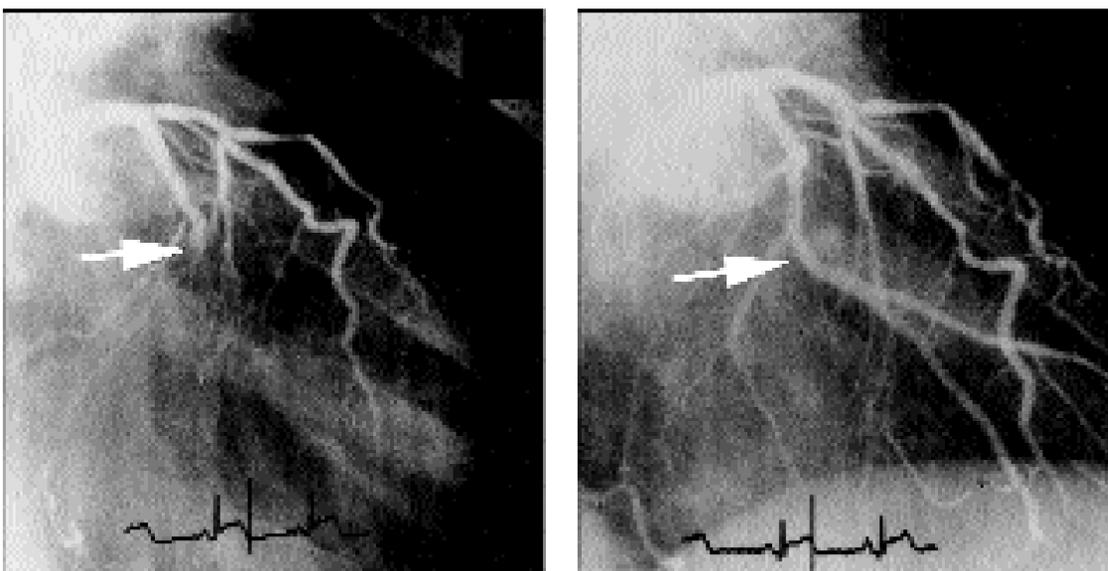
Была создана лаборатория эпидемиологии, в задачу которой входила оценка распространенности сердечно-сосудистых заболеваний в Моск-

ве и других крупных городах и регионах Советского Союза (И.С.Глазунов, В.И.Метелица). Это позволило выявить факторы риска этих заболеваний и разработать эффективные меры по первичной и вторичной их профилактике (Т.П.Островская, Е.В.Кокурина). Впоследствии на основе этой лаборатории возник Институт профилактической кардиологии.

В 1966 г., вскоре после внезапной кончины академика Мясникова, институт был переименован в Институт кардиологии им.А.Л.Мясникова. Некоторое время им руководил ученик и соратник Александра Леонидовича Е.И.Чазов, а после его назначения начальником 4-го главного управления МЗ СССР институт возглавил профессор И.К.Шхвацабая.

1970—1980 гг., думаю, можно отнести к наиболее плодотворному периоду в жизни коллектива. Именно тогда был проведен впервые в мире лизис тромба непосредственно в коронарной артерии больного с острым инфарктом миокарда. Дальнейшие исследования в этом направлении привели к созданию стрептодеказы — высокоэффективного и хорошо переносимого тромболитика пролонгированного действия. Эти результаты оказались столь значительными, что в 1982 г. работа была удостоена высшей в те времена государственной награды за достижения в области науки

Ангиограммы коронарной артерии до и после тромболитической терапии. Стрелкой показано место тромба, перекрывшего сосуд.



и техники — Ленинской премии (Е.И.Чазов, В.Н.Смирнов, В.П.Торчилин и др.).

Другое событие того времени связано с появлением метода эхокардиографии (Ю.Н.Беленков). Метод ультразвукового исследования сердца быстро развивался и открыл широкие возможности неинвазивной диагностики пороков сердца, кардиомиопатий, оценки функционального состояния сердца и сосудов. В этом научном направлении успешно работали тогда молодые ученые нашего института (О.Ю.Атьков, В.А.Крол, В.Ю.Мареев, И.Ю.Ашмарин, Ю.С.Соболь) и многих других учреждений страны. В отделе заболеваний миокарда и сердечной недостаточности проводились важные исследования с применением метода эхокардиографии для изучения возможности гипертрофии миокарда от повреждения, выявления ранних стадий гипертрофии миокарда и хронической сердечной недостаточности (Н.М.Мухарлямов, Ю.Н.Беленков, О.Ю.Атьков).

В 1975 г. был образован Всесоюзный кардиологический научный центр (ВКНЦ), состоящий из Института клинической кардиологии им.А.Л.Мясникова и лабораторий, из которых в дальнейшем были сформированы Институт экспериментальной кардиологии и Институт профилактической кардиологии. В 1980 г. дополнительно создан Сибирский филиал ВКНЦ АМН СССР в Томске. В это время сотрудники работали с необычайным воодушевлением; энтузиазм во многом объяснялся и молодым возрастом сотрудников (в среднем 35 лет), и притоком в кардиоцентр талантливых ученых, занимавшихся фундаментальными проблемами кардиологии с применением современных методов молекулярной биологии и генетики.

ВКНЦ стал головным учреждением в стране по проблеме кардиологии, на его базе организован координационный совет, отвечающий за реализацию государственной программы борьбы с сердечно-сосудистыми заболеваниями.

К концу 70-х годов были подробно изучены молекулярные и клеточные механизмы функционирования сердечной мышцы в норме и патологии. Выяснилось, что внутриклеточный транс-

порт энергии происходит за счет многократно повторяющегося цикла креатинфосфокиназных реакций (креатинфосфат переносит энергию от митохондрий к миофибриллам и диффундирует в виде креатина обратно к митохондриям). Таким образом было установлено, что сила сердечного сокращения регулируется креатином. Авторы открытия этого явления (В.Н.Смирнов, Л.В.Розенштраух, В.А.Сакс, Д.О.Левицкий) в 1978 г. получили Государственную премию. Той же наградой были отмечены и другие наши сотрудники: в 1980 г. — Н.М.Мухарлямов, Ю.Н.Беленков и Ю.Т.Пушкарь за разработку и внедрение в медицинскую практику современных методов диагностики начальной стадии сердечной недостаточности, механизмов ее развития, профилактики и лечения, в 1981 г. — М.И.Титов и Ж.Д.Беспалова за исследование и разработку методов синтеза пептидных биорегуляторов и организацию их производства.

Но, пожалуй, наиважнейший итог этого десятилетия — создание разветвленной сети кардиологической службы из специализированных институтов и диспансеров во многих крупных городах страны. Такая служба была в то время лучшей и наиболее эффективной в мире, что позволило организовывать и направлять фундаментальные исследования, изучать распространенность и структуру сердечно-сосудистых заболеваний, оптимизировать их профилактику. В результате заболеваемость и смертность от основных сердечно-сосудистых заболеваний в нашей стране заметно снизилась.

Большое событие в жизни кардиоцентра — переезд в 1982 г. в новый комплекс из 22 зданий, построенный на средства коммунистических субботников в живописном месте на западной окраине Москвы. В новом комплексе расположились великолепно оборудованные 10-этажные помещения институтов клинической и экспериментальной кардиологии, биоклиника и корпуса для размещения многочисленных лабораторий, научной библиотеки и т.д. Всем требованиям мировых стандартов отвечает и экспериментальное предприятие по производству биологически активных и лекар-

ственных средств, разработанных учеными кардиоцентра.

Клиническая работа и научные исследования развернулись в полном объеме. В созданном в 1984 г. отделении кардиохирургии, которое возглавил Р.С.Акчурин — лауреат Государственной премии, высококлассный специалист в области сосудистой микрохирургии, начали проводить самые сложные операции на коронарных артериях. В Институте клинической кардиологии был внедрен и начал широко применяться в клинике метод баллонной ангиопластики почечных и коронарных артерий (В.В.Кухарчук, В.П.Мазаев, А.П.Савченко, А.Н.Самко), установлен первый в стране магниторезонансный (МР) томограф, освоены МР спектроскопия и МР ангиография, предназначенные для обследования состояния сосудов в различных органах (Ю.Н.Беленков).

Согласованность в работе сотрудников двух институтов и экспериментального производства, расположенных практически под одной крышей, позволила сократить срок от решения задачи, поставленной клиницистами перед экспериментаторами, до внедрения новых методов и препаратов в практику. Так, молекулярно-генетические исследования помогли разобраться в процессах, происходящих при развитии гипертрофической кардиомиопатии, при некоторых сложных нарушениях ритма сердца, а также у больных с наследственной гиперхолестеринемией. Был разработан метод иммуносорбции липопротеидов низкой плотности для терапии семейной гиперхолестеринемии (С.Н.Покровский, Г.А.Коновалов), создана двухэтапная схема обследования больных с симптоматическими артериальными гипертониями (Т.Г.Арабидзе), синтезирован высокоактивный пептидный препарат *деларгин*, который применяется не только в кардиологии, но и в гастроэнтерологии для лечения язвенной болезни двенадцатиперстной кишки и некрозов поджелудочной железы (М.И.Титов, Ж.Д.Беспалова). В отделе радионуклидных методов исследования созданы новые радиофармпрепараты, позволяющие более эффективно оценивать перфузию и функцию миокарда до и после различных вмешательств на коронарных сосудах (В.Б.Сергиенко). В отделе новых методов диагностики (О.Ю.Атьков) разработаны весьма эффективные способы исследования. Так, чреспищеводная эхокардиография позволяет исследовать структуры сердца и образования в нем, которые недоступны при обычной эхокардиографии; при дуплексном сканировании можно оценить состояние кровотока после маммаро-коронарного шунтирования — радикального способа лечения ишемической болезни сердца, при котором для обхода суженных участков пораженных сосудов используются внутренние грудные (маммарные) артерии. Эта же методика применяется также при диагностике стенозов сонных и почечных артерий.

Зарубежные медики и ученые стали частыми гостями кардиоцентра; в свою очередь и наши сотрудники получили возможность поработать в ведущих клиниках мира. В 1982 г. в Москве состоялся IX Всемирный конгресс кардиологов — событие, на которое собралось более 6 тыс. специалистов из 40 стран мира; это стало признанием высокого уровня отечественной кардиологии.

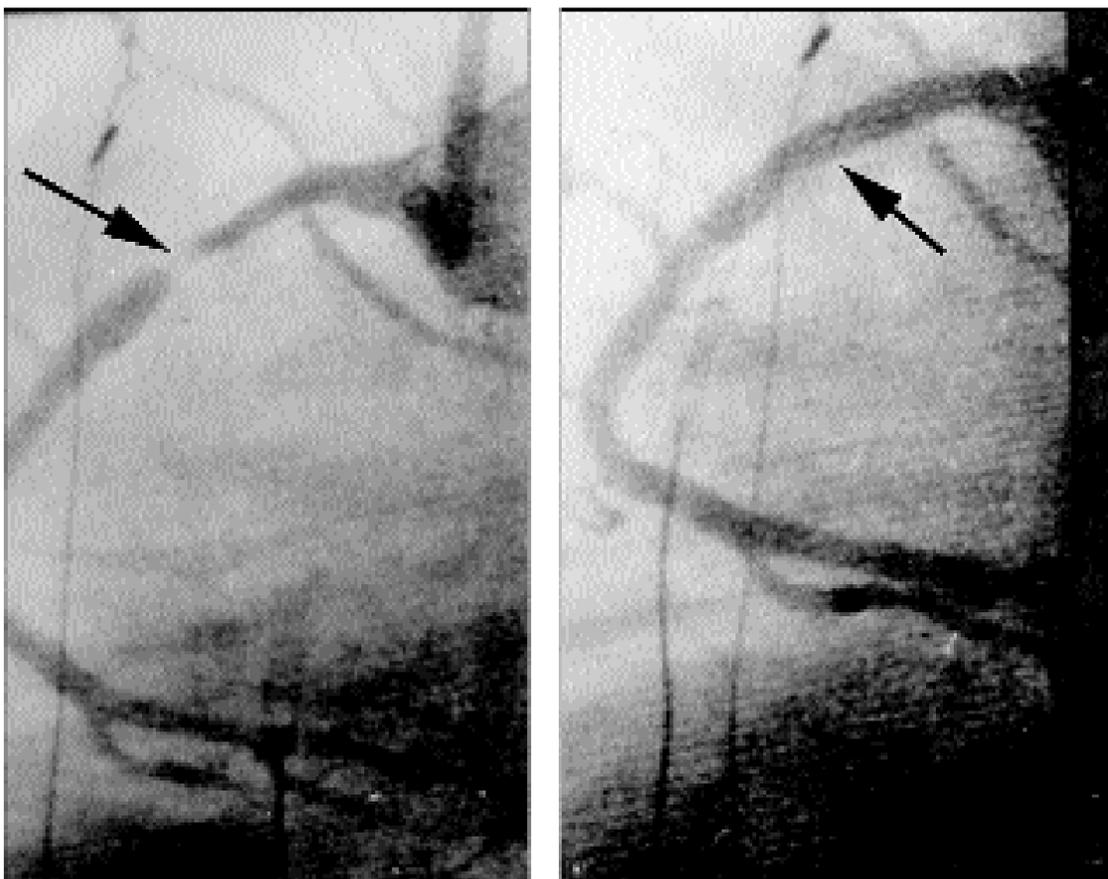
Уникальными исследованиями сердечно-сосудистой системы космонавтов, выполнявших длительные орбитальные полеты, занимаются в кардиоцентре с момента его основания. Данные, полученные нашим сотрудником О.Ю.Атьковым в 1984 г. во время его пребывания на борту космической станции «Салют-7» в течение 247 суток, легли в основу усовершенствованной концепции адаптации организма человека к условиям длительного воздействия невесомости. Кроме того, во время полета с помощью разработанного с участием ученых кардиоцентра ультразвукового аппарата «Аргумент» удалось передать на Землю эхокардиограммы участников полета.

Чтобы оценить масштаб научных достижений 80-х годов, достаточно просто перечислить работы, отмеченные в тот период Государственной премией. В 1982 г. эта награда получена за создание и внедрение многофункционального комплекса радиоэлектронных диагностических приборов со встроенными вычислителями для автоматизированных исследований сердечно-сосудистой системы (Л.Ф.Николаева, Р.С.Карпов), а также за цикл работ по географической патологии и эпидемиологии сердечно-сосудистых заболеваний (А.М.Вихерт, В.С.Жданов, Е.Е.Матова). В 1985 г. — за создание и внедрение в медицинскую практику новой группы высокоэффективных лекарственных препаратов для профилактики и лечения нарушений сердечного ритма (Л.В.Розенштраух, А.С.Сметнев, Е.П.Анюховский); в 1986 г. — за разработку, серийное освоение и внедрение диагностического микропроцессорного комплекса «Лента МТ» для исследования сердечно-сосудистой системы человека (Н.А.Мазур, Ю.С.Соболь); в 1989 г. — за разработку методов эхокардиографической диагностики и контроля состояния сердечно-сосудистой системы и внедрения их в практику здравоохранения (Ю.Н.Беленков, О.Ю.Атьков, Н.М.Мухарлямов).

После распада СССР кардиоцентр, преобразованный к тому времени в Российский научно-производственный комплекс, оказался в сложном финансовом положении и был вынужден перестраивать свою работу. Как и многие научные и медицинские организации, мы начали сотрудничать со страховыми компаниями и ввели медицинские услуги, оказываемые на коммерческой основе. Тем не менее 70% больных лечатся в кардиоцентре бесплатно.

В 90-х годах 160 сотрудников кардиоцентра покинули родину и уехали работать за рубеж.

Ангиограммы коронарной артерии до и после баллонной ангиопластики и стентирования. Стрелками отмечено место стеноза сосуда.



С одной стороны, это печальное событие, с другой — свидетельство высокой квалификации наших специалистов. Не утерян контакт с кардиологическими учреждениями стран СНГ, откуда по-прежнему ежегодно к нам на учебу приезжают специалисты. Создана Ассоциация кардиологов стран СНГ, каждые два года проводятся съезды кардиологов СНГ; они уже прошли в Москве, Минске, Бишкеке, Алма-Ате, Санкт-Петербурге.

Годы экономической нестабильности в стране не выбили из седла ни клиницистов, ни специалистов фундаментальной медицины. Многие работы стали выполняться при финансовой поддержке отечественных и зарубежных фондов: Российского фонда фундаментальных исследований, Института Говарда Хьюза (США), Фонда Европейского сотрудничества (INTAS), Фонда биомедицинских исследований (Wellcome Trust, Великобритания), Фонда гражданских исследований (CRDF, США) и др.

Буквально в последние годы в кардиоцентре созданы три принципиально новых препарата, которые по терапевтической активности превосходят зарубежные аналоги. Генноинженерный тромболитический препарат *пулолаза* (Р.Ш.Бибилашвили, А.А.Белогуров) уже применяется в клинической практике для лечения больных с острым инфарктом миокарда. Антиаритмический препарат *нибентан*, созданный для экстренного купирования угрожающих жизни пароксизмов различных форм тахикардий, оказался не менее эффективным и в случае хронических форм мерцания и трепетания предсердий. В 2004 г. эта работа удостоена Государственной премии (С.П.Голыцын, Л.В.Розенштраух, М.Я.Руда, Е.И.Чазов). Недавно в лаборатории клеточной адгезии профес-

сором А.В.Мазуровым и сотрудниками совместно с лабораторией клеточной инженерии и отделом неотложной кардиологии разработано и внедрено в клиническую практику антитромботическое средство *монофрам*, созданное на основе моноклональных антител к рецепторам гликопротеидов (IIb-IIIa) — мембранных белков тромбоцитов. Этот препарат способен существенно снижать количество тромботических осложнений при проведении коронарной ангиопластики.

Продолжаются интенсивные исследования практически по всем основным направлениям современной кардиологии. В частности, изучается возможность применения стволовых клеток для регенерации погибших участков миокарда, а также стимуляции ангиогенеза для восстановления или, по крайней мере, улучшения кровообращения в пораженной зоне миокарда у больных, перенесших острый инфаркт или страдающих тяжелой формой сердечной недостаточности, которым не помогает современная медикаментозная терапия (В.Н.Смирнов, В.А.Ткачук). Много внимания уделяется исследованию процессов воспаления в сосудистой стенке как важному фактору развития атеросклероза и поиску противовоспалительных средств, способных избирательно влиять на эту патологию. Важное место занимают исследования по генной диагностике некоторых форм атеросклероза и артериальной гипертензии, заболеваний миокарда и нарушений ритма сердца. Но и этим не ограничиваются все научные задачи, над решением которых трудятся полторы тысячи наших сотрудников, преданных своему делу, полных оптимизма несмотря на все сложности современной жизни.

Новый взгляд на старый белок



По мере накопления научного багажа о здоровье и болезнях человека, как и в любой другой отрасли знаний, иногда приходится обращаться к казалось бы хорошо изученным вопросам, лежащим в стороне от самых главных задач сегодняшнего дня. И исследование, уточнение давно решенных вопросов в приложении к новой проблеме оказывается интереснейшей проблемой.

Атеросклероз — один из самых крепких орешков современной медицины. Долгое время атеросклероз рассматривался как медленно текущий процесс накопления излишков липидных веществ в сосудистой стенке, приводящий к формированию на внутренней поверхности артериальной стенки атеросклеротических бляшек (атером). Их рост постепенно приводит к сужению (стенозу) сосуда и со временем начинает сказываться на величине кровотока. Когда компенсаторные механизмы уже неспособны расширить сосуд, развиваются симптомы заболевания: стенокардия, преходящие нарушения мозгового кровообращения, перемежающаяся хромота. Более тяжелые проявления недостаточности кровотока приводят к инфаркту и инсульту — гибели клеток органа, снабжаемого данным сосудом. Волнообразное течение болезни или внезапное ухудшение объясняется прежде всего отложением на поверхности атеромы тромботических масс, состоящих из клеточных элементов крови.

В последние годы выяснилось, что поражение сосудов при атеросклерозе, стадийность этого процесса, причины накопления липидов в стенках артерий невозможно объяснить исключительно с позиций «липидной теории». Накопление стимулов, меняющих пути транспорта липидов, начало формирования

атеросклеротической бляшки и ее дальнейшее развитие, надрыв ее поверхности и последующее образование на ней тромба в настоящее время принято связывать с многосложным взаимодействием клеточных и иммунохимических реакций, обозначаемых термином «воспаление при атеросклерозе». Результаты современных исследований говорят об атеросклерозе как о динамически развивающемся процессе, в котором активно участвуют клеточные элементы различных тканей, особенно на стадии зарождения атеромы.

В последние годы стала яснее роль клеточных реакций при атеросклерозе, появилась реальная возможность *in vivo* оценить межклеточные взаимодействия. В плазме крови выявлены биохимические факторы, которые участвуют в этой комплексной реакции. Оказалось, что во многих случаях при атеросклерозе концентрация ряда биологически активных веществ либо уже повышена, либо смещена к верхним границам нормальных значений. Подобные сдвиги, выявленные у еще практически здорового человека, ассоциируются в дальнейшем с более высокой вероятностью клинических проявлений атеросклеротического поражения коронарных сосудов сердца и других сосудистых бассейнов. Эти биологически активные вещества — эндогенные факторы — получили в литературе название маркеров воспаления при атеросклерозе.

Один из подобных маркеров — С-реактивный белок (СРБ). В лабораторной диагностике его концентрацию в плазме крови стали определять более 70 лет назад. В середине прошлого века лабораторный анализ С-реактивного белка был уже одним из основных способов диагностики ревматизма

и ревматических заболеваний, а также других воспалительных и некротических процессов.

Длительное время кардиологи довольно спокойно относились к СРБ-тесту при неревматической патологии. Этому способствовала недостаточная чувствительность биохимических методов, которыми определялась концентрация СРБ в плазме. Но когда были разработаны новые высокочувствительные методы определения концентрации, с их помощью удалось выяснить многое из того, о чем прежде и не подозревали. Появились новые сведения о местах синтеза С-реактивного белка, о его участии в подготовке погибших и умирающих (апоптоидных) клеток организма к уничтожению фагоцитами. В ином свете представилось значение этого белка при сердечно-сосудистой патологии.

К настоящему времени установлено, что СРБ вырабатывается не только в клетках печени (гепатоцитах), как считалось ранее, а синтезируется в клетках гладких мышц, почек, в макрофагах и нейронах. Стимулировать местный тканевый синтез СРБ могут липидные нарушения, избыток цитокинов, циркулирующие в крови микроорганизмы или их частицы. Интересно, что локальный синтез СРБ выявлен в ткани, образующей атерому (!).

С-реактивный белок относится к «белкам острой фазы», т.е. входит в группу протеинов, которые вырабатываются в организме в ответ на внешнее или эндогенное воздействие. Так, уровень СРБ повышается при острых бактериальных, вирусных, грибковых, паразитарных инфекциях, при хронических воспалительных процессах, ревматоидном артрите, различных видах онкопатологии, травмах, а также после хирургических вмешательств. Иными словами,

повышенная выработка С-реактивного белка — это быстрый неспецифический ответ на любое повреждение и гибель тканей. Следовательно, не должна быть исключением и сосудистая ткань, если в ней появились какие-то дефекты.

К настоящему времени обнаружены корреляционные зависимости между содержанием СРБ и другими провоспалительными маркерами, и эта связь активно обсуждается исследователями. Кроме того, специалисты выясняют, отражает ли уровень этого белка тяжесть сердечно-сосудистых заболеваний, указывает ли на риск их развития у здоровых людей. Для практического использования СРБ с аналитической целью имеются все предпосылки: стандартизованная методика определения с хорошо воспроизводимыми результатами, выявленная в обширных популяционных исследованиях прогностическая роль маркера.

Возникновение провоспалительных субстанций (не только СРБ, о синтезе которого здесь уже упоминалось) внутри атеромы можно рассматривать как важный механизм, способствующий развитию заболевания и росту атеросклеротической бляшки. Активность клеточных процессов в атероме, местные воспалительные реакции приводят к формированию так называемых осложненных атером, края которых подрыты, выступают в просвет сосуда. Они хорошо видны на рентгенограмме коронарной артерии. Такие стенозы могут внезапно перекрыть просвет сосуда и вызвать острую коронарную недостаточность — причину инфаркта или внезапной смерти.

Осложненные атеромы, содержащие клетки с высокой секреторной активностью, отражающей состояние воспаления, как сами по себе, так и в сочетании с тромботическими процессами на поверхности атеро-

склеротической бляшки составляют основу атеротромбоза.

Оказывается, можно устранить находящуюся внутри коронарной артерии осложненную атерому! Даже если диаметр сосуда всего 2-3 мм! Такие операции проводятся в нашем институте и в некоторых других московских клиниках.

С помощью специального внутрисосудистого катетера под рентгенологическим контролем в сосуд, в место стеноза, вводят специальный баллон, через который на атерому передается воздействие давлением. Она сплющивается, просвет сосуда расширяется, и кровоток восстанавливается. Для надежности место, где было выполнено вмешательство, укрепляют внутрисосудистым эндопротезом — так называемым стентом — сетчатым каркасом в виде трубки. Размер стента подбирается в соответствии с анатомическими особенностями артерии больного.

© Сумароков А.Б.,

кандидат медицинских наук

Институт клинической кардиологии им.А.Л.Мясникова,

отдел атеросклероза

Депрессия, воспаление и тромбоз



По данным Всемирной организации здравоохранения, в наши дни депрессивными расстройствами страдает 4–5% населения, а предрасположено к ним около 20%. По предположениям исследователей, через 10–15 лет эта группа заболеваний станет второй по значимости после сердечно-сосудистых, поскольку реальность опережает прогнозы ВОЗ: на самом деле подавляющее большинство таких больных лечится не у психиатров, а то и вовсе не обращается к врачам. И напрасно — современные знания о депрессии позволяют отличить это

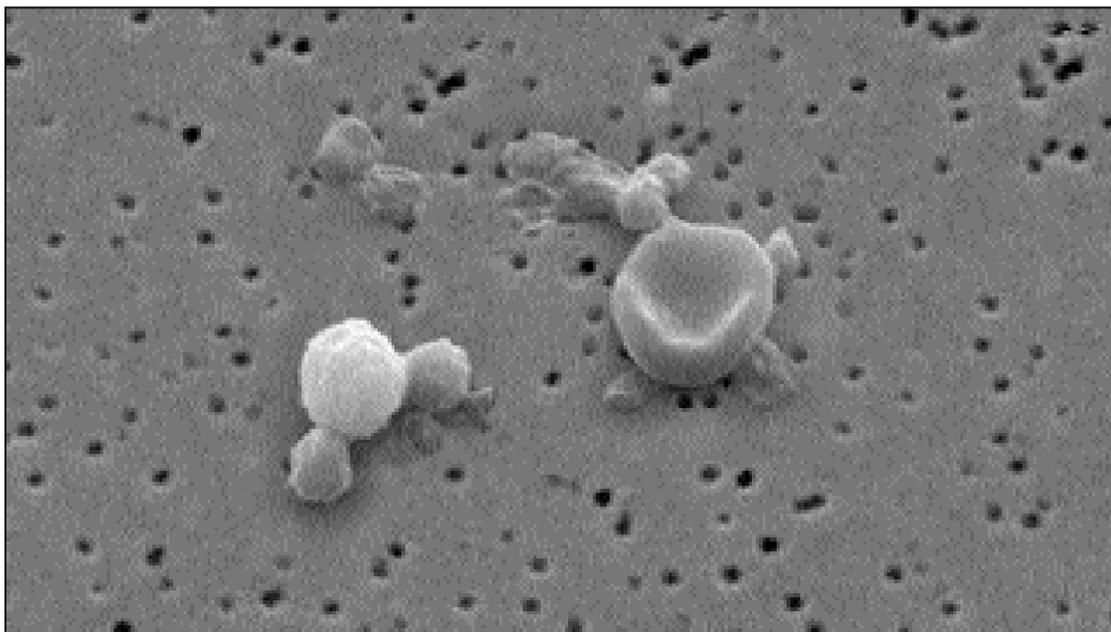
состояние человека от «просто плохого настроения», которое, как известно, бывает и в норме.

Установлено, что развитию депрессии сопутствует повышение уровня секреции цитокинов — биологически активных молекул (полипептидных медиаторов), которые участвуют в организации и регуляции защитных реакций человека, вовлекая в этот процесс иммунную, нервную, эндокринную и кровяную системы. Известно, что гиперпродукция цитокинов в организме свидетельствует о развитии системной воспалительной реакции и может слу-

жить ее маркером. С недавних пор некоторые цитокины стали использовать в качестве лекарственных препаратов, применяемых для повышения активности иммунитета.

Впервые о связи депрессии с воспалением заговорил Р.С.Смит в 1991 г. Он отметил, что у пациентов с онкологическими заболеваниями и гепатитами В и С на фоне лечения цитокинами развивается депрессия¹. В дальнейшем его гипотеза подтвердилась. Оказалось, что при длительном воспалитель-

¹ Smith R.S. // Med. Hypoth. 1991. №35. P.298–306.



Лейкоцитарно-тромбоцитарные (слева) и эритроцитарно-тромбоцитарные агрегаты у больных депрессией.

ном процессе увеличивается секреция цитокинов не только на периферии, но и в центральной нервной системе. Эти провоспалительные вещества вызывают нарушения ключевых функций головного мозга в префронтальной коре и гипоталамо-гипофизарной оси, которые отвечают за высшие когнитивные функции. При продолжительном снижении активности этих участков коры надолго утрачивается ощущение реальности, негативные мысли начинают преобладать в сознании, что в конце концов приводит к депрессии. Примечательно, что проявления депрессии сходны с течением воспалительного процесса — и в том, и другом случае эпизоды обострений часто чередуются с очень длительными периодами восстановления.

Депрессивное расстройство может быть спровоцировано инфекцией, ишемией, новообразованиями, некрозами и дефектами развития тканей, нарушением их проницаемости, а также длительным стрессом, хотя в этом случае пути возникновения воспалительного процесса пока неизвестны.

В нашем центре были обследованы больные, страдающие депрессией, но без соматической патологии и клинических

признаков воспаления в период, когда они не получали лекарств. Исследование маркеров воспаления показало, что в крови этих пациентов на фоне нормальных значений С-реактивного белка (СРБ, компонента плазмы крови, уровень которого меняется при воспалительных процессах) возрастает содержание некоторых цитокинов. Повышение уровня только отдельных маркеров воспаления при нормальной концентрации остальных — свидетельство дисбаланса в системе провоспалительных цитокинов. Оно требует довольно трудоемкого и дорогостоящего исследования большого количества медиаторов одновременно.

В то же время судить о зарождении воспаления можно и по другому критерию. Дело в том, что в крови всех больных депрессией появляется значительное количество лейкоцитарно-тромбоцитарных и эритроцитарно-тромбоцитарных агрегатов (ЛТА и ЭТА). Эти гетероклеточные конгломераты образуются на ранних стадиях развития воспаления и возникают в результате активации тромбоцитов под действием появляющихся в крови провоспалительных медиаторов, в том числе и цитокинов. Отмечено, что в крови здоровых людей ни ЛТА,

ни ЭТА не образуются. В 2001 г. М.И.Фурман с коллегами предложил использовать в качестве наиболее раннего маркера инфаркта миокарда и воспалительного процесса ЛТА, которые появляются в крови на несколько часов раньше, чем тропонин — хорошо изученный, чувствительный и специфичный маркер повреждения миокарда¹.

Провоспалительные медиаторы, освобожденные активированными моноцитами и макрофагами, такие как интерлейкин-1b и фактор некроза опухолей, в первую очередь воздействуют на эндотелий сосудов. В его клетках синтезируются адгезивные молекулы белка, делающего поверхность эндотелия «липкой» — клетки приобретают провоспалительный и прокоагулянтный фенотип. Это в свою очередь приводит к активации тромбоцитов — ключевому событию не только гемостаза и тромбоза, но и воспалительного и иммунного ответов². Таким образом запускается замкнутый каскад реакций. С одной стороны, повышается активность тромбоцитов к адгезии, агрегации и освобождению из них целого ряда прокоагулянтных и провоспалительных веществ, в том числе и хемокинов (цитокинов, стимулирующих активное движение различных типов лейкоцитов к очагу воспаления). С другой стороны, взаимодействие тромбоцитов с лейкоцитами приводит к внутренней перестройке последних и выбросу из них прокоагулянтных факторов (в частности тканевого фактора), провоцирующих реакцию свертывания крови. В итоге риск тромботических осложнений возрастает. Кроме того, увеличивается синтез и секреция цитокинов моноцитами, усиливается их прикрепление и передвижение внутрь сосудистой стенки, по-

¹ Furman M.I. et al. // J. Am. Coll. Cardiol. 2001. V.38. №4. P.1002—1006.

² Weyrich A.S., Zimmerman G.A. // Trends Immunol. 2004. V.25. №9. P.489—495.

давляется апоптоз, в результате чего они продолжают жить и поддерживать в крови высокий уровень цитокинов.

При депрессии в крови появляются мелкие тромбоцитарные микроагрегаты и ретикулярные пластинки, которые обладают повышенным потенциалом гемостатических функций. Образование мелких агрегатов тромбоцитов — точный и высокочувствительный критерий их повышенной активации, свидетельствующий о возникновении риска тромбоза при различных патологиях (ишемической болезни сердца, артериальной гипертензии, тромботических осложнениях, сопровождающих патологию мозговых сосудов, заболеваниях периферических сосудов). Традиционно используемый турбидометрический способ оценки агрегации не позволяет обнаружить это явление. Более адекватную информацию об агрегационной способности тромбоцитов дает лазерный анализатор, недавно разработанный учеными нашего кардиоцентра.

При депрессии обнаружено еще одно нарушение гемостаза — изменение агрегационных свойств эритроцитов. При асте-

нической депрессии, или депрессии истощения (состоянии, когда возникает ощущение утраты энергии, особое чувство мышечной вялости, нарушение общего чувства тела), снижается устойчивость эритроцитов к гемолизу и повышается их способность образовывать агрегаты. В итоге меняется реология крови и уменьшается поступление кислорода к различным клеткам и тканям. Именно этими нарушениями, происходящими с эритроцитами, а не психической реакцией, можно объяснить возникающее состояние. В отличие от астенической формы, при тревожной депрессии эритроциты сохраняют свои свойства.

В последние годы большое внимание уделяется вопросу сопряжения депрессии с другими патологиями. Французские ученые установили, что на фоне депрессии риск развития ишемической болезни сердца (ИБС) увеличивается в полтора раза¹. Стало очевидно, что присоединение депрессии к ишемической болезни сердца оказывает неблагоприятное воздействие на ее развитие, течение и прог-

¹ *Empana J.P. et al. // Circulation. 2005. V.111. №18. P.2299—2305.*

ноз, увеличивает вероятность повторных инфарктов.

Развитие депрессии у пациентов, страдающих ИБС, также происходит на фоне повышения в крови уровня цитокинов (при нормальных показателях СРБ), причем более выраженно, чем у больных только депрессией. При ИБС, которой сопутствует депрессивное расстройство, в крови также циркулируют микроагрегаты и наряду с этим повышается количество ЛТА и ЭТА. Кроме того, средний объем тромбоцитов увеличивается и становится выше, чем у больных ИБС, не страдающих депрессией, что свидетельствует о повышении риска тромботических осложнений.

Стало очевидным, что возникновение соматических нарушений тесно связано с развитием депрессивных расстройств, выявить которые довольно просто с помощью современных методов диагностики. Из этого следует очень важный практический вывод: эти нарушения можно и необходимо корректировать медикаментозными средствами, что позволит уберечь людей от тяжелых осложнений на самых ранних стадиях развития болезни.

© Бурячковская Л.И.,

кандидат биологических наук

НИИ экспериментальной кардиологии,

лаборатория механизмов тромбообразования

© Масенко В.П.,

доктор медицинских наук

Институт клинической кардиологии им.А.Л.Мясникова,

отдел иммунологии

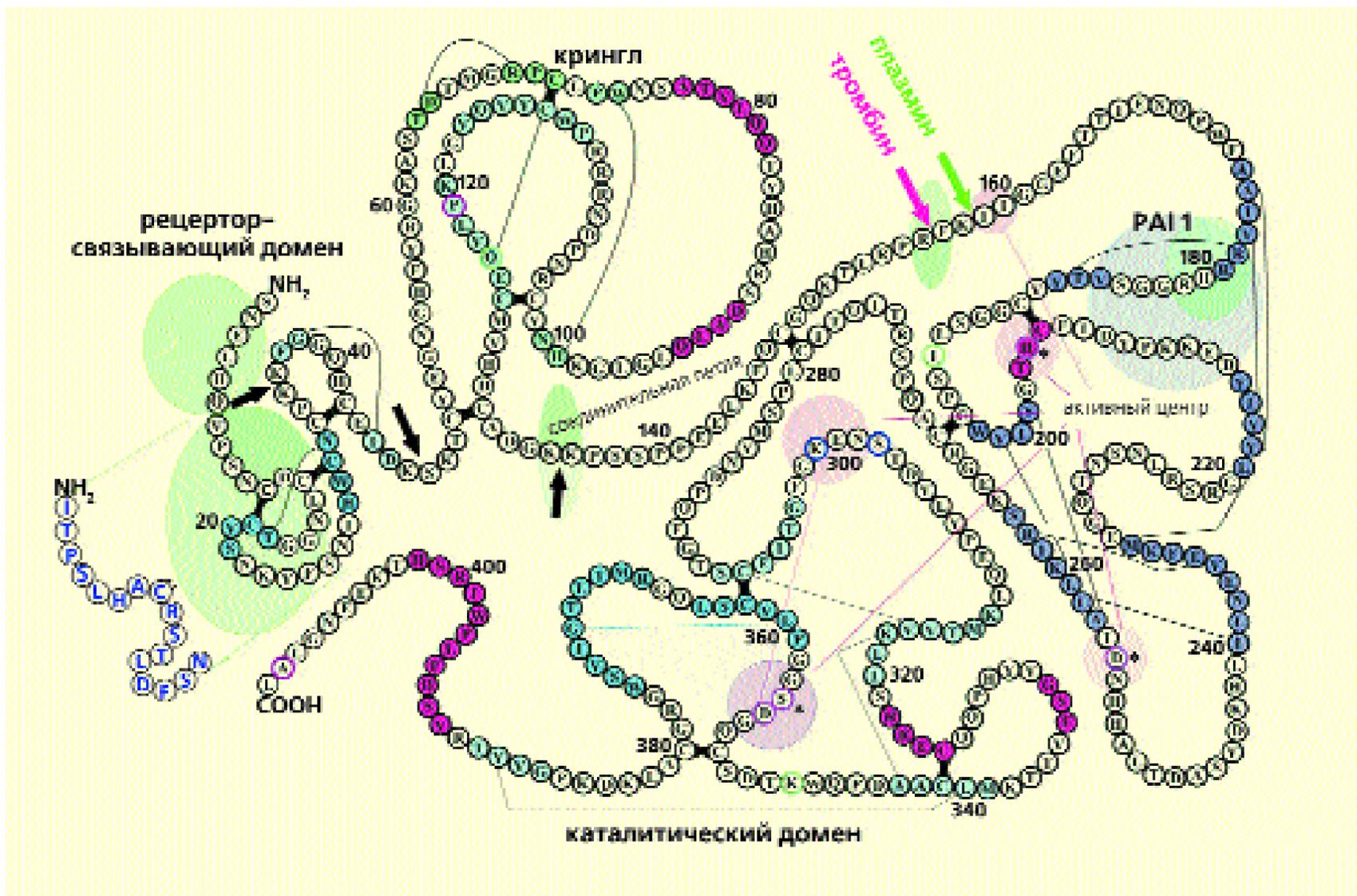
Тромболитический препарат пулолаза



В 2000 г. зарегистрирован и разрешен к применению первый отечественный генноинженерный тромболитический препарат пулолаза, разработанный в лаборатории генной инженерии Всесоюзного кардиологи-

ческого научного центра. Все началось в 1984 г., когда Е.И.Чазов предложил заняться созданием тромболитического препарата для лечения или, точнее, уменьшения зоны инфаркта миокарда, вызванного закупоркой (окклю-

зией) коронарной артерии тромбом. К тому времени уже использовались высокоэффективные тромболитики, такие как бактериальная стрептокиназа и урокиназа, выделяемая из мочи людей. Завершалась работа над



Полипептидная цепь проурокиназы человека. Аминокислотные остатки обозначены однобуквенными символами; α -спиральные элементы (красный цвет) вторичной структуры и β -слои (голубые, синие, зеленые и фиолетовые участки цепи) в нативной молекуле образуют «костяк» каждого из индивидуальных функциональных доменов: рецептор-связывающего (два зеленых овала) и каталитического. Последний в действительности состоит из двух субдоменов цилиндрической формы, скрещенных друг с другом (эти подробности структуры видны не здесь, а на трехмерных моделях) и образованных шестью (темно-синие и светло-синие) β -структурами каждый. В зоне контакта цилиндров находится активный центр (розовые круги со звездочкой) фермента. Проурокиназа может активироваться плазмином, расщепляться им (место расщепления отмечено зеленой стрелкой), и тогда образуется двухцепочечная урокиназа, в 1000 раз более активная по сравнению с проурокиназой. Если же на этот предшественник действует тромбин (красная стрелка), проурокиназа необратимо инактивируется. Плазмин может расщеплять во многих местах и саму урокиназу (черные стрелки). На рисунке показана также ингибиторная петля, где урокиназа связывается с необратимым ингибитором PAI 1. Измененный участок в рецептор-связывающем домене природной проурокиназы показан в виде зеленых овалов, рядом приведен N-концевой фрагмент пулолазы.

созданием генноинженерного (рекомбинантного) препарата — тканевого активатора плазминогена, предшественника современной альтеплазы. Еще в 70-х годах прошлого столетия в медицинскую практику (в основном промышленно развитых стран мира) была введена тромболитическая терапия. Благодаря этому смертность от инфаркта миокарда (одной из основных причин смерти человека) снизилась с 22–27% до 6–7%.

Инфаркт (зона некроза, гибели) развивается в ткани в течение 90–180 мин из-за кислородного голодания, вызванного нарушением кровообращения вследствие закупорки артерии. Закупорка в большей части случаев происходит за счет образования тромба из молекул фибрина и тромбоцитов в склерозированной артерии. В организме растворение тромба осуществляет фермент плазмин (протеолитический фермент из класса

сериновых протеаз), циркулирующий в кровяном русле в высокой концентрации, но в форме неактивного профермента плазминогена. В плазмин его переводят тоже сериновые протеазы — тканевой активатор и урокиназа, но тот и другая существуют в виде предшественников (проферментов, проактиваторов). Их концентрация в крови на четыре порядка меньше, чем плазминогена. Проурокиназа представляет собой одноце-

почечный белок из 411 аминокислотных остатков, организованных в несколько функциональных доменов. Она способна сама превращать плазминоген в плазмин, а тот, в свою очередь, рвет пептидную связь между 168-м и 169-м остатками проурокиназы. В результате образуется двухцепочечная урокиназа, которая в 1000 раз активнее профермента.

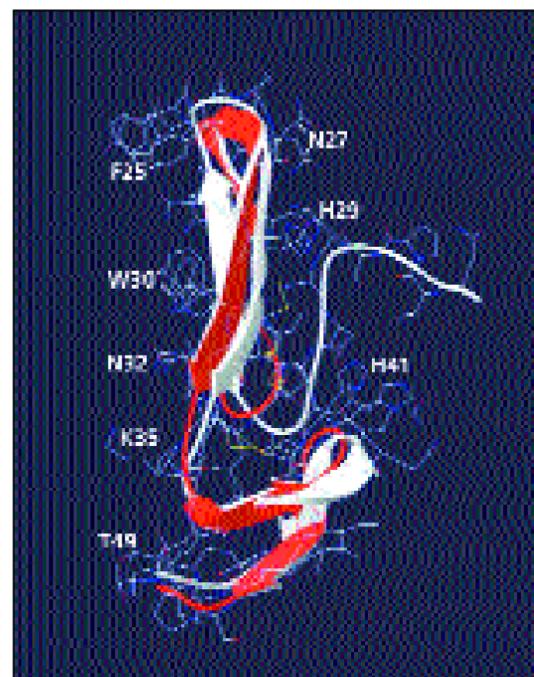
Как только тромб образовался, запускается каскад реакций, приводящий к фрагментации фибрина и, следовательно, к лизису кровяного сгустка, но происходит это медленно. Для быстрого (в течение часа) лизиса требуется концентрация активатора, на три порядка большая природной. Поэтому в кровотоке вводят дополнительный активатор, вырабатываемый, например, патогенными бактериями или кровососущими паразитами. К сожалению, такие активирующие плазминоген ферменты, как правило, нерегулируемы, низкоспецифичны (как следствие — высокотоксичны) и, естественно, иммуногенны. Тем не менее из-за их доступности они в основном и использовались, причем чаще других применялась бактериальная стрептокиназа. С наступлением эпохи геной инженерии был получен генноинженерный человеческий тканевой активатор плазминогена (уже упомянутый препарат альтеплаза, «Genentech», США). Несколько зарубежных фармацевтических компаний («Abbott», «Grünenthal», «Red-Cros») работали над созданием тромболитического препарата на основе проурокиназы.

И тканевой активатор плазминогена, и урокиназа участвуют не только в лизисе тромба. Они играют ключевую роль в регуляции эмбрионального развития, воспалительных процессов, в восстановлении тканей, заживлении ран, а урокиназа вместе с ее рецептором еще и в образовании кровеносных сосудов, возникновении опухолей и в метастазирова-

нии. Поэтому с самого начала проекта по разработке тромболитического средства была поставлена задача не воспроизводить природный вариант проурокиназы (в отличие от стратегии фирм «Abbott», «Grünenthal» и «Genentech»), а создать на ее основе молекулу активатора плазминогена с заданными свойствами, оптимальными для использования. Она должна сохранить протеолитические качества (специфичность и зимогенность) природного фермента и остаться чувствительной к инактивации ингибитором PAI1, макрофагами и печенью; не активироваться продуктами фибринолиза. Всего остального, связанного с пролиферацией и миграцией клеток, молекулу проактиватора нужно было лишить, а кроме того, заставить ее дольше жить, т.е. увеличить время ее полувыведения.

Известно, что урокиназа участвует в образовании опухолей и метастазировании, только соединившись со своим рецептором. Следовательно, нужно было как-то изменить именно тот участок ее полипептидной цепи, который предназначен для такой связи. Речь идет о рецептор-связывающем домене, охватывающем N-концевую область молекулы. Кроме него, в структуре есть еще другие функциональные единицы: крингл-домен (по-русски — крендель) и каталитический домен, состоящий из нескольких субдоменов. Именно первый домен, строением похожий на эпидермальный ростовой фактор, отвечает за взаимодействие с рецептором урокиназы и, как следствие, за все процессы, стимулирующие миграцию клеток и метастазирование опухолей. Следовательно, изменив структуру рецептор-связывающего домена, можно достичь желаемого результата.

Мы заменили в первом домене 24 аминокислотных остатка и получили молекулу проурокиназы с запланированными свой-



Трехмерные структуры рецептор-связывающего домена природной проурокиназы (белая цепь) и одна из двух наиболее вероятных расчетных структур того же участка в пулолазе.

ствами. Из-за замены она не взаимодействует с рецептором урокиназы и поэтому не вызывает побочных эффектов, связанных с регуляторными процессами. Как и планировалось, среднее время полувыведения модифицированного фермента из кровотока увеличилось: с 4 до 40 мин.

На основе молекулы с заблокированным рецептор-связывающим доменом был создан препарат пулолаза, который уже в течение нескольких лет используется в некоторых клиниках России при лечении инфаркта миокарда. Технологии получения субстанции и лекарственной формы были разработаны в НПП «Техноген» совместно с ЭПМБП. Стандартные токсикологические исследования проведены в лаборатории лекарственной токсикологии (руководитель Е.В.Арзамасцев, Кардиоцентр), а клинические испытания, которыми руководил М.Я.Руда (Кардиоцентр), выполнены в ряде клиник России. Так завершился первый этап проекта «Рекомбинантная проурокиназа».

По эффективности восстановления коронарного кровотока пулолаза не уступает актилизе, известному стандарту тромболитической терапии, составляя 70–80%. Но количество случаев повторной закупорки артерии (тромботических реокклюзий) снижено по сравнению с актилизой: 4–5% вместо 10–15%. Уменьшается также число геморрагических осложнений — 9% против 26% (учитывались все типы кровотечений, «большие» и «малые»). Препарат малотоксичен и неиммуногенен, не проявляет мутагенных и тератогенных свойств.

Ясно, что пулолаза предназначена для догоспитальной терапии (в машине скорой помощи). Чем раньше подействует тромболитический препарат и, растворив тромб, восстановит кровотоки, тем меньше будет зона инфаркта и тем меньше последствия тромбообразования, а значит, и риск смерти (при инфаркте миокарда или мозга). К большому огорчению, машины скорой помощи пока не имеют пулолазы, применению тромболитика препятствуют главным образом организационные трудности, характерные для здравоохранения нынешней

России. В результате смертность от инфаркта миокарда остается на уровне 17–27%, а с препаратом могла бы составлять 5%. Речь идет о жизни примерно 30 тыс. человек ежегодно.

На основании той же модифицированной структуры получен препарат для лечения некоторых офтальмологических заболеваний, зарегистрированный как гемаза. Он быстро вошел в медицинскую практику. Проводятся испытания препаратов на основе генноинженерной проурокиназы для лечения периферических тромбозов, тромбоэмболии, инсульта и др.

© Бибилашвили Р.Ш.,

кандидат физико-математических наук
НИИ экспериментальной кардиологии,
лаборатория генной инженерии

О природе первичной гипертензии



Гипертоническая болезнь (первичная, или эссенциальная, гипертензия) остается одной из наиболее важных медицинских и социальных проблем. Она проявляется в основном как «беспричинное» стойкое повышение артериального давления, опасное тяжелыми осложнениями. В их числе нарушения мозгового кровообращения, мозговые кровоизлияния, сердечная или почечная недостаточность, инфаркт миокарда. Первичной гипертензией страдает примерно 15% человечества, а летальный исход от сердечно-сосудистой патологии, связанной с гипертонией, превышает смертность от всех остальных причин.

Предполагают, что болезнь обусловлена главным образом действием каких-то мощных средовых факторов. К ним относят как хроническую нервно-психическую перегрузку, так и другие неблагоприятные воздействия внешней среды, по-ви-

димому, еще не полностью распознанные.

Несмотря на прогресс в биологии и медицине, до последнего времени не сформировалось единого представления о патогенезе первичной гипертензии, равно как и о ее генетических основах. Изучение этиологии и патогенеза на экспериментальных моделях болезни позволяет глубже понять и патогенетические особенности ее развития, и механизмы наследования.

Наиболее известная и используемая в лабораториях всего мира экспериментальная модель гипертонической болезни — спонтанная гипертензия крыс. В 50-х годах прошлого столетия в Японии, в университете Киото, группой ученых была выведена чистая линия этих животных, у которых с возрастом развивается артериальная гипертензия, удивительно похожая на гипертоническую болезнь человека. Именно крысам этой линии человечество обяза-

но появлением большинства лекарств, снижающих артериальное давление.

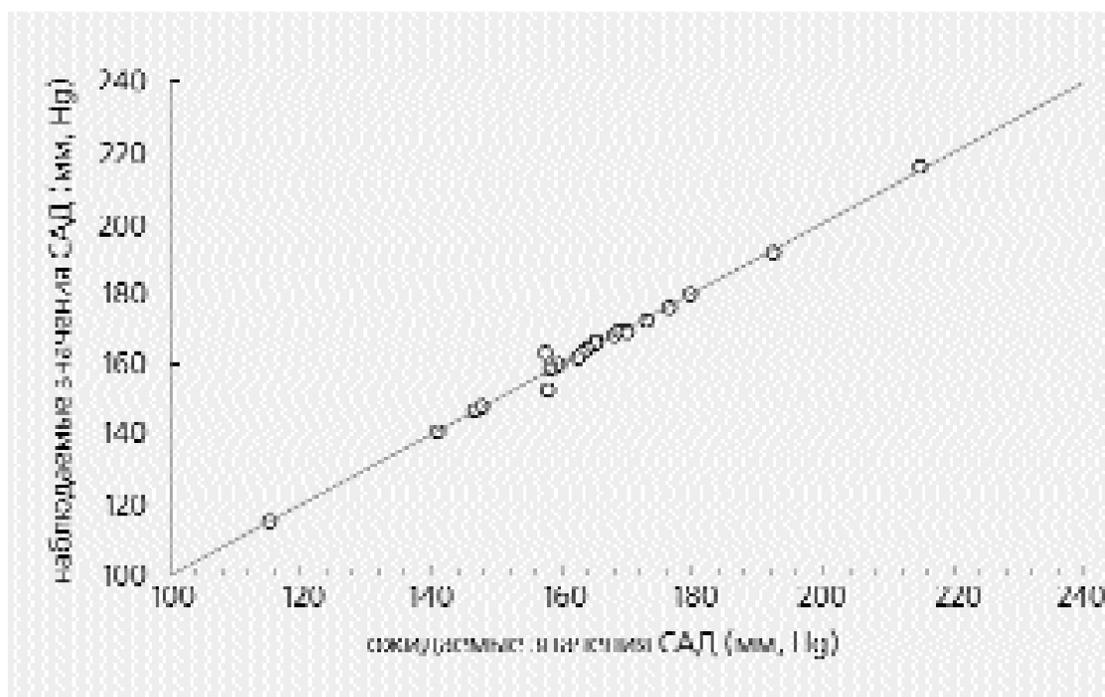
В РКНПК, в лаборатории артериальной гипертензии, уже более 40 лет поддерживается колония крыс со спонтанной гипертензией. Мы использовали их в экспериментах по выяснению генетической обоснованности этой болезни, для чего занялись гибридизацией.

Сначала скрестили самок крыс со спонтанной гипертензией и самцов линии с нормальным давлением и, получив гибриды первого поколения, скрестили их между собой. В результате появились гибриды второго поколения, у которых, как известно, фенотипические признаки расщепляются по закону Менделя. Изучив у этих гибридов разные проявления фенотипа и сопоставив их с уровнем артериального давления, мы обнаружили, что между ним и некоторыми биохимическими показателями (содержанием бел-

ков в эритроцитарной мембране; активностью калиевых каналов, контролируемых ионами кальция) существует взаимная зависимость. Другими словами, уровень артериального давления у того или иного животного зависит от количественного содержания ряда мембранных белков и активности каналов.

Мы многократно пытались определить генетические детерминанты клинического и экспериментального вариантов первичной гипертензии и выявить особенности, отличающие эту патологию человека от других наследуемых заболеваний. Но все попытки оказались безуспешными. Однако они дали нам основание предположить, что гипертоническая болезнь не обусловлена повреждениями каких-либо конкретных генов, а связана с наследуемыми перестройками ретротранспозонов (повторяющихся мобильных элементов генома) или их кластеров.

В геноме животных, в том числе человека, такие элементы (их называют также повторами) составляют около 20% молекулы ДНК и участвуют в формировании ее третичной структуры и управлении синтезом белков. Умеренные повторы способны перемещаться по геному, и чтобы проанализировать их распределение, был разработан метод «СКАН». Мы изучали, как распределены кластеры ID-повтора в геноме крысиных гибридов второго поколения. На полученных с помощью СКАНа электрофореграммах видны полосы, которые содержат интересные нас кластеры и которые удастся соотнести не только с уровнем артериального давления, но и с полом животного, содержанием структурных мембранных белков эритроцитов и активностью ионных — калиевых — каналов. Другими словами, у исследованных гибридов прослеживалась выраженная взаимосвязь между характером распределения кластеров ID-повтора и проявления-



Прогнозирование уровня артериального давления у крысиных гибридов второго поколения по распределению полос на электрофореграмме. САД — систолическое артериальное давление.

ми наследуемого гипертонического фенотипа.

Таким образом, выстроилась цепочка: изменения в геноме, связанные с перераспределением повторов → количественные изменения в белковом составе мембран → изменения активности ионных каналов и развитие мембранного дефекта → повышенное артериальное давление. Однако в этой схеме остается неясным этап, начинающийся с развития мембранного дефекта. Такой дефект возникает из-за падения ионного и электрохимического градиентов на клеточной мембране. В нормально работающей клетке поддерживается неравновесие между внеклеточным и внутриклеточным пространством, и на это уходит до 20–30% энергии, вырабатываемой в организме в виде АТФ. При снижении градиентов концентрации часть энергии становится лишней, что теоретически должно привести к перегреву и смерти клетки. Но этого не происходит. Куда же сбрасывается избыток энергии?

Как выяснилось в экспериментах, она никуда не сбрасывается, наоборот, в тканях крыс со спонтанной гипертензией су-

ществует энергетический дефицит. Об этом свидетельствуют многочисленные отклонения ряда показателей энергетического клеточного баланса, таких, например, как сниженный энергетический заряд, уменьшенное отношение АТФ/АДФ и др. Видимо, именно дефицит играет ключевую роль в развитии первичной гипертензии.

В дальнейшем удалось понять, почему возникает недостаток: он обусловлен нарушением АТФ-синтетической функции митохондрий. Мы обнаружили, что в митохондриях печени и мозга крыс со спонтанной гипертензией скорость синтеза АТФ существенно ниже, чем у животных с нормальным давлением. Наиболее вероятная причина подавления синтеза АТФ — перегрузка митохондрий ионами кальция, возникающая вследствие нарушенной мембранной регуляции этого иона.

Итак, в механизме развития гипертензии появляется новое звено — энергетическое. Теперь развитие болезни схематически можно представить следующим образом.

Перемена местоположения повторов в геноме вызывает изменения в содержании мемб-

ранных белков. Это приводит к смещению градиентов ионных концентраций, в частности, к повышенному уровню внутриклеточного кальция. За счет такого роста усиливается транспорт ионов кальция в митохондрию, при этом угнетается синтез АТФ, так как оба процесса используют один и тот же источник энергии — перенос

электронов. В результате снижается концентрация АТФ в нервных клетках, что влечет за собой относительную гипоксию головного мозга (его масса у человека составляет около 2% от массы тела, а потребление мозгом энергии, запасаемой организмом в виде АТФ, достигает 20%). В ответ на возникший недостаток кислорода повыша-

ется системное артериальное давление.

Так мы интерпретируем полученные нами результаты, но, видимо, могут быть и другие объяснения. Как бы то ни было, в проведенных исследованиях сделан ряд находок, которые могут изменить представление о природе первичной гипертензии.

© Постнов А.Ю.,

кандидат медицинских наук
НИИ экспериментальной кардиологии,
лаборатория медицинской генетики

Роль механочувствительности эндотелия в регуляции тонуса сосудов



Свойство артериальных сосудов расширяться в ответ на увеличение скорости кровотока, открытое в 1978 г. словацким физиологом В.Смиешко вместе с нашим соотечественником В.М.Хаютиным, сегодня общеизвестно и подробно изучено. Тогда же, более четверти века назад, многие исследователи сочли полученный авторами результат артефактом. Дело в том, что практически во всех сосудах течение крови ламинарное, и скорость кровотока убывает от максимальной величины, достигаемой на оси, до нуля у стенки. Иными словами, вблизи сосудистой стенки кровь практически неподвижна независимо от скорости кровотока в сосуде. Это обстоятельство мешало большинству физиологов представить, что стенка способна каким-то образом узнавать об увеличении кровотока в просвете сосуда.

Тем не менее, стенка может получать такую информацию. Она ей передается, как предположил еще в середине 60-х годов прошлого века С.Родбард, в виде силы вязкого трения. Эта сила, действующая со стороны

крови на единицу внутренней поверхности стенки (напряжение сдвига τ), пропорциональна объемной скорости кровотока Q , вязкости крови η и обратно пропорциональна кубу диаметра сосуда d :

$$\tau = \frac{32}{\pi} \frac{\eta Q}{d^3}.$$

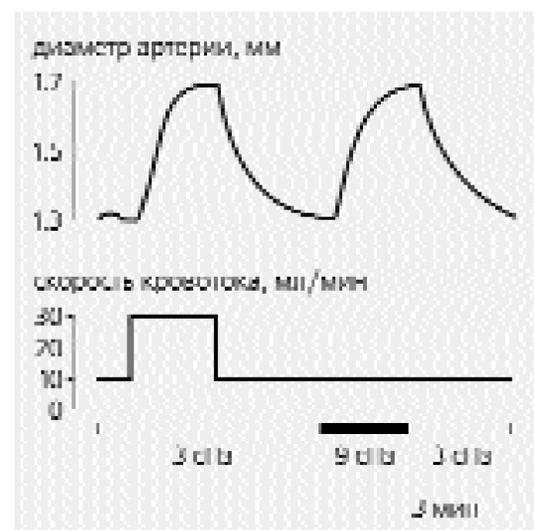
Понятно, что, измеряя напряжение сдвига, стенка сосуда фактически измеряет протекающий по нему кровоток.

По мнению Родбарда, напряжение сдвига должно восприниматься клетками стенки, непосредственно контактирующими с кровью, т.е. клетками эндотелия. Но и эта гипотеза казалась весьма сомнительной, так как в те времена монослой клеток эндотелия, выстилающий внутреннюю поверхность сосудов и камер сердца, считали лишь пленкой, препятствующей проникновению форменных элементов крови в сосудистую стенку и предотвращающей внутрисосудистое свертывание. Однако когда в 1980 г. Р.Фурчготт заметил, что некоторые сосудорасширяющие вещества (ацетилхолин, АТФ, брадики-

нин, гистрамин и т.д.) расслабляют гладкие мышцы только при нормально функционирующем эндотелии, стало ясно, что он активно участвует в регуляции тонуса сосудов. Всего год спустя Смиешко нашел дополнительное тому подтверждение, установив, что при увеличении скорости кровотока артерии расширяются также, только когда эндотелий в норме. Такой результат вполне соответствовал гипотезе Родбарда. Правда, нужно было доказать, что эндотелий измеряет именно напряжение сдвига на стенке и что именно эта сила «информирует» сосудистую стенку о величине кровотока в артерии, чем мы и занялись в 1981 г., работая в возглавляемой В.М.Хаютиным лаборатории биомеханики и регуляции кровообращения Всесоюзного кардиологического научного центра.

Чтобы убедиться в этом, достаточно было установить, что артерии расширяются не только в ответ на повышение кровотока, но и на увеличение вязкости крови при неизменном ее расходе. Ведь, как следует из приведенной выше формулы, напря-

Изменения диаметра бедренной артерии кошки в ответ на трехкратное (с 10 до 30 мл/мин) увеличение расхода крови и на трехкратное (с 3 до 9 сПз) повышение ее вязкости при неизменном кровотоке. Вязкость повышали, увеличивая концентрацию эритроцитов (этот период отмечен черным прямоугольником под записью). В течение эксперимента давление в артерии было постоянным и составляло 100 мм рт. ст. Видно, что повышение расхода и вязкости крови одинаковой кратности вызывает одинаковое (как по величине, так и по динамике) расширение артерии.



Расширяя сосуды

жение сдвига пропорционально произведению расхода жидкости Q и ее вязкости η . Поэтому если диаметр действительно регулируется соответственно напряжению сдвига, то артерии должны одинаковым образом отвечать на увеличение как расхода крови, так и ее вязкости (при неизменном расходе).

Мы выяснили, что магистральные артерии расширяются в ответ на повышение вязкости крови (причем эта их способность также реализуется только при интактном эндотелии), и что при одинаковой кратности увеличения расхода и вязкости ответы артерий идентичны. Так, установив, что артерии — не только «проточные расходомеры», но и «проточные вискозиметры», мы подтвердили справедливость предположения Родбарда: клетки эндотелия механически чувствительны; измеряя напряжение сдвига, они регулируют в соответствии с этой величиной тонус сосудистых гладких мышц.

Позднее нам удалось показать, что клетки эндотелия измеряют напряжение сдвига в виде сдвиговых деформаций. Выяснилось, что чем жестче клетка эндотелия, тем меньшее расширение артерии вызывает одно и то же увеличение кровотока. Деформируясь, клетки эндотелия выделяют либо фактор расслабления — оксид азота, либо пока не идентифицированный фактор гиперполяризации, либо и то, и другое одновременно. В любом случае гладкие мышцы

расслабляются, что приводит к увеличению диаметра сосуда.

Таким образом, установлена последовательность процессов, обеспечивающих один из видов регуляции артериальных сосудов: **увеличение кровотока** → рост напряжения сдвига на эндотелии → сдвиговая деформация клеток эндотелия → выделение расслабляющего фактора (факторов) → расслабление гладких мышц → **расширение артерии** → уменьшение напряжения сдвига до новой равновесной величины.

Сейчас благодаря многочисленным исследованиям известно, что в ответ на повышение скорости кровотока (или, что то же самое, напряжения сдвига) диаметр артерий, и артериол увеличивается весьма значительно. Не вдаваясь в подробности, скажем, что эта регуляция обеспечивает такие изменения гидравлического сопротивления артериальных сосудов, что при прокачивании через сосуд многократно возросшего количества крови плата (перепад давлений на сосуде) за ее транзит по такому «трубопроводу» не увеличивается. Естественно, что столь значительные изменения сопротивления сосудов должны быть функционально значимы, и важно было понять физиологическое значение этой регуляции.

Первоначально предполагали, что расширение артерий при увеличении кровотока необходимо лишь для того, чтобы обеспечить адекватное кровоснаб-

жение интенсивно работающих органов (главным образом, скелетных мышц). Действительно, при переходе органа от состояния покоя к деятельности сначала расширяются мельчайшие прекапиллярные артериолы, что приводит к двух-трехкратному увеличению кровотока во всех сосудах работающего органа. Однако при интенсивной работе органа кровотока в нем увеличивается в десятки раз. Очевидно, что расширения только мелких артериол для достижения такого увеличения кровотока недостаточно: надо, чтобы увеличились в диаметре (и притом значительно) более крупные артериальные сосуды, вплоть до магистральных артерий. Расширение этих сосудов в интенсивно работающем органе обеспечивается именно способностью их эндотелия расслаблять гладкие мышцы в ответ на повышение напряжения сдвига на стенке. Таким образом, очевидно, что этот механизм регуляции должен играть важную роль в увеличении кровоснабжения работающих органов.

Однако этим функции регуляции сопротивления сосудов в соответствии с напряжением сдвига отнюдь не исчерпываются. Вновь обратимся к формуле и отметим, что в знаменателе стоит третья степень диаметра, а это значит, что напряжение сдвига на эндотелии сильно возрастает при сужении сосуда. Отсюда ясно, что чувствительность эндотелия к напряжению сдвига должна ослаблять сосу-

досуживающие реакции и препятствовать развитию спазма. Такой противосуживающий эффект регуляции тонуса мы продемонстрировали в экспериментах как на отдельной артерии, так и на сосудистом русле целого органа. Кроме того, согласно выдвинутой В.М.Хаютиным гипотезе, способность механочувствительности эндотелия ослаблять сосудосуживающие реакции может являться фактором, препятствующим развитию артериальной гипертонии.

Далее. Известно, что при окклюзии (закупорке) какой-либо магистральной артерии снабжаемая ею ткань начинает полу-

чать кровь по обходным путям — коллатеральным сосудам. При нормальной пропускной способности основной артерии коллатеральные сосуды практически закрыты. Однако в первые же секунды после окклюзии питающей орган артерии они начинают расширяться, и от степени их расширения в первые минуты после окклюзии зависит выживание органа, а порой и всего организма. Механизм, обеспечивающий эту острую стадию развития коллатерального кровоснабжения органов, долгие годы был предметом дискуссий. Нам удалось выяснить, что расширение коллатералей в первые минуты после

окклюзии магистральной артерии происходит именно благодаря способности эндотелия расслаблять гладкие мышцы в ответ на увеличение напряжения сдвига на стенке сосудов.

В короткой заметке невозможно даже просто перечислить все ситуации, когда регуляция сопротивления сосудов в соответствии с напряжением сдвига на стенке играет основную роль в осуществлении фундаментальных физиологических реакций. Однако, как нам кажется, и этих примеров достаточно, чтобы оценить роль механочувствительности эндотелия в регуляции сердечно-сосудистой системы.

© Мелькумянц А.М.,

доктор биологических наук

© Балашов С.А.,

кандидат биологических наук

НИИ экспериментальной кардиологии,

отдел физиологии

Нейрогенные механизмы сосудистого тонуса



Если бы инженеры построили нефтепровод исключительно из последовательно соединенных вентилях, вряд ли такую конструкцию сочли бы удачной даже самые доброжелательные эксперты. Однако при создании кровеносной системы живой организм пошел именно по такому пути. Можно представить себе, насколько сложным должно быть управление этой обширной и разветвленной транспортной сетью и распределенными регуляторами потока.

В норме артерии никогда не бывают полностью открытыми из-за постоянного напряжения (тонуса) гладких мышц сосудистой стенки, которое в значительной степени связано с нейрогенным сосудосуживающим (вазоконстрикторным) воздействием.

С точки зрения инженера, транспортная система с постоянно «поджатыми» трубами весьма неэффективна. Тем не менее в нормальных условиях (и даже во сне) артерии всегда сужены и заставляют сердце работать против сил трения. Постоянно посылая вазоконстрикторные сигналы, нервная система бдительно следит за поддержанием столь неэффективного режима транспорта крови. Разумеется, эти и другие странности работы кровеносной системы говорят не о причудах природы, а о несовершенстве наших знаний.

Регуляцию сосудистого тонуса изучают по двум основным направлениям. Первое связано с авторегуляторными (местными гуморальными, метаболическими) механизмами, работа-

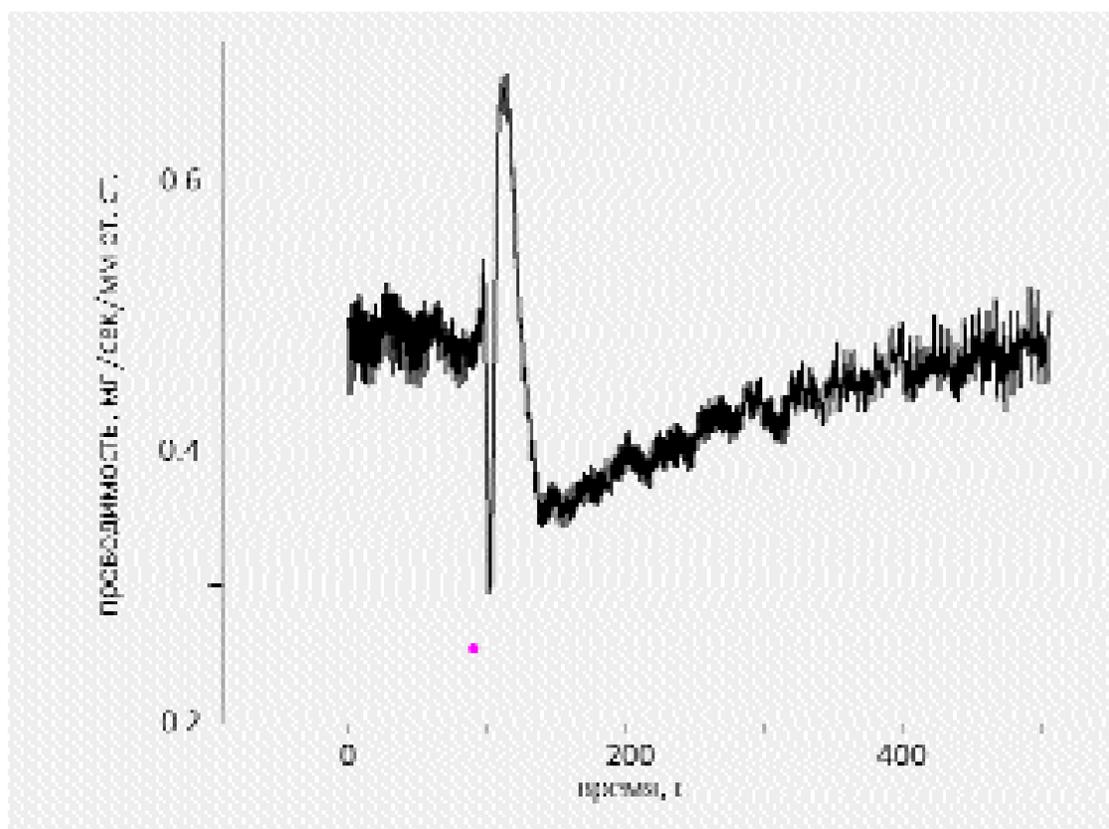
ющими независимо от нервной системы. В этой области значительным достижением стало открытие роли оксида азота (NO) как универсального фактора расширения (дилатации) артерий. Оксид азота синтезируется непосредственно в артериях и высвобождается в просвет сосуда при увеличении сдвигового напряжения на внутренней стороне сосудистой стенки, вызываемом повышением скорости движения крови.

Наблюдаемое в экспериментах кратковременное расширение денервированных сосудов при инъекции сосудосуживающего агента (фенилэфрина) свидетельствует о мощной местной сосудорасширяющей реакции. В покоящейся мышце метаболиты (молочная кислота, гис-

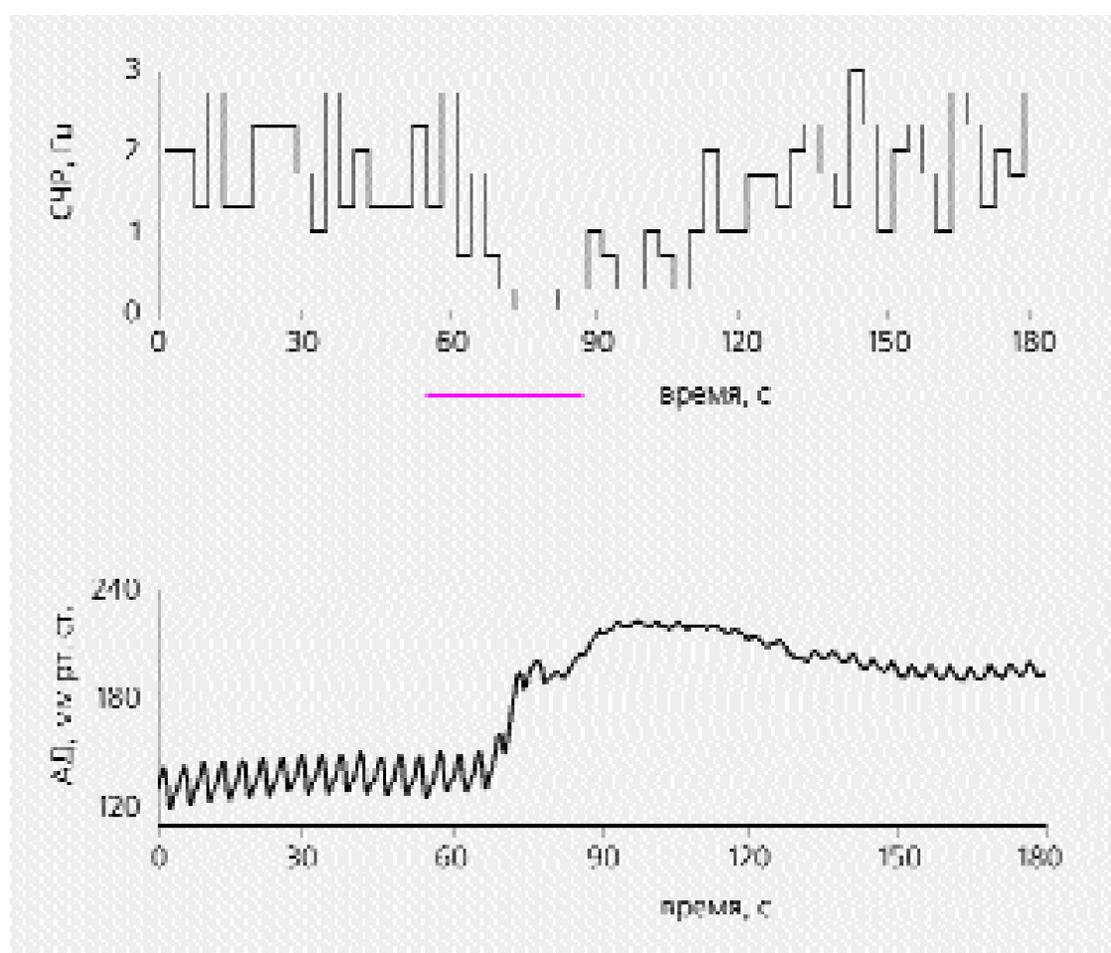
тамин, ионы калия, пуринергические фосфаты и др.), вызывающие дилатацию (расширение) сосудов, не выделяются. Наиболее вероятно, что расширение артерий связано с действием оксида азота¹. Действительно, в таком эксперименте оба фактора (рост артериального давления и сужение артерий) резко повышают сдвиговое напряжение на сосудистой стенке уже в самом начале инъекции фенилэфрина. Скачок давления в покое (например, при некоторых видах стресса или в предстартовом состоянии спортсмена) приводит к кратковременному раскрытию артерий. Видимо, такая реакция ограничивает рост давления. Одновременно с авторегуляторной дилатацией тормозится нейрогенная сосудосуживающая активность, что усиливает расширение сосудов. Таким образом, организм защищается от резкого скачка давления как минимум двумя быстрыми способами: местным авторегуляторным и генерализованным нейрогенным. Возможность ограничить рост давления путем увеличения просвета сосудов существует лишь в том случае, если в исходном состоянии артерии раскрыты не полностью. Значит, тонически сжатые артерии — плохое транспортное средство, но хороший демпфер, защищающий организм (в первую очередь мозг) от резких перепадов давления.

Другой физиологический смысл быстрой дилатации артерий при росте давления (например, при стрессе) может заключаться в их подготовке к последующей физической нагрузке. Скачок артериального давления, инициируемый выбросом адреналина при стрессе, приводит к быстрому расширению артерий. Дальнейшее их состояние будет определяться действиями организма: в покое их проводимость снизится, а при мышечной работе она ос-

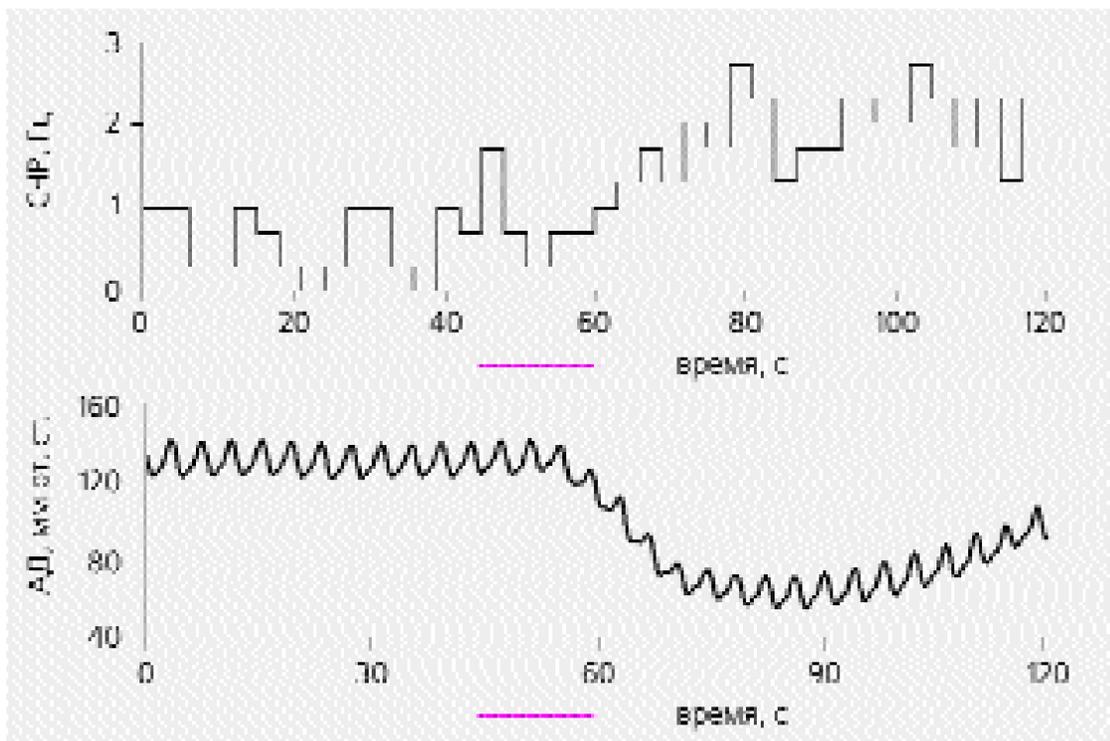
¹ Мелькумянц А.М., Балашов С.А., Картамышев С.П. // Физиол. журн. 1996. Т.82. №1. С.93—101.



Влияние фенилэфрина на суммарную проводимость (γ) денервированных артерий задних конечностей кошки. На фоне сосудосуживающего действия препарата наблюдается кратковременное расширение артерий, проявляющееся в виде роста кривой. Момент инъекции показан точкой.



Зависимость средней частоты разрядов одиночного вазоконстрикторного С-волокна седалищного нерва кошки от артериального давления (АД), вызванного фенилэфрином (40 мкг/кг). Цветом отмечен период внутривенной инъекции фенилэфрина. Начальный скачок давления при действии фенилэфрина временно прекращается как раз в то время, когда развиваются обе компенсаторные реакции. СЧР — средняя частота разрядов.



Изменение средней частоты разрядов одиночного вазоконстрикторного С-волокна при падении артериального давления, вызванном нитропруссидом натрия (30 мкг/кг). Период внутривенной инъекции химического агента показан отрезком.

танется высокой благодаря комплексу реакций, называемых совокупно рабочей гиперемией. В отличие от вазоконстрикторных нейронов, которым для достижения эффекта достаточно на некоторое время прекратить импульсацию, реализация гуморальной реакции требует определенного ресурса (например, накопленного NO). Гуморальная дилатация — краткосрочное событие: она заканчивается существенно (на несколько минут) раньше периода повышенного давления, а ее возобновление требует определенного времени (видимо, для восполнения запаса NO).

Второй способ изучения кровеносной системы связан с анализом работы центральной нервной системы (ЦНС), которая располагает несколькими путями регуляции сосудистого тонуса в организме. Рассмотрим особенности нейрогенной регуляции тонуса артерий скелетных мышц, связанные с изменениями артериального давления в покое. Повышение и понижение давления фармакологическими средствами (соответственно фенилэфрином и нитро-

ропруссидом натрия) вызывает противоположные изменения частоты разрядов констрикторных нейронов. В первом случае активность нейронов ослабевает и артерии расширяются, а во втором — активность усиливается и сосуды сужаются. Это типичный пример барорефлекса, стабилизирующего давление по механизму отрицательной обратной связи. Его инициируют сигналы специальных механорецепторов, расположенных на обеих сонных артериях у входа в головной мозг. Барорефлекс предохраняет мозг от резких колебаний давления. При относительно длительном (несколько минут) повышении артериального давления активность вазоконстрикторных нейронов ослабевает и снижается гораздо раньше — уже через 30–60 с. Затем частота их разрядов возвращается к исходному уровню, несмотря на повышенное давление. Напротив, при снижении давления нитропруссидом вазоконстрикторная активность усиливается и остается такой в течение всего периода пониженного давления. Налицо «асимметрия» в длительности

реакции вазоконстрикторной системы на противоположные изменения артериального давления.

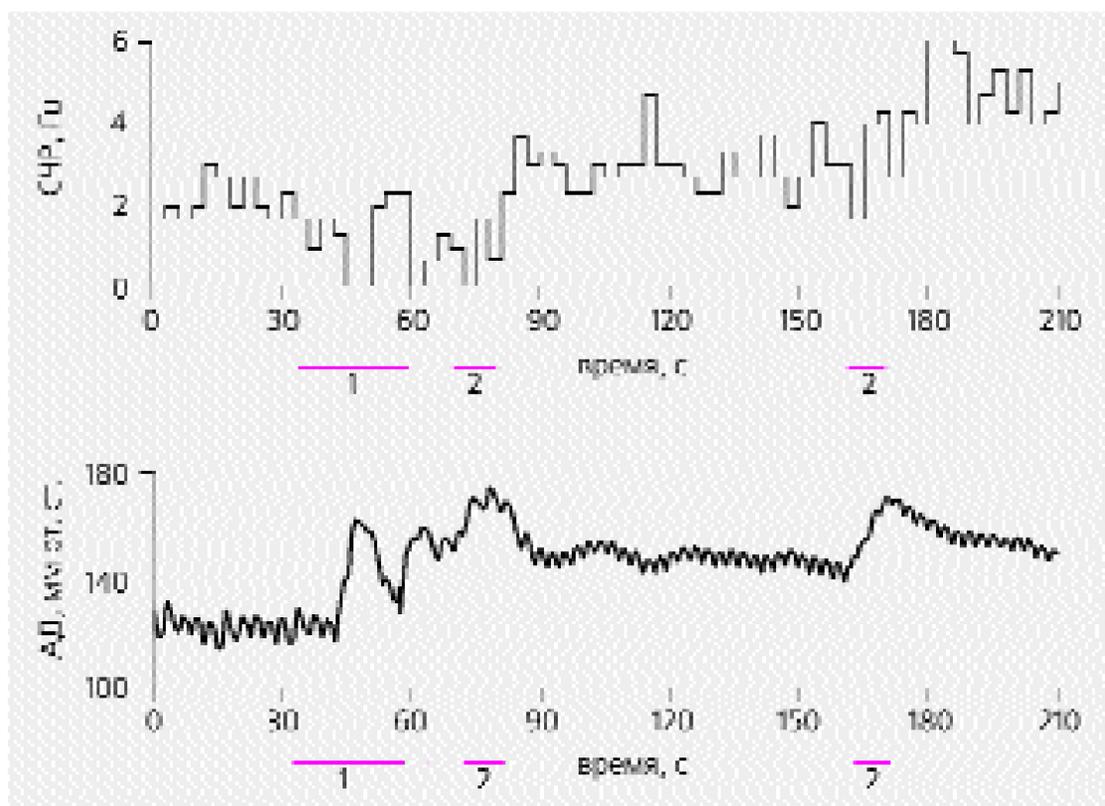
В наших опытах такая асимметрия усиливалась на фоне повышенного фенилэфрином давления при индуцировании кратковременных возмущений давления путем пережатия брюшной аорты. В норме (без фенилэфрина) аккумуляция вазоконстрикторной активности отсутствует. Значит, вазоконстрикторная составляющая системы барорефлекторной стабилизации давления несимметрична и направлена в сторону повышения сосудистого тонуса. Эффект этот усиливается при наличии в крови фенилэфрина, что соответствует выбросу катехоламинов при стрессе. Опыты позволяют предположить, что хронический стресс способствует стойкому повышению вазоконстрикторной активности и ведет к артериальной гипертензии. Возможно, что с барорефлекторной асимметрией связан хорошо известный медицинский факт: гипертония — более распространенное заболевание, чем гипотония. Стабилизация давления на входе в головной мозг проливает свет на существование постоянной нейроконстрикторной активности и самого сосудистого тонуса: вероятно, такой режим работы нейронов и артерий помогает быстро компенсировать резкие колебания давления. В то же время эта система склонна к «перекосу» в пользу патологического усиления нейроконстрикторной активности. Имеются ли в организме какие-то пути для коррекции ошибок в работе вазоконстрикторной системы?

В физиологии известно, что наряду с сосудосуживающими нервами имеются и сосудорасширяющие, влияние которых исследовано существенно меньше. Наблюдаемая в последнее время тенденция к занижению регуляторной роли нейрогенной дилатации вызвана скорее

всего тем, что сосудорасширяющие нейроны скелетных мышц неактивны или малоактивны в покое или при наркозе. Их разряды отмечали только при непосредственной электрической стимуляции некоторых структур гипоталамуса, т.е. в условиях, весьма далеких от физиологических¹. При попытке обнаружить сигналы таких тонически неактивных (или малоактивных) нейронов возникают существенные методические трудности. Дело в том, что сигналы одиночных нервных волокон регистрируют от механически выделенных микропучков, что связано с травмированием нервного ствола. При этом в нерве нарушается кровоснабжение, что весьма быстро вызывает блокаду сигналов некоторой части нервных волокон. Возникает вопрос — связано ли отсутствие сигналов в исследуемом микропучке с его повреждением или же с нормальным неактивным состоянием искомого (например, дилататорных) волокон.

Мы нашли способ, позволяющий отличить интактный (неповрежденный), но неактивный микропучок от пораженного (тоже неактивного) микропучка. Идея метода заключается в том, что в окрестности неактивного, но «живого» микропучка в нервном стволе имеются волокна, активные в покое. Их сигналы передаются на исследуемый микропучок как своего рода электрическая наводка. Сигналы соседних активных волокон неразличимы при просмотре нейрограмм, но их можно выявить с помощью спектрального анализа электрического шума нервного микропучка. Наличие интактных соседних волокон скорее всего говорит, что анализируемый микропучок тоже «живой», поэтому в нем можно пытаться обнаружить сигналы с помощью дополнительных манипуляций (например, повышая давление

¹ Jänig W. // Rev. Physiol. Biochim. Pharmacol. 1985. V.102. P.119—213.

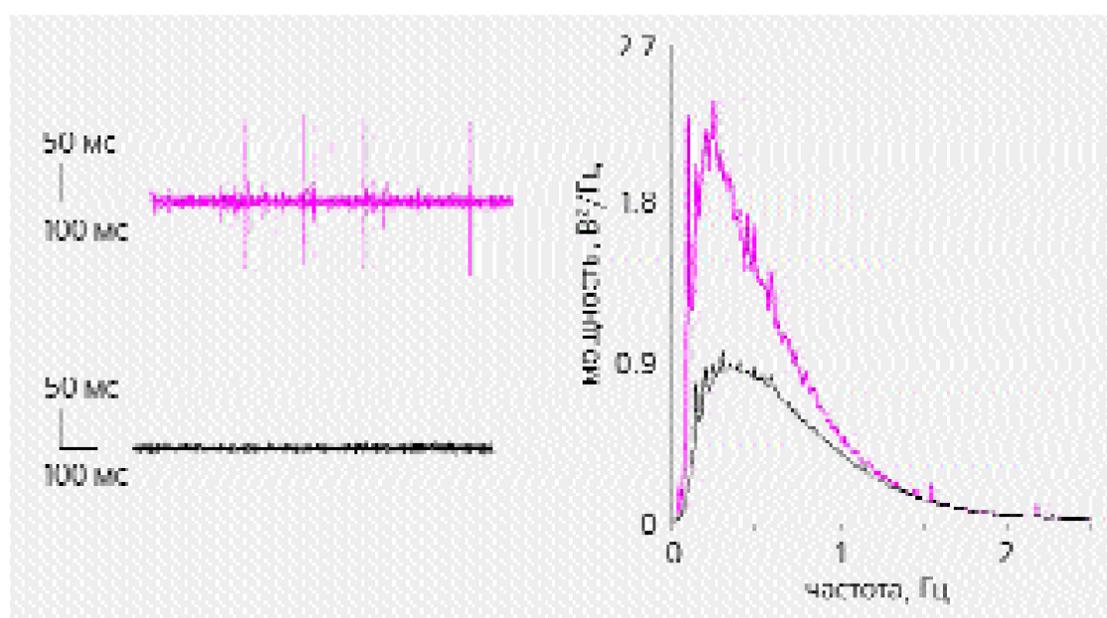


Влияние фенилэфрина и пережатия брюшной аорты на среднюю частоту разрядов вазоконстрикторного нейрона. Отрезком 1 отмечена инъекция препарата, отрезками 2 — пережатие брюшной аорты.

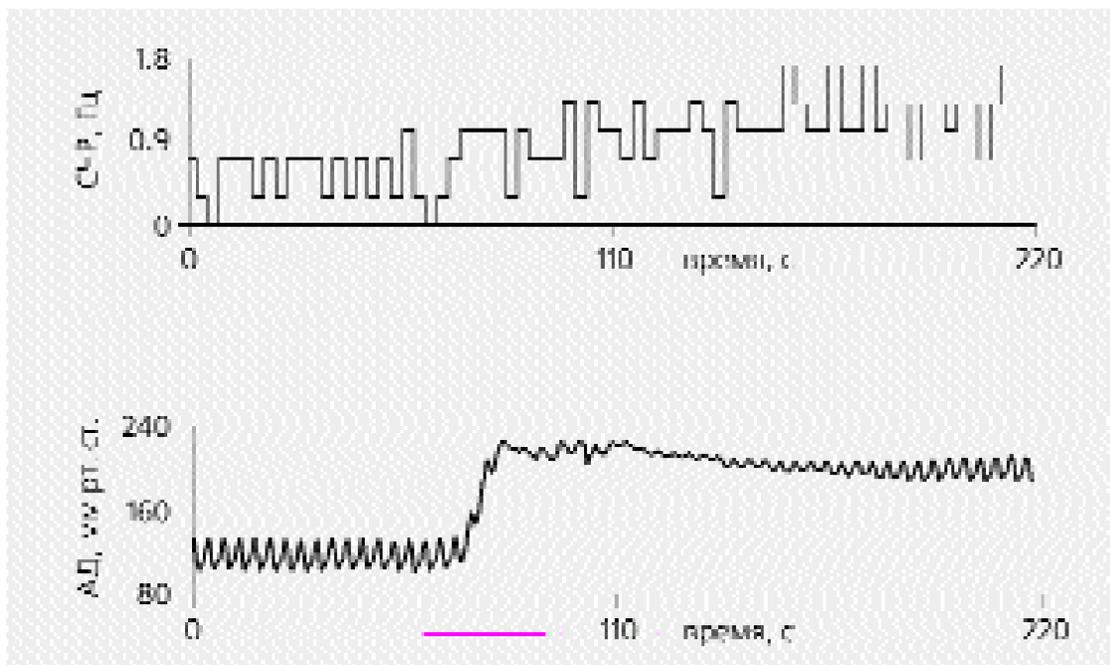
химическим агентом). Анализ шумов микропучков позволяет отбраковывать поврежденные волокна и находить интактные, неактивные или малоактивные в покое. Обнаружив такой пучок, можно стимулировать ней-

рогенные механизмы регуляции сосудистого тонуса (например, фенилэфрином), чтобы найти функционально специализированные нервные волокна.

Благодаря этому методу мы обнаружили эфферентные ней-



Нейрограммы интактного (показано цветом) и поврежденного микропучков (сопротивление пучков одинаково, ~500 кОм). Справа — спектры их мощности (участки с потенциалами действия интактного микропучка не анализировали). Спектр шума поврежденного микропучка в точности совпадает со спектром теплового шума резистора, равного сопротивлению микропучка. Электрический шум интактного микропучка (без учета нервных импульсов) в несколько раз превышает тепловой шум эквивалентного сопротивления.



Разряды эфферентного волокна С-нейрона скелетной мышцы (предположительно вазодилататора), которые усиливались при повышении давления фенилэфрином (внизу). Период внутривенной инъекции указан отрезком.

роны с нулевой или низкой разрядной активностью в покое. Повышенная активность подобных нейронов сохранялась в течение нескольких минут на фоне высокого давления. Предполагая, что ЦНС противодействует росту давления, не только снижая активность вазоконстрикторных, но и усиливая активность вазодилаторных нейронов, эти разряды следует рассматривать как потенциально дилаторные. Если это так, то на фоне прямого суживающего эффекта фенилэфрина че-

рез 2–3 мин после его инъекции сосуды должны начать расширяться. Анализ гемодинамической проводимости денервированных и иннервированных сосудов задних конечностей кошки показал, что в это время развивается нейрогенная дилатация.

Наши опыты убедительно доказывают, что барорефлекторный ответ нервной системы на рост давления — комплексная реакция. Даже у наркотизированного животного повышенное фенилэфрином давление

инициирует как минимум три компенсаторные дилаторные реакции: быстрое торможение вазоконстрикторных нейронов, быстрый метаболический ответ и относительно медленную нейрогенную дилатацию. Не исключено, что в этих опытах нейрогенная дилатация вызывалась некоторыми адренергическими симпатическими волокнами, способными активировать синтез NO в артериях. Такое предположение основано на появившемся в литературе сообщении об активации синтеза NO фенилэфрином¹.

Мы рассмотрели лишь некоторые особенности регуляции сосудистого тонуса в условиях покоя и наркоза, связанные со стабилизацией артериального давления. Не вызывает сомнения, что при работе мышц набор реакций, регулирующих сосудистый тонус, существенно шире. Дополняя друг друга, исследования местных гуморальных и генерализованных нейрогенных механизмов регуляции сосудистого тонуса постоянно расширяют наши представления о работе кровеносных сосудов в живом организме и дают надежду приблизиться к пониманию основных принципов организации сердечно-сосудистой системы.

¹ Boer C., Scheffer G.J., Lange J.J. de // J. Vasc. Res. 1999. V.36. №1. P.79–81.

© Ревенко С.В.,
кандидат биологических наук
НИИ экспериментальной кардиологии,
отдел физиологии

Стволовые клетки костного мозга и атеросклероз



По определению Всемирной организации здравоохранения, атеросклероз сосудов — это переменная комбинация изменений внутренней выстилки ар-

терий, включая накопление липидов, сложных углеводов, клеток крови, фиброзной ткани и кальцификацию. Н.Н.Аничков, основатель липопротеидной те-

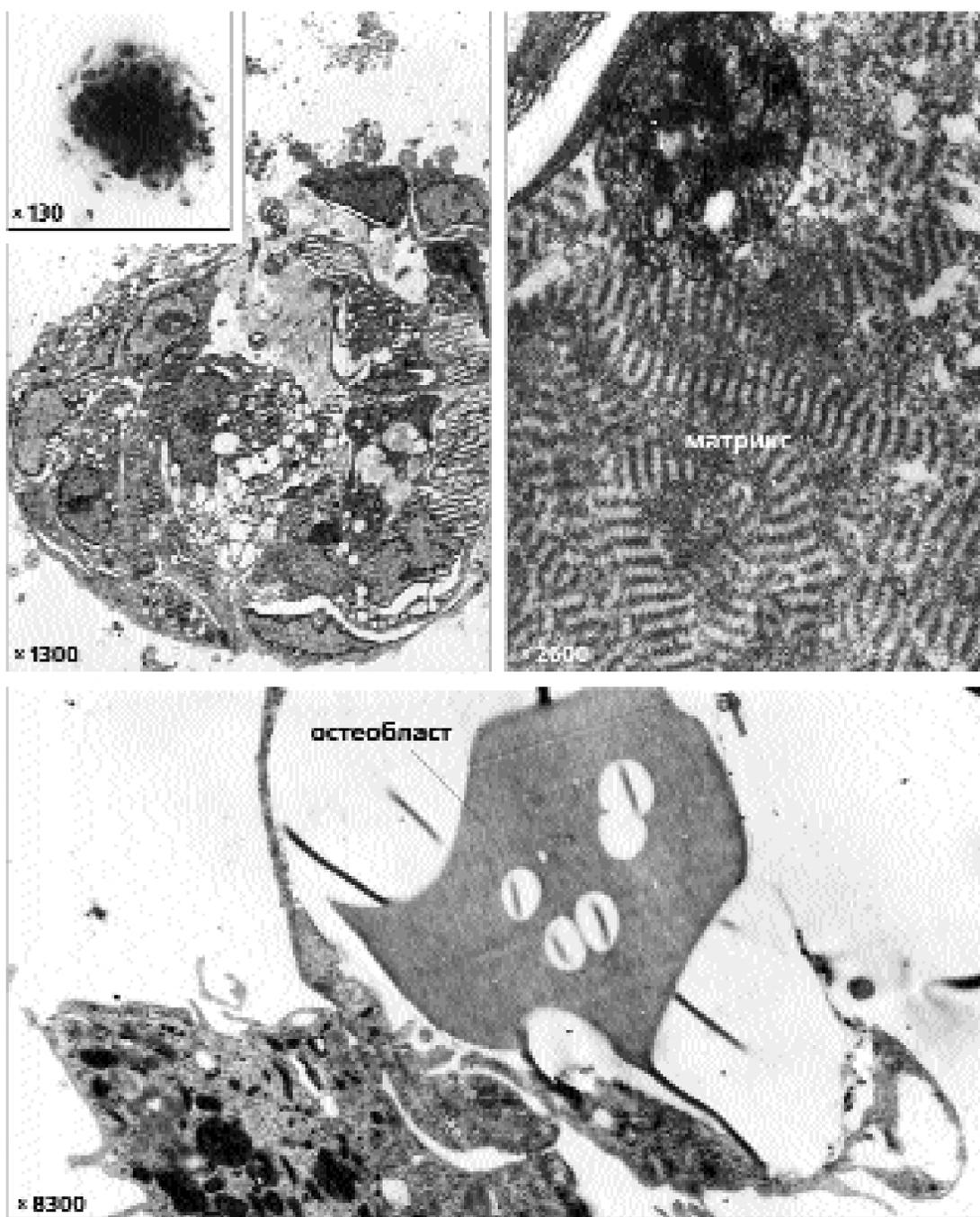
ории атеросклероза, определил его как хроническое заболевание артерий, характеризующееся первичным отложением липидов в их стенке со вторичным

реактивным разрастанием соединительной ткани во внутренней оболочке (интима) и, как следствие, образованием склеротических утолщений-бляшек.

Изучение причин атеросклероза составляет одно из главных направлений современной медицины. Этап исследования клеточных механизмов гиперлипидемии (сверхвысокого содержания липидов) завершился блестящими работами Дж.Гольдстейна и М.Брауна. Они установили роль рецепторов липопротеидов низкой плотности (ЛНП) в генезе наследственной гиперхолестеринемии и развитии ускоренного атеросклероза и в 1985 г. получили за это открытие Нобелевскую премию.

Замечательным достижением гематологии в 50—60-е годы прошлого века стало экспериментальное доказательство общности происхождения форменных элементов крови^{1,2}. Оказалось, все они представляют собой продукты дифференцировки исходных костномозговых плюрипотентных клеток. (Их называют и стволовыми клетками, и колониеобразующими единицами — КОЕ.)

Наши соотечественники И.Л.Чертков и А.Я.Фриденштейн внесли большой вклад в изучение стволовых гемопоэтических клеток. Кроме того, Фриденштейн с сотрудниками обнаружили в костном мозге стромальные стволовые клетки, способные при культивировании образовывать колонии и дифференцироваться в истинные фибробласты³. Из таких колоний, пересаженных под капсулу мышинной почки, формировалась костная или жировая ткань. Фриденштейн назвал эти клетки колониеобразующими единицами для фибробластов (КОЕ-Ф). Оказалось, они не только диффе-



Микрофотографии колоний стромальных клеток. Колонии выросли при культивировании клеток интимы, выделенных из человеческой аорты, на агаровой (вверху) и жидкой среде. Вверху слева — колония клеток, находящихся на разных стадиях дифференцировки (на врезке — та же колония при небольшом увеличении); справа — фрагмент колонии, состоящий из коллагенового матрикса. На нижней фотографии виден костный матрикс, который продуцируют остеобласты. В норме эти ростковые клетки существуют только в очагах костеобразования, где синтезируют образующий волокна коллаген и основное костное вещество, регулируют поток ионов кальция и, будучи замурованными межклеточным веществом, превращаются в остециты — зрелые костные клетки. Здесь и далее увеличение приведено на фотографиях.

ренцируются в истинные фибробласты, но и сохраняют присущую им полипотентность, т.е. могут давать начало хрящевым, костным и жировым клеткам.

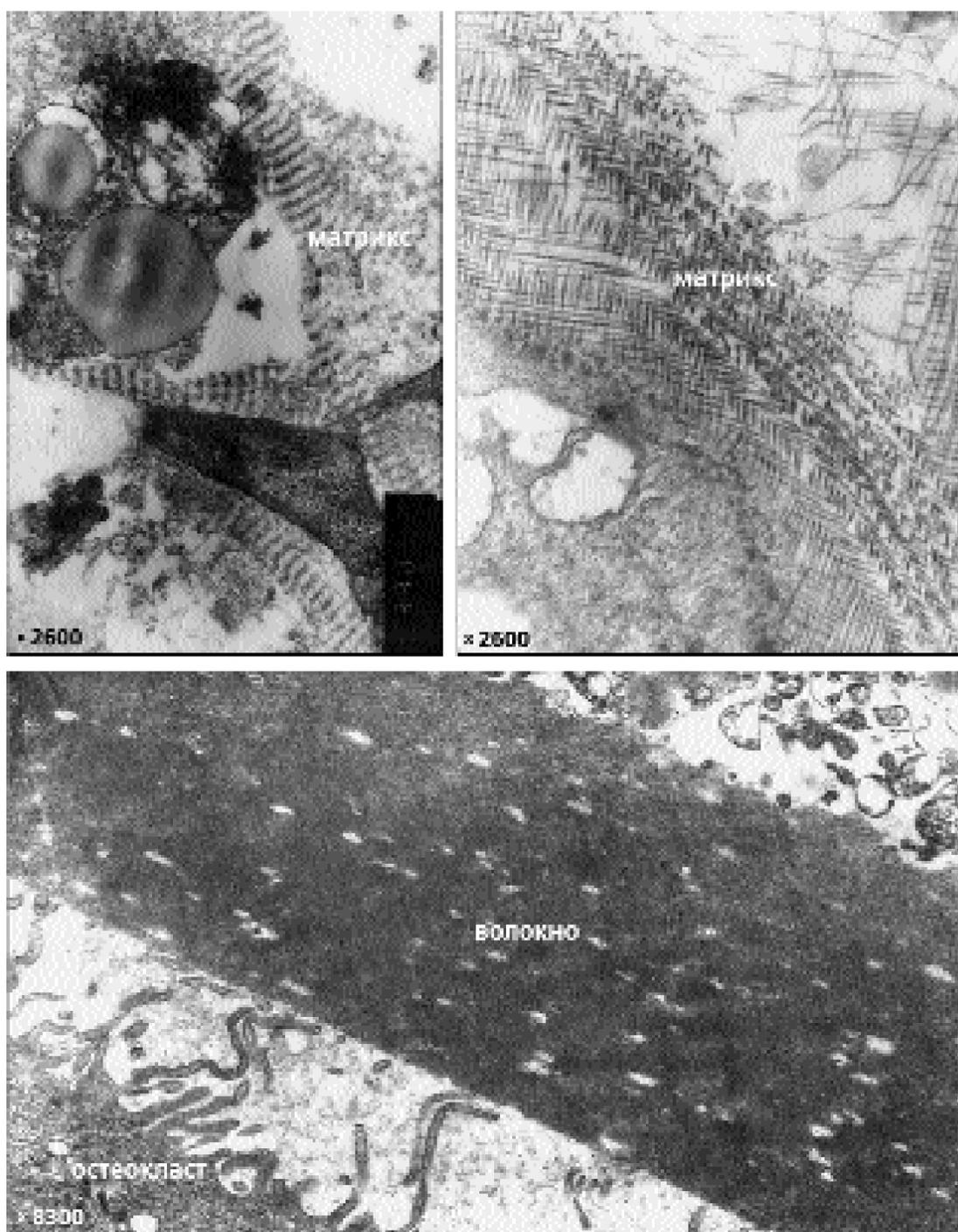
Долгое время считалось, что в крови циркулируют только стволовые клетки гемопоэтической дифференцировки, а стромальные в кровотоке не по-

падают. В исследованиях, начатых в Институте экспериментальной кардиологии Э.Л.Соболевой в 1986 г., в интима атероматозной аорты человека впервые обнаружены не только костномозговые гемопоэтические стволовые клетки (на разных стадиях дифференцировки), но и стромальные. Последние,

¹ Till J.E., McCulloch E.A. // Rad. Res. 1961. V.14. P.213—222.

² Metcalf D., Moor M.A. Haemopoietic cells. L., 1971.

³ Fridenstein A.J., Chailakhjan R.K., Lalykina K.S. // Cell Tissue Kinet. 1970. V.3. P.393—403.



Микрофотографии колоний стромальных клеток, выращенных из клеток крови пациентов с гиперлипидемией и коронарным стенозом. Вверху: коллагеновый матрикс, продуцируемый остеοидными клетками; внизу — волокно матрикса и фрагмент остеοкласта. В костной ткани количество остеοкластов (разрушающих ее клеток) и остеοбластов (создающих кость) сбалансировано. Действуя совместно, они обеспечивают развитие кости и ее регенерацию.

как выяснилось позже, присутствуют также в крови пациентов с гиперлипидемией и коронарным склерозом.

Мы полагаем, что существует причинная связь между изучаемыми нами изменениями в костном мозге и костномозговыми клетками-предшественницами, которые способны «заселять» интиму сосудов. В результате там создается стромальное микроокружение, а оно способствует формированию локусов

эктопического (за пределами обычного места) кроветворения. Каждый локус — это источник собственных ростовых факторов, а поскольку среди стромальных клеток есть и фибробласты, то поддерживается локальный фиброз интимы. Эти результаты получены с помощью клонального, гистохимического, иммуноморфологического и ультраструктурного анализов. Судя по наличию стромальных КОЕ-Ф в крови па-

циентов с гиперлипидемией и коронарным склерозом и их отсутствию у здоровых доноров, эти болезни стимулируют появление КОЕ-Ф в крови.

Совсем недавно мы подтвердили наличие в крови стромальных клеток методом лазерной цитофлуориметрии и попытались выяснить, действительно ли они сохраняют остеогенную потенцию, о чем сообщал еще Фриденштейн. Эту способность удастся выявить иммунологически с помощью моноклональных антител. Дело в том, что в процессе созревания на мембранах стволовых клеток последовательно появляются и исчезают различные белковые молекулы. Например, в гемопоэтических стволовых клетках сначала синтезируется белок CD133, потом — CD34. Для стромальных клеток характерен синтез коллагенов I и III, остеонектина (неколлагенового белка костной ткани), фибронектина и др. Используя антитела (помеченные флуоресцирующим красителем) к конкретному белку, можно определить его количество, а затем и число несущих его стволовых клеток. Анализ проводится на проточном цитофлуориметре, информация с которого обрабатывается по специальным программам.

Мы исследовали кровь пациентов с ишемической болезнью сердца и практически здоровых добровольцев. В качестве маркера стромальных клеток использовали антитела к остеонектину, а маркером гемопоэтических стволовых клеток служил CD34. Результаты подтвердили ранее полученные классическим клональным методом данные: в крови здоровых людей остеонектин-положительные клетки отсутствовали, а у всех обследованных пациентов их количество было значительным и варьировало в широких пределах — от 98 до 1853 на 100 тыс. клеток. По количеству гемопоэтических стволовых клеток кровь здоровых и больных не различалась.

У нас есть основания полагать, что существует тесная связь между развитием атеросклероза и присутствием в крови стромальных стволовых клеток. Они способны проникать в интиму и, сохраняя полипотентность, давать начало клеткам разного стромального фенотипа в сосудистой стенке и формировать бляшки.

В последние годы выяснилось, что стромальные стволовые клетки, попадая через кровоток из костного мозга в другие органы, участвуют в восстановлении большинства поврежденных тканей. Судя по нашим данным, интима сосудов человека — не исключение. Множественность потенциалов стромальных клеток к настоящему времени подтверждена экспериментально: из них были выращены, например, скелетные мышцы, гепатоциты, эндотелиальные

клетки, эпителий кожи и разных внутренних органов. Даже единственная костномозговая стволовая клетка мужской особи, внутривенно введенная смертельно облученной взрослой мыши, дала производные донорской клетки в печени, почках, коже¹. Американские ученые исследовали ткани умерших больных женщин, перенесших пересадку костного мозга мужчин². У этих женщин в интима атероматозной аорты содержались производные мужских стромальных клеток, в здоровом сосуде они отсутствовали.

Наличие костномозговых стромальных клеток в интима пораженных атеросклерозом сосудов человека и в крови паци-

¹ Krause D.S., Theise N.D., Collector M.I. et al. // Cell. 2001. V.105. P.369—377.

² Caplice N.M., Bunch T.J., Stalboerger et al. // Proc. Natl Acad. Sci. 2003. V.100(8). P.4754—4759.

ентов с ишемической болезнью сердца наводит на мысль, что атеросклеротический процесс представляет собой системную патологию тканей, сформировавшихся из мезенхимы. Такая патология затрагивает костный мозг, кровь и интиму сосудистой стенки и может опосредоваться через стромальные стволовые клетки, которые мобилизуются в ответ на воспаление и (или) повреждение стенки сосуда и переносятся через кровоток к дефектному месту. Их накопление и пролиферацию в интима можно рассматривать как стандартную реакцию костного мозга на очаги воспаления и (или) липоидоза в сосудистой стенке. Фиброз интимы и последующий стеноз сосуда есть, вероятно, неизбежное следствие изоляции этих очагов стромальными стволовыми клетками костного мозга.

© Соболева Э.Л., Габбасов З.А.,

кандидаты биологических наук
НИИ экспериментальной кардиологии,
лаборатория стволовой клетки

Поиск новых генов для лечения ишемических заболеваний



Ишемическая болезнь сердца и ишемические заболевания нижних конечностей — одни из наиболее распространенных патологий, приводящих к инвалидности и смертности населения экономически развитых стран. Хотя на сегодня разработаны эффективные методы лечения этих заболеваний, такие как ангиопластика и хирургическое шунтирование сосудов, есть немало больных, у которых с помощью упомянутых методов и медикаментозной терапии не удается добиться успеха. Для таких больных альтернативой остается только терапия, направленная на стимуляцию роста

новых сосудов в зоне ишемии. В последние годы с этой целью используют ангиогенные факторы роста или их гены, а также стволовые клетки. Новая лечебная тактика названа терапевтическим ангиогенезом.

В норме и образование, и рост сосудов обеспечиваются несколькими последовательными многоступенчатыми процессами, которые находятся под контролем большого числа строго сбалансированных между собой активаторов и ингибиторов. Если кровоснабжение какого-то участка ткани или органа ухудшается и возникает недостаток кислорода, начина-

ются процессы, обеспечивающие восстановление кровотока. В первую очередь в клетках вырабатываются транскрипционные факторы. Они взаимодействуют с регуляторными (промоторными) элементами генов, кодирующих ангиогенные факторы роста, и их продукция клетками ткани увеличивается. После взаимодействия этих факторов со специфическими рецепторами на клетках сосудов включаются основные процессы ангиогенеза: активируется деление клеток, их направленное движение (миграция), синтез протеаз и белков межклеточного матрикса, стимули-

руется выход стволовых клеток из костного мозга. Сосуды прорастают в область ишемии, и кровоснабжение восстанавливается. Однако при нарушениях кровотока по крупным магистральным артериям или при поражении множества мелких артерий такой компенсаторный механизм недостаточен для восстановления кровотока, особенно у тяжелых больных, поскольку у них обычно нарушен сам этот механизм. Если кровоток восстановить не удастся, развивается инфаркт миокарда, инсульт или гангрена конечности.

Как помочь таким больным? Возникла идея генной терапии: надо усилить естественный компенсаторный ангиогенез за счет введения ДНК, кодирующей ангиогенный фактор роста, в клетки ткани-мишени. С этой целью и в экспериментальных, и клинических исследованиях используются гены фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) и фактора роста фибробластов (FGF2 и FGF4). Но поскольку образование сосудов регулируется множеством факторов, рационально продолжать их поиск, чтобы найти оптимальные сочетания, а также новые полифункциональные стимуляторы ангиогенеза.

Наше внимание привлекла урокиназа — протеолитический фермент из семейства сериновых протеаз, участвующая во многих процессах. Она активирует образование на поверхности клетки другой, более мощной протеазы — плазмина — и запускает внеклеточный протеолиз, необходимый для разрушения тканевых барьеров при движении клетки внутри ткани. Как выяснилось в исследованиях нашей лаборатории, урокиназе принадлежит главная роль в регуляции направленного движения клетки. Чтобы оно началось, ее цитоскелет должен перестроиться, а путь — освободиться от мешающих движению белков межклеточного матрикса. Первый процесс запускается внутриклеточным

сигналом при взаимодействии урокиназы со своими рецепторами на поверхности клетки. Вторым процессом — протеолиз (разрушение) белков на пути клетки — запускается через образование плазмина и активацию матриксных металлопротеаз, которые всегда участвуют в ангиогенезе. Кроме того, урокиназа сама или через плазмин активирует большинство ангиогенных факторов роста, которые секретируются клетками в неактивном состоянии, или высвобождает эти факторы из матрикса, где они связаны с его белками и потому неактивны. К тому же урокиназа способна сама стимулировать деление клеток. Все эти свойства делают ее одним из основных регуляторов восстановления сосудов. Мы установили, что с ней же связано и развитие повторных стенозов после ангиопластики, но только если она в избытке образуется в поврежденном участке сосуда.

В экспериментах *in vitro* мы изучали способность различных факторов роста стимулировать образование из эндотелиальных клеток капиллярных трубочек (зачатков будущего сосуда) в коллагеновом матриксе. Выяснилось, что для этого процесса тоже необходима урокиназа, так как при подавлении ее активности с помощью специфических антител эффекты факторов роста в значительной степени уменьшались. Сам же этот фермент синтезируется клетками эндотелия сосудов. Гипоксия, характерная для ишемической болезни, сказывается на синтезе негативно: при культивировании клеток в условиях недостатка кислорода (менее 1%) в них уменьшается синтез урокиназы и снижается ее содержание в среде культивирования.

Группа ученых из Нидерландов показала, что у трансгенных мышей, лишенных гена урокиназы, фактор роста эндотелия (VEGF) не стимулирует ангиогенез в околоинфарктной зоне,

тогда как у нормальных мышей он оказывает выраженный ангиогенный эффект¹. Все это привело нас к следующей гипотезе: поскольку в ишемизированных тканях продукция урокиназы клетками может быть снижена, а это влечет за собой и более низкую эффективность факторов роста, то, введя ген или кДНК урокиназы в область ишемии, можно усилить действие факторов роста и стимулировать рост сосудов. Для проверки этой гипотезы мы провели эксперименты на животных.

Ангиогенные свойства урокиназы мы изучали на модели инфаркта миокарда у крысы и модели ишемии задней конечности у мыши. В качестве вектора, вводимого в ишемизированную ткань, использовали плазмиду, в которую встроили кДНК урокиназы (человеческой, крысиной или мышинной) и VEGF 165, клонированные заранее. Маркером служил ген бета-галактозидазы (в этой же генетической конструкции), продукт работы которого можно выявлять по специфическому окрашиванию.

Эффективность трансфекции, рассчитанная по количеству клеток, содержащих бета-галактозидазу, в обеих моделях не превышала 1% от общего числа клеток на срезах мышц и сердца. Однако учитывая, что и урокиназа, и VEGF секретируются клеткой во внеклеточное пространство, даже 1% клеток, гиперпродуцирующих эти белки, может быть достаточно, чтобы их концентрация в ткани увеличилась до уровня, необходимого для стимуляции роста сосудов.

Судя по результатам полимеразной цепной реакции в реальном времени, экспрессия гена собственной (эндогенной) крысиной урокиназы уменьшается в околоинфарктной зоне (специалисты называют ее перинфарктной) сердца через три дня после инфаркта миокарда.

¹ Heymans S, Luttun A, Nuyens D. et al. // Nat. Med. 1999. V.5. P.1135—1142.

Трансгены же (гены человеческой урокиназы и VEGF) продолжают работать в течение 14 дней. Число сосудов, образовавшихся за две недели, мы оценивали по иммуногистохимическому окрашиванию эндотелия антителами к фактору фон Виллебранда (этот белок содержится в клетках эндотелия). По сравнению с контрольными группами животных, которым вводили физиологический раствор или пустой вектор, через 14 дней у подопытных крыс достоверно увеличилось количество и мелких сосудов (в них просвет не определялся), и более крупных (с видимым просветом). Важно подчеркнуть, что размер постинфарктного фиброза (формирующегося рубца) был при этом меньше. Следовательно, сосуды, вновь образованные при введении генетических конструкций, были функционально активными.

На модели ишемии задней конечности у мыши мы определяли ангиогенный эффект урокиназы не только по количеству сосудов, но и по динамике кровотока (с помощью лазерного доплеровского сканирования). Оказалось, что и в этом случае у животных после генной терапии (раздельного введения плазмид с кДНК мышинной урокиназы или VEGF, а также комбинации этих генов) количество капилляров в области ишемии выросло. Кровоток, измеряемый каждые пять дней (вплоть до 20 дня после операции), во всех экспериментальных группах восстановился быстрее, чем в контрольной группе животных, и к 20 дню достиг 60% от кровотока в нормальной конечности. В контрольной группе он не составил даже 40% от нормы, при этом более чем у половины мышей развилась гангрена лапы. Ни у одного из животных опытных групп такая патология не обнаружена.

Известно, что введение гена VEGF вызывает отек конечностей из-за увеличения сосудистой проницаемости. Это суще-

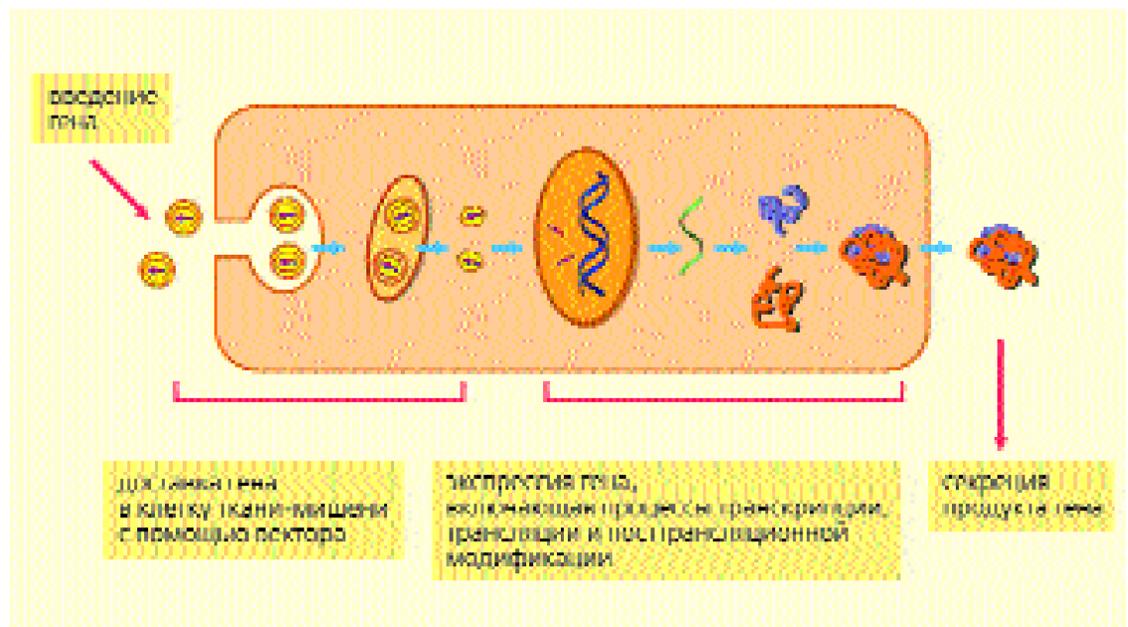
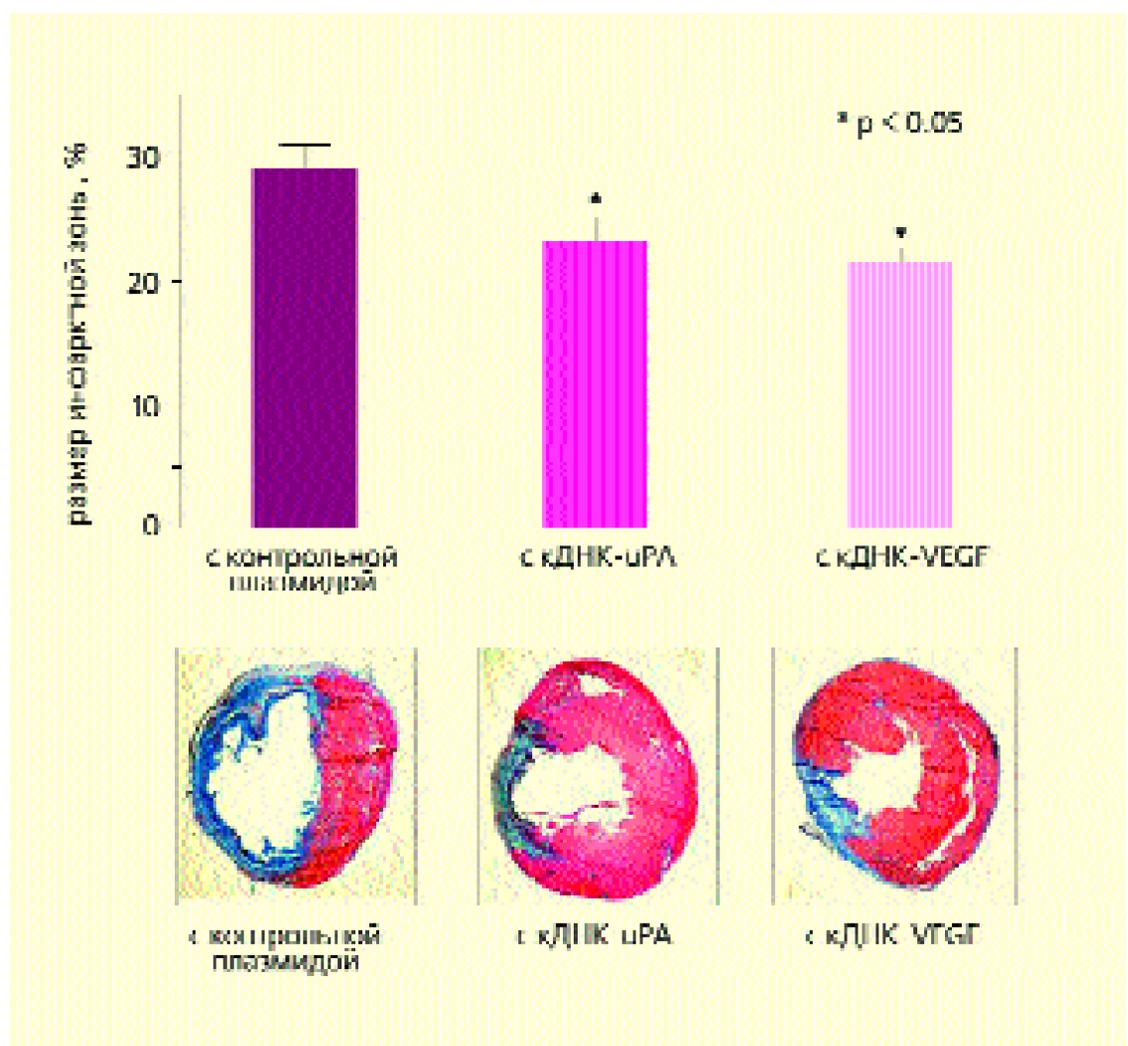
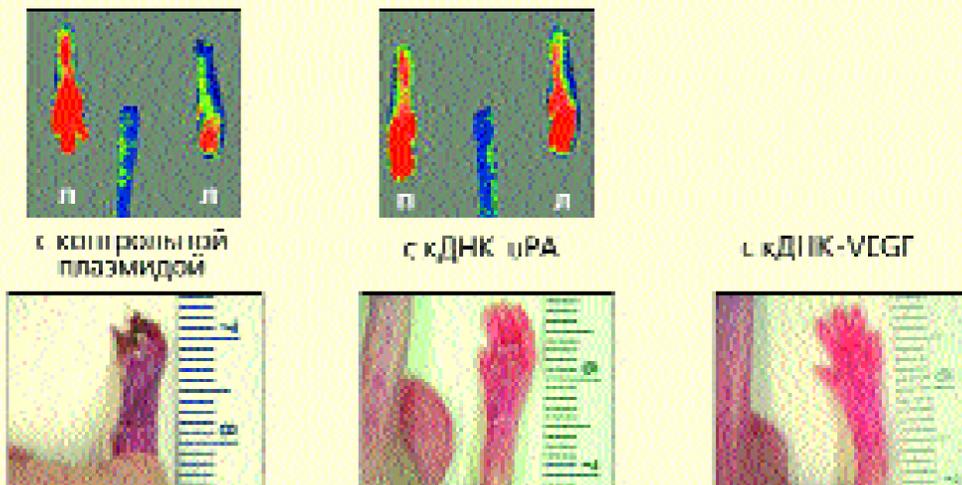
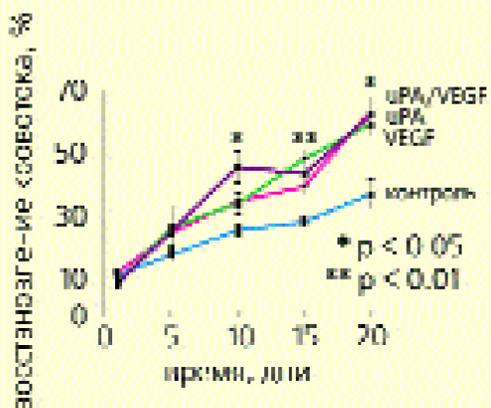


Схема получения терапевтического генного продукта с помощью генетической конструкции.



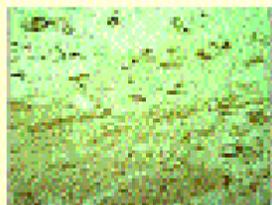
Влияние генов урокиназы и фактора роста эндотелия на размер постинфарктного рубца. Крысам одной группы в околоинфарктную зону сердца вводили плазмиду с геном урокиназы (кДНК-уРА), другой — с геном фактора роста эндотелия (кДНК-VEGF), животным контрольной группы — только пустую плазмиду. На гистограмме видно, что площадь рубца уменьшилась после введения той и другой генетической конструкции, но между собой их влияние мало отличалось. То же самое видно и на гистологических срезах сердец (область инфаркта окрашена в синий цвет, неповрежденный миокард — в красный). Размер инфарктной области приведен в % от площади левого желудочка.



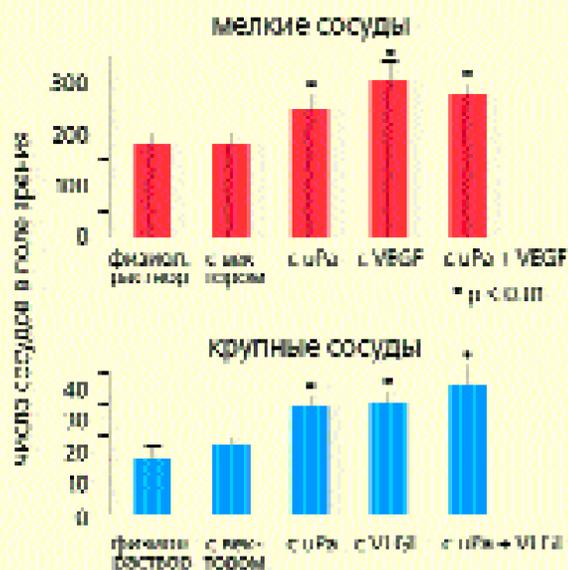
Диаграмма, отражающая динамику восстановления кровотока в задней конечности мыши после иссечения бедренной артерии и введения генов урокиназы, VEGF и их смеси (в половинной дозе каждого гена). Вверху приведен результат лазерного доплеровского сканирования задних конечностей (правая лапа здоровая) мыши, полученный через 20 дней после иссечения артерии. Красный цвет — нормальный кровоток; зеленый и синий — сниженный. Видно, что у животного, которому введена плазмида с кДНК урокиназы, кровоток восстановился почти до уровня в здоровой конечности. У мыши с контрольной, пустой плазмидой этого не произошло, и в результате в ишемизированной лапе развилась гангрена (слева внизу). У мышей, которым провели генную терапию, гангрена не возникла.



с контрольной плазмидой



с кДНК uPA



Гистологические срезы околоинфарктной зоны сердца крысы (слева) и диаграммы, иллюстрирующие влияние введенных генетических конструкций на рост кровеносных сосудов. Сосуды визуализированы окрашиванием на фактор фон Виллебранда (коричневый цвет). На диаграмме видно, что в поле зрения (1.89 мм²) среднее количество сосудов (капилляров без видимого в микроскоп просвета и артерий различного калибра) в экспериментальных группах животных больше, чем в контрольных.

ственно ограничивает его использование для стимуляции ангиогенеза. Урокиназа подобного действия не оказывает.

Следует особо отметить: ни в одной экспериментальной группе животных мы не обнаружили развития ангиомы (эта доброкачественная опу-

холь обычно возникает из незрелых вновь образованных сосудов). Следовательно, примененная нами тактика и дозы кДНК ангиогенных факторов не вызывают патологического роста сосудов и для стимуляции нормального ангиогенеза вполне достаточны.

Итак, наша гипотеза проверена и подтверждена. Полученные сотрудниками нашей лаборатории результаты указывают на ген урокиназы как на новый перспективный терапевтический ген, позволяющий восстанавливать кровоснабжение ишемизированных тканей.

© Парфенова Е.В.,

доктор медицинских наук

© академик РАН Ткачук В.А.

НИИ экспериментальной кардиологии, лаборатория молекулярной эндокринологии

Сорбционные технологии в медицине



Жаңышы сабысшы

Аффинная хроматография, или хроматография по сродству, — лабораторный биохимический метод, известный более 40 лет. Используется он, как правило, для очистки или выделения различных веществ. До 1981 г. возможность его применения в медицине не рассматривалась. Однако именно в этот год в научной литературе появилось первое сообщение об использовании аффинной хроматографии для лечения больных семейной гиперхолестеринемией¹. Так, можно считать, зародилось новое медицинское направление, впоследствии названное терапевтическим аферезом (с греч. — удаление). Направление уже тогда казалось очень перспективным, однако еще никто не представлял, какой путь придется пройти, чтобы эта научная идея воплотилась в реальный метод, терапию, применяемую сейчас во многих клиниках, продлевающую и спасающую жизнь пациентам. Именно это и предстояло нам сделать.

Терапевтический аферез базируется на общеизвестных медицинских фактах. Появление и накопление в крови человека различных патогенных веществ приводит к возникновению и развитию многих заболеваний. Такими компонентами могут быть: аутоантитела; циркулирующие иммунные комплексы; атерогенные липопротеиды, несущие «плохой» холестерин; эндогенные и экзогенные токсины; прионы; вирусы и микроорганизмы. Их полное удаление или снижение концентрации, как правило, дает положительный клинический эффект. В частности, одна из задач терапии атеросклероза, связанного с нарушениями липидного обмена, — снизить концентрацию атерогенных апоВ₁₀₀-содержащих липопротеидов в крови пациента.

¹ Stoffel W., Borberg H., Greeve V. // Lancet. 1981. P.1005—1007.

Основное направление терапии при аутоиммунных заболеваниях состоит в удалении патогенных аутоантител или антигенов.

Традиционно снижают концентрацию тех или иных веществ лекарственной терапией. Однако в ряде случаев ее применение ограничено. Кроме того, для лечения некоторых патологий эффективно действующие лекарства просто отсутствуют.

Классический пример заболевания, при котором лекарственная терапия известна, но часто малоэффективна, — семейная гиперхолестеринемия (СГХС). Эта наследственная болезнь может рассматриваться как созданная природой модель атеросклероза. У больных не хватает (из-за мутации) функционально активных белков-рецепторов, ответственных за выведение из организма липопротеидов низкой плотности (ЛНП). Поэтому они накапливаются, в результате чего повышается уровень холестерина. Он откладывается в стенках сосудов, сужая их просвет, и в результате развивается ранний атеросклероз. Больные СГХС умирают от инфаркта миокарда еще в детском возрасте.

Именно попытки лечить СГХС, в частности IIa типа, привели к возникновению и бурному развитию методов терапевтического афереза. Немецкие ученые — В.Стоффель и Х.Берберг — предложили удалять ЛНП из организма пациента, используя аффинную хроматографию. Для этого они получили поликлональные антитела баранов к ЛНП человека, а затем антитела иммобилизовали на нерастворимой биосовместимой матрице. В результате был синтезирован сорбент, способный высокоспецифично связывать ЛНП при пропускании через него плазмы крови человека. Вся процедура, названная ЛНП-аферезом, проходила экстракорпо-

рально (вне организма): с помощью плазмасепаратора кровь пациента разделяли на плазму и форменные элементы, плазму пропускали через сорбент, соединяли с клетками и очищенную от атерогенного холестерина плазму возвращали пациенту. Риск был огромный, поскольку приготовить сорбент и провести процедуру так, чтобы в организм не попали микроорганизмы из окружающей среды, практически невозможно. Экстракорпоральные процедуры удаления ЛНП для больных СГХС были лечением выбора.

Основная особенность современного терапевтического афереза заключается в непрерывной обработке плазмы крови пациента. Для этого обычно используют плазмасепаратор, в потоке отделяющий плазму от клеток, и сорбционные колонки, которые связывают патогенные вещества и удаляют их из кровотока. Если компоненты плазмы поглощаются сорбентом в колонке за счет физико-химического сродства, метод называется селективным (изымаются все вещества плазмы с похожими физико-химическими свойствами). Если сорбция происходит по принципу высокоспецифичного белок-белкового взаимодействия (так образуются комплексы антиген-антитело, фермент-субстрат, рецептор-агонист и т.п.) — это специфичный метод, им удаляют вполне определенные компоненты плазмы. При проведении специфичных процедур, как правило, для одного больного используют две сорбционные колонки: сначала плазму пропускают через одну, потом через другую, а первую в это время регенерируют для повторного использования. Следовательно, за один сеанс афереза может проводиться несколько хроматографических циклов, что придает системе практически

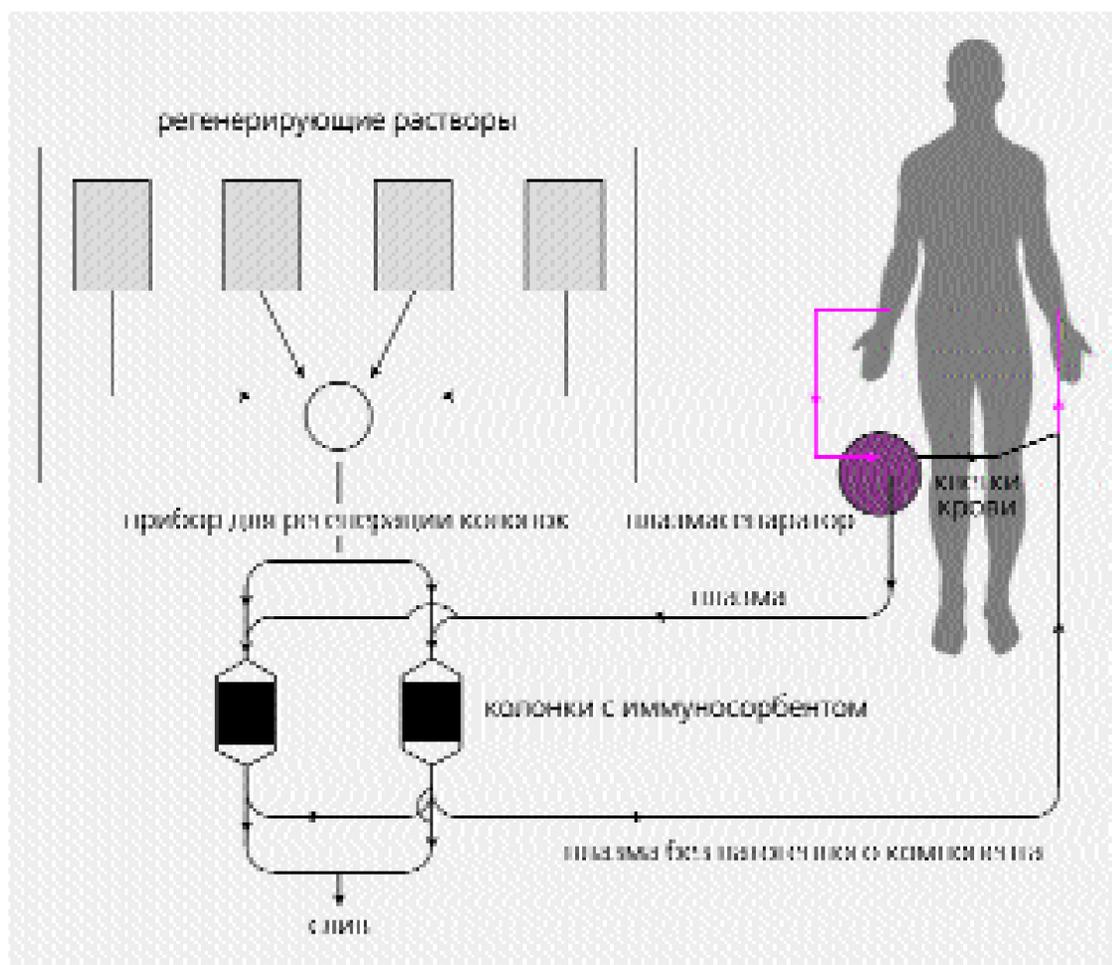


Схема процедуры терапевтического афереза с использованием иммуносорбционных колонок.

неограниченную сорбционную емкость. Кроме того, можно заранее с высокой степенью точности рассчитать, сколько патогенного компонента будет удалено при том или ином количестве циклов. Это позволяет врачу на основе биохимического

анализа крови пациента проводить процедуры таким образом, чтобы достичь клинического эффекта.

Активный ингредиент сорбционной колонки — гель-сорбент. Основываясь на принципах аффинной хроматографии,

можно создавать сорбенты с заданными свойствами, чтобы использовать в терапевтическом аферезе для коррекции уровня различных компонентов крови. Уникальность метода заключается в его универсальности.

Группой аффинных сорбентов для медицины создан целый ряд сорбентов, предназначенных для лечения тяжелых заболеваний.

Первым был аналог сорбента, разработанного в Германии, т.е. на основе поликлональных антител против ЛНП. Уже почти 20 лет мы используем его для удаления атерогенных апоВ-содержащих липопротеидов из крови пациентов с тяжелыми формами атеросклероза. За это время спасена жизнь детям, страдающим СГХС. Лечение одной из первых больных началось в 1983 г. в лаборатории гемодиализа и плазмафереза Кардиоцентра (руководитель профессор В.В.Кухарчук). Процедуры ЛНП-афереза продолжают до сих пор в Медицинском центре Управления делами Президента РФ в отделении, возглавляемом профессором Г.А.Коноваловым.

Впервые в мире разработан другой тип сорбента того же назначения — на основе моноклональных антител к апоВ. Клинические испытания успешно закончились.

В 1986 г. нашей группой получен уникальный сорбент для удаления липопротеида (а). Он так же, как и ЛНП, атерогенен и, кроме того, является независимым фактором риска развития атеросклероза. Повышенная концентрация Лп(а) приводит к раннему развитию тяжелого атеросклероза, поражению коронарных, периферических, сонных артерий, аутовенозных шунтов после операции аортокоронарного шунтирования. Эффективных лекарств, которые уменьшали бы концентрацию Лп(а), до сих пор не существует. Поэтому Лп(а)-аферез, предложенный нами, — единственный способ снизить риск

Этапы производства иммуносорбционных колонок

выделение антигена из плазмы крови человека



иммунизация животных-доноров антигеном



получение антисыворотки



выделение моноспецифичных поликлональных антител



иммобилизация антител на матрицу



заполнение корпуса колонки гелем иммуносорбента



упаковка и маркировка готового продукта

развития атеросклероза у больных с повышенным содержанием этого липопротеида в крови. Колонки с нашим сорбентом, специфичным к Лп(а), используются в настоящее время для лечения пациентов в нескольких странах.

Созданы и другие сорбенты:

- с антителами к иммуноглобулинам (для удаления аутоантител и иммунных комплексов). Этот сорбент предназначен для лечения аутоиммунных патологий, в частности такого тяжелого заболевания, как дилатационная кардиомиопатия (характеризуется расширением полостей сердца);

- с антителами к β -2 микроглобулину, который накапливается в организме пациента при длительном почечном диализе;

- с антителами к ингибиторам фактора некроза опухоли для лечения ряда онкологических заболеваний.

Успешно выполнены и другие разработки, например синтезирован сорбент с антиидиотипическими антителами, позволяющий эффективно связывать антиген из плазмы крови человека. Надо сказать, что получить специфичный сорбент — это всего лишь часть задачи изготовления сорбционной колонки, пригодной для использования в клинике. Во время процедуры колонка с аффинным сорбентом подключается, как упоминалось, к пациенту экстракорпорально. Это означает, что к производству сорбционных колонок предъявляются особые требования. Главное из них — выпустить стерильный продукт без его стерилизации на конечной стадии.

В нашей группе разработана уникальная технология производства сорбционных колонок. Сначала получаем очищенный препарат антигена. Как правило, это и есть тот патогенный компонент крови человека, ко-



Завершающая производственная стадия — заполнение колонок сорбентом.

торый впоследствии предстоит удалить при помощи колонок. Затем иммунизируем животных-доноров (баранов) антигеном. Из их крови получаем антитела, очищаем их, иммобилизуем на матрицу. Полученным иммуносорбентом заполняем колонки, упаковываем и маркируем готовый продукт.

Все известные и утвержденные сегодня жесткие методы стерилизации медицинских изделий (автоклавирование, обработка перекисью водорода и облучение) неизбежно приводят к денатурации антител. Поэтому на промежуточных этапах производства колонок используем специальные методы стерилизации, а завершающую стадию ведем в асептических условиях,

в специальных помещениях, обеспечивающих полное отсутствие микроорганизмов в окружающей среде.

В настоящее время накоплено немало примеров успешного применения сорбционных методов терапевтического афереза для лечения сердечно-сосудистых и аутоиммунных заболеваний, печеночной недостаточности, а также в акушерстве и гинекологии, при трансплантации органов, в дерматологии, онкологии, ревматологии, при острой интоксикации и инфекции организма. Учитывая многообразие показаний к применению терапевтического афереза, создание новых поколений высокоспецифичных сорбентов остается актуальным.

© Покровский С.Н.,

доктор биологических наук
НИИ экспериментальной кардиологии,
группа аффинных сорбентов для медицины

Устойчивость сердца суслика к гипотермии



Сердце человека, как и многих других млекопитающих, имеет ограниченную устойчивость к холоду — переохлаждение приводит к состояниям, угрожающим жизни. Так, снижение температуры тела до 29°C вызывает частые перебои в работе сердца (экстрасистолии) и дезорганизацию электрической и механической активности желудочков (фибрилляцию). При температуре 15°C нарушается проведение возбуждения вплоть до полной блокады и остановки сердцебиения (асистолии). Однако ничего подобного не происходит у млекопитающих животных, переживающих холодный период года в состоянии гибернации (от лат. hibernatio — зимовка), т.е. впадающих в зимнюю спячку. Сердце таких животных (гибернантов) сокращается даже при температурах, близких к 0°C. Ни фибрилляция желудочков, ни блокада проведения у них при этом не развиваются, лишь снижается частота сердечных сокращений до 2–10 уд/мин. Сердце продолжает

биться и при входе в состояние гибернации, и при выходе из него, когда температура тела меняется на 30°C и более в течение всего нескольких часов.

Изучением сердечной деятельности гибернантов занимаются уже более века, тем не менее до сих пор неизвестны точные механизмы, обеспечивающие устойчивость сердца к гипотермии. Предполагалось, что обусловлено это различиями в скорости проведения возбуждения в сердце гибернантов и негибернантов, однако данных, подтверждающих эту гипотезу, накоплено пока явно недостаточно.

Совместно с сотрудниками Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН (Пушино) и Вашингтонского университета (Сент-Луис, США) мы занялись изучением влияния гипотермии на характер активации сердца одного из самых устойчивых к холоду гибернантов — якутского подвида длиннохвостого суслика (*Citellus undulatus*). Температура тела этого суслика, обитающего в районе

полюса холода Северного полушария, в период зимней спячки снижается до -2°C и более.

Исследование проводили на изолированных сердцах сусликов в летний и зимний периоды с помощью флуоресцентного оптического картирования. Главное преимущество этого метода — высокое пространственное и временное разрешение, позволяющее детально охарактеризовать протекающие в миокарде электрические процессы, чего невозможно достичь, используя простое электрическое картирование.

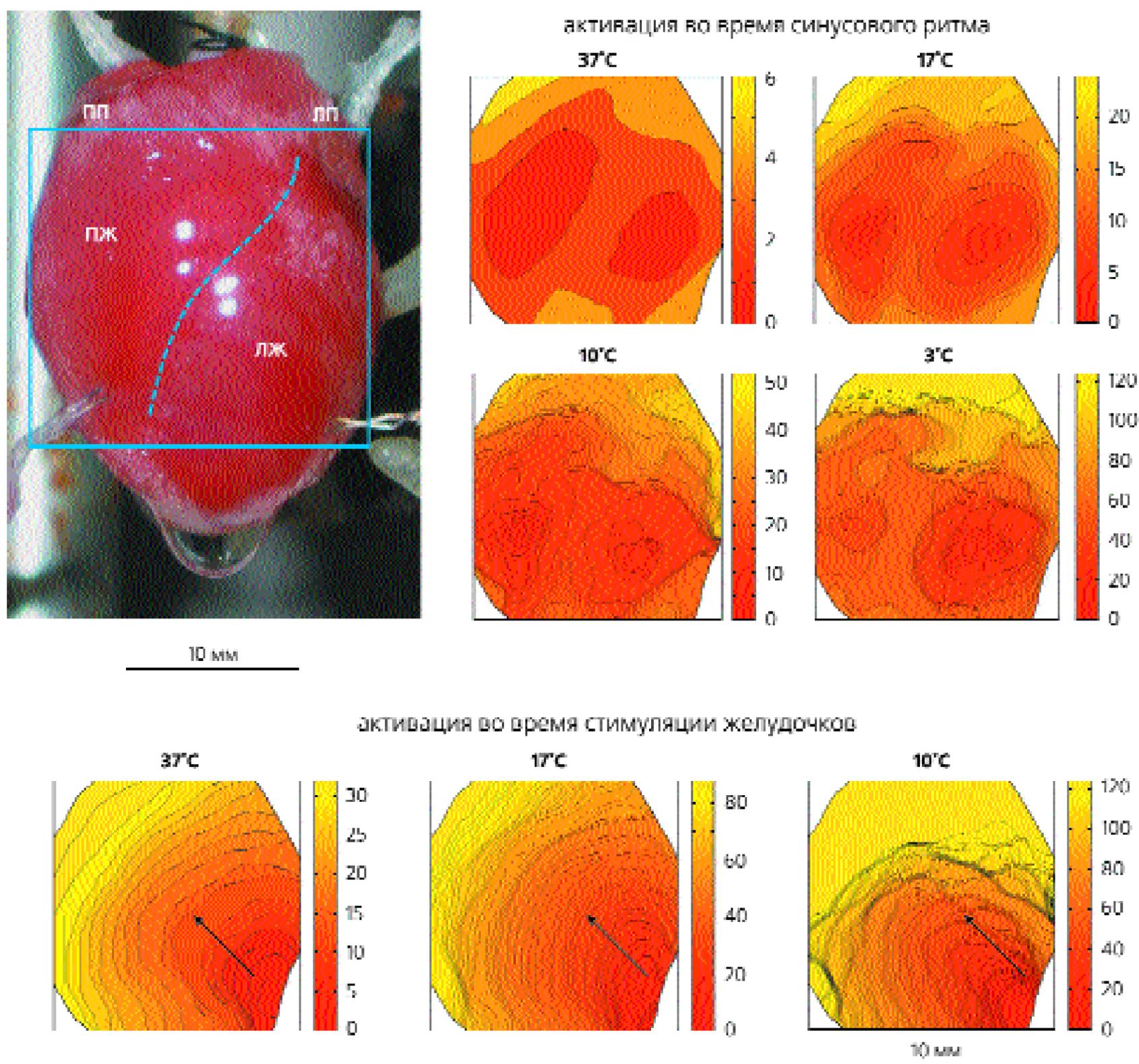
Не вдаваясь в методические подробности эксперимента, о чем можно прочесть в статьях, недавно опубликованных в отечественном и американском журналах¹, замечу, что в нашей работе впервые удалось прямо измерить скорость проведения возбуждения в обоих желудочках сердца гибернанта и детально проанализировать последовательность их активации в широком диапазоне температур — от 37°C до 3°C. Запись оптических сигналов проводилась как во время спонтанного ритма, так и навязанного электрической стимуляцией.

Во всех сердцах ни понижение температуры от 37 до 3°C, ни последующее ее восстановление не приводило к тахикардиям или блокадам проведения возбуждения. Во время гипотермии значительно замедлялся синусовый ритм (в среднем от 247 до 6 ударов в минуту у активных сусликов и от 142 до 8 — у спящих), при этом характер эпикардиальной активации желудочков не менялся, что свидетельствует о сохранении проведения импульса по обоим ножкам пучка



Якутский суслик в летнем активном состоянии (температура тела — около 37°C) и в состоянии зимней спячки (около 0°C).

¹ Розенштраух Л.В., Федоров В.В., Алиев Р.Р., Глухов А.В., Михеева Т.В., Резник А.В., Ефимов И.Р. // Кардиология. 2005. №4. С.4–10.



Фотография изолированного сердца летнего активного суслика и карты активации его желудочков сердца во время синусового ритма и стимуляции при различных температурах. Прямоугольником отмечена область (16×16 мм) регистрации оптических сигналов; штрихованной линией — проекция межжелудочковой перегородки; ПП и ЛП — правое и левое предсердия; ПЖ и ЛЖ — правый и левый желудочки. Изохроны построены через 2 мс на картах 37°C, 17°C и 10°C и через 4 мс на карте 3°C. Стрелкой показано направление, вдоль которого проводили измерение скорости проведения. Видно, что при понижении температуры сохраняется общий характер активации сердца — два участка выхода возбуждения на эпикард в левом и правом желудочках.

Гиса, обеспечивающим сокращение желудочков. Кроме того, при понижении температуры от 37°C до 3°C скорость проведения в желудочках изолированного сердца суслика падала более чем в 10 раз (в среднем от 71 до 6 см/с у активных и от 86 до 8 см/с у зимующих сусликов).

Вероятно, устойчивость гибернантов к гипотермии связана с электрофизиологическими особенностями их кардиомиоцитов, в частности с изменением характеристик входящих ионных токов (Na^+ и Ca^{2+}) в зависимости от температуры, а также с уменьшением прово-

димости щелевых контактов. Однако существует пока только одна экспериментальная работа, в которой с помощью метода фиксации потенциала установлено, что при низких температурах в препарате желудочка ежа (гибернанта) максимум кальциевого тока изменял-

ся незначительно, при этом амплитуда натриевого тока уменьшалась много меньше, чем у крысы (негибернанта)¹. Других работ на одиночных кардиомиоцитах гибернантов и негибернантов, подтверждающих эту гипотезу, насколько нам известно, пока не проводилось.

Недавно с помощью иммуногистохимического окрашивания антителами получены результаты, свидетельствующие о значительном увеличении плотности основного белка щелевых контактов между кардиомиоцитами желудочка (коннексина Сх43) в миокарде хомяков во время спячки². Авторы предположили, что эти изменения — компенсаторный ответ, направленный на поддержание количества межклеточных щелевых контактов, достаточного для сохранения проведения возбуж-

дения в экстремальных физиологических условиях.

В наших предварительных опытах обработка антителами к Сх43 не позволила выявить различия в размере межклеточных контактов в желудочках зимних активных и гибернирующих сусликов. Тем не менее дальнейший анализ мембранной фракции показал достоверное снижение синтеза коннексина Сх43 (в среднем на 73%) и увеличение выработки другого белка — Сх45 (в среднем на 93%) — в миокарде спящих сусликов по сравнению с активными. Возможно, замена Сх43 на Сх45 парадоксально связана с высокой безопасностью проведения у гибернирующих видов при гипотермии. Это предположение согласуется с работами, выполненными на культурах кардиомиоцитов³, в которых показано, что определенная степень межкле-

точного разобщения может способствовать увеличению фактора надежности проведения.

Таким образом, устойчивости сердца гибернантов к возникновению блоков проведения во время гипотермии могут способствовать различные факторы: изменение функционирования натриевых, кальциевых и межклеточных каналов и/или уровня синтеза белков этих каналов, например коннексинов Сх45 и Сх43.

Дальнейшие наши исследования будут направлены на изучение молекулярных механизмов устойчивости сердца гибернантов к гипотермии. Надеемся, что понимание этих механизмов поможет найти новые подходы к защите не впадающих в зимнюю спячку организмов, включая человека, от аритмогенных эффектов гипотермии. Полученные знания могут расширить возможности лечения жертв гипотермии и дать новые подходы к восстановлению работы сердца после охлаждения во время кардиохирургических операций.

© Академик Розенштраух Л.В.

НИИ экспериментальной кардиологии, лаборатория электрофизиологии сердца

¹ Liu B., Arlock P., Wohlfart B., Johanson B.W. // Cryobiology. 1991. №28. P.96—104.

² Saitongdee P., Milner P., Becker D.L. et al. // Cardiovascular Res. 2000. №47. P.108—115.

³ Rohr S., Kucera J. Cardiac tissue architecture determines velocity and safety of propagation // Cardiac Electrophysiology: from cell to bedside / Eds D.P.Zipes, J.Jalife. N.Y., 2004. P.222—231.

Как диагностировать миксому



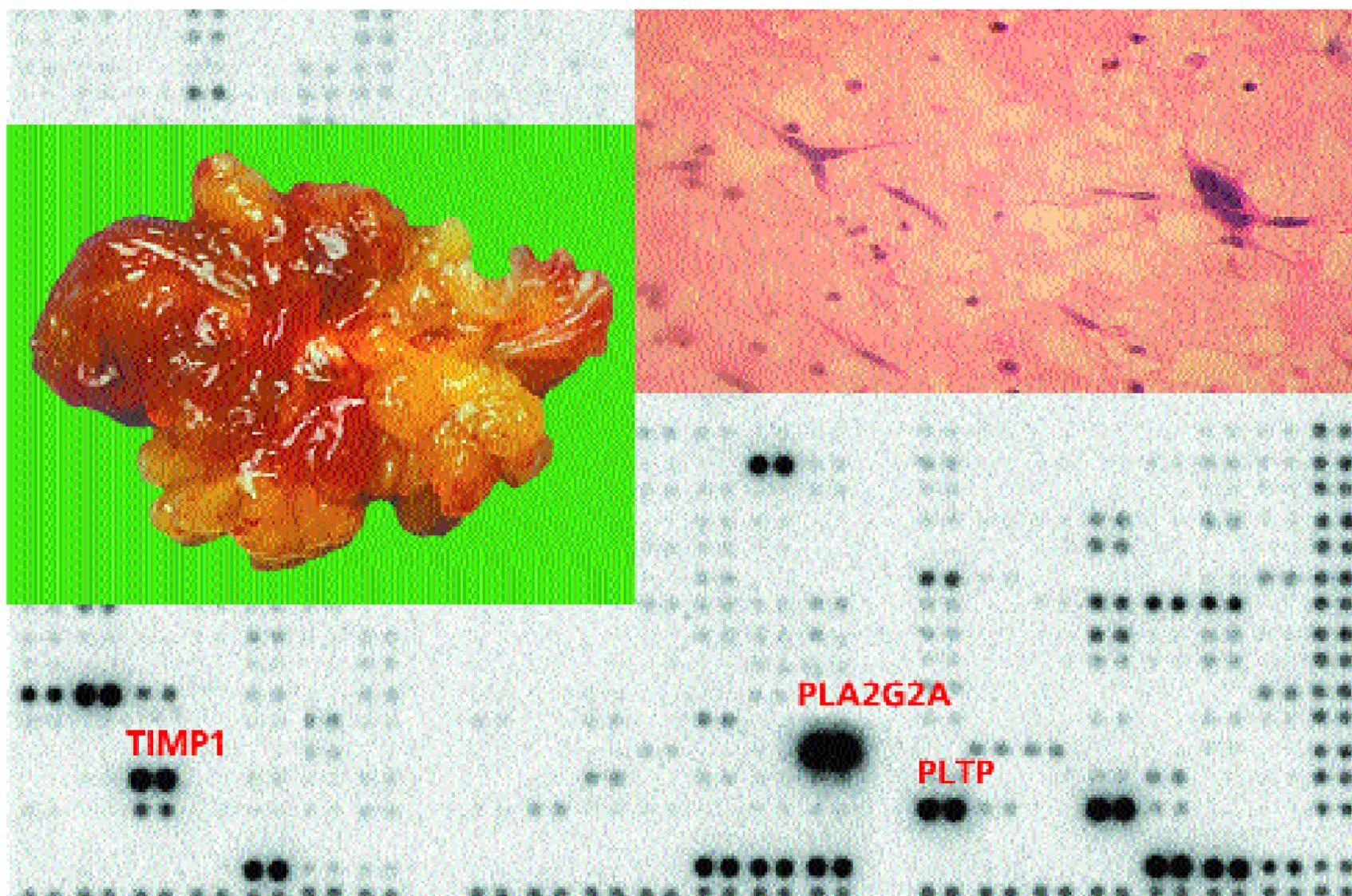
С расшифровкой первичной структуры генома человека молекулярная биология приобрела новый мощный инструмент, который позволяет исследовать влияние разных воздействий на жизнедеятельность клеток. Речь идет о ДНК-микрочипах, которые представляют собой разные по составу олигонуклеотидные фрагменты ДНК, т.е. зонды (каждый из них соответствует по последовательности нуклеотидов определенному гену), иммобилизованные на поверхности плоской твердой подложки — мембраны, стекла,

полиакриламидного геля и др. На 1 см² пластинки можно поместить до 10 тыс. таких фрагментов и одновременно, в одном эксперименте, проанализировать сотни и даже тысячи генов. Основу метода составляет гибридизация ДНК-зондов с анализируемыми последовательностями ДНК. Медицина благодаря микрочипам вступила в новую эру диагностики заболеваний, в первую очередь онкологических.

Учитывая, что геном человека содержит примерно 35 тыс. генов, обычно наносят от

70 тыс. до 2 млн пятнышек на одну пластинку. Инструментарий для подобных исследований выпускается разными фирмами США и ряда других стран. Некоторые лаборатории сами производят такие матрицы для себя из-за быстрого накопления информации о псевдогенах (обычно поврежденных за время эволюции копий нормальных генов) и о вариантах альтернативного сплайсинга информационных РНК (иРНК).

В последние годы начали развиваться методы анализа дифференциальной экспрессии генов



Миксома сердца на фоне фотографии с фрагмента мембраны транскрипционной матрицы, использованной для анализа экспрессии генов. Здесь же приведена микрофотография гистологического среза миксомы с типичной звездчатой клеткой.

(т.е. определения концентрации иРНК), позволяющие находить те гены, чей уровень экспрессии характерен для интересующих исследователя клеток или тканей. Эти методы революционизируют изучение механизмов, лежащих в основе мультигенных заболеваний, позволяют искать мишени для создания лекарств, эффективные и информативные диагностические средства.

Подобного рода исследование, проведенное в нашей лаборатории, связано с поиском маркеров, по которым можно было бы однозначно идентифицировать миксому — доброкачественную опухоль сердца человека.

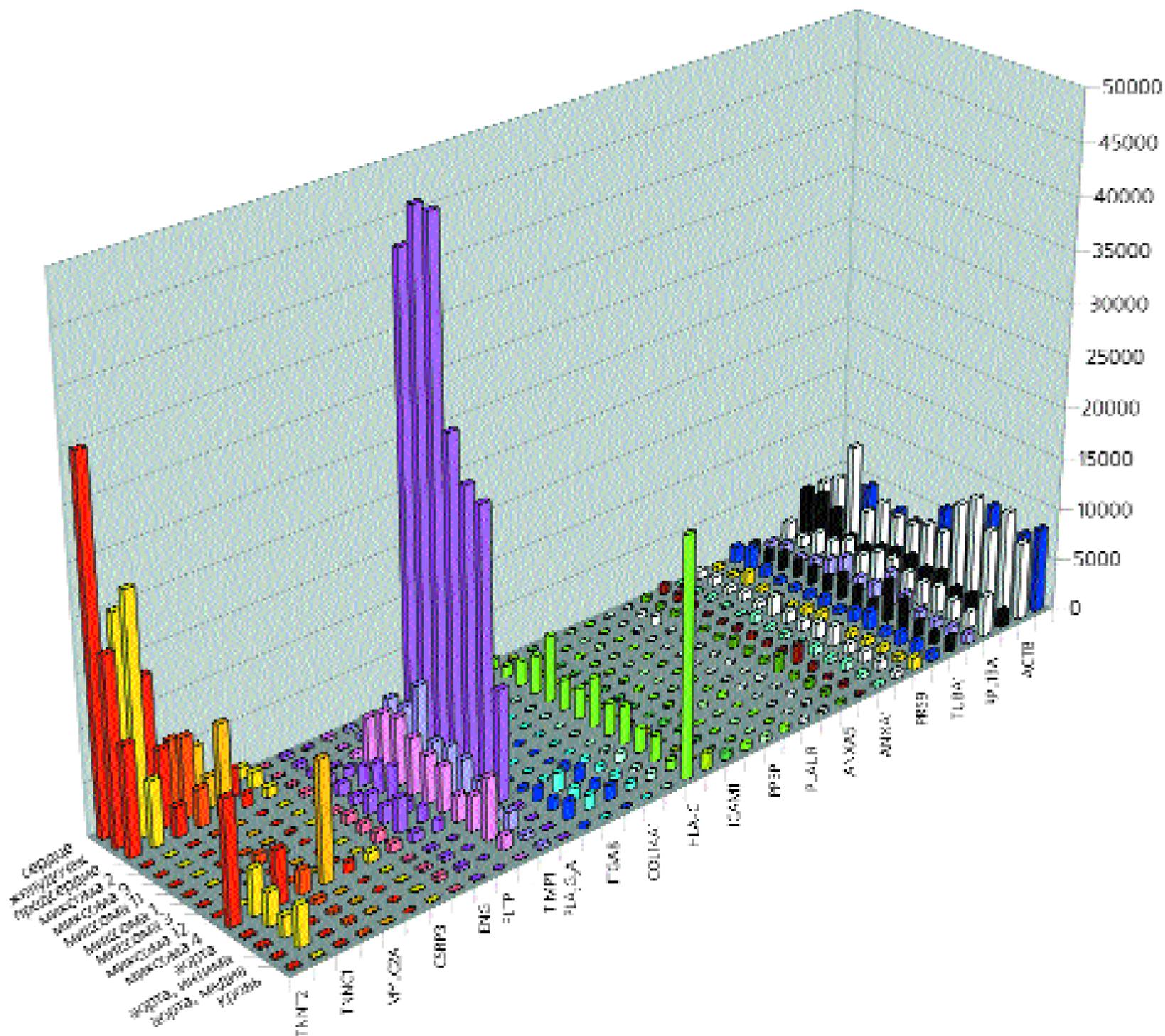
Из общего числа первичных доброкачественных опухолей сердца миксома составляет около 50%. Развивается она чаще всего в полости левого предсердия, значительно реже — в пра-

вом, и очень редко — в желудочках. Среди остальных опухолей преобладают рабдомиомы, липомы, папиллярные фиброэластомы, мезенхимомы.

Миксома, размер которой составляет несколько сантиметров, бывает плотной или желеобразной, ее поверхность — гладкой или шероховатой. Клинически миксома четко не проявляется, она часто «имитирует» разные стенозы, в том числе митральный и стеноз легочной артерии, возникающие из-за отрыва фрагмента опухоли (эмбола) и попадания его в тот или иной кровеносный сосуд. Если все же удастся диагностировать миксому, опухоль удаляют, при этом прогноз бывает хорошим. После операции не требуются ни радиационная терапия, ни химио- либо иммунотерапия, а тем более пересадка сердца. Но чтобы увериться в этом,

нужна точная послеоперационная диагностика, а она часто вызывает затруднения, особенно если гистологическая картина ткани отличается от типичной. Именно поэтому мы и взялись за поиск транскрипционных маркеров миксомы с помощью экспрессионного анализа.

Мы измеряли уровень экспрессии (концентрации информационной РНК) почти произвольно выбранных 2500 генов. Образцы иРНК выделяли из операционного материала, полученного из опухолей десяти больных. Так как природа ткани миксомы неизвестна, для сравнения анализировали 15 нормальных тканей и 12 разнообразных первичных опухолей, включая и несколько немиксомных опухолей сердца. Анализ проводили на коммерческих ДНК-микрочипах. Мы переводили иРНК в ее одноце-



Фрагмент гистограммы, иллюстрирующий уровни экспрессии разных генов в тканях миксомы, сердца, аорты и в крови. Из семи маркеров миксомы на этом фрагменте гистограммы присутствуют только три: PLA_2G_2A , $TIMP1$ и $PLTP$.

почечную ДНК копию ферментативным синтезом в реакции обратной транскрипции и одновременно вводили радиоактивную метку. Определить интенсивность сигнала и выдать результаты — дело современной техники: анализатора и компьютера с необходимой программой обработки полученных данных. Легкость такой обработки — кажущаяся, в действительности это самое трудное дело. Сотни тысяч пятнышек, все

с разбросом и ошибками; сотни образцов, дающих каждый свой результат в зависимости от того, какие лекарства принимал пациент, какого он пола, какие у него дополнительные болезни... И из всего этого хаоса нужно найти то, что коррелирует с данным заболеванием, и игнорировать «случайные вариации». Проще говоря, надо «вытащить сигнал из-под фона».

После обработки данных нам удалось выявить несколько

генов с устойчивым и довольно высоким уровнем экспрессии в миксомной ткани. Такими маркерами оказались иРНК, служащие матрицами для синтеза:

- секретируемой фосфолипазы A_2 (PLA_2G_2A),
- белка, ингибирующего рост меланомы (MIA),
- фосфолипид-транспортного белка (PLTP),
- кальретинина (CALB2),
- остеопонтина (SPP1),
- двух ингибиторов метас-

тазирования (TIMP1 — ингибитора металлопротеаз, и антилейкопротеазы, SLPI, ингибирующей сериновые протеазы).

Отметим, что проведенный анализ выявил только один из ранее обсуждавшихся в литературе маркеров миксомы — кальций-связывающий белок кальретинин. Все остальные оказались новыми и совершенно неожиданными с точки зрения многочисленных теорий происхождения миксомы. Конечно, ни один из найденных маркеров сам по себе не может рассматриваться как безусловный, потому что ге-

ны всех этих транскриптов экспрессируются в тех или иных тканях. Например, ген фосфолипазы A₂ (PLA₂G₂A) очень активен в нормальных клетках Панета в тонком кишечнике, а также при воспалительных процессах, связанных с ревматоидным артритом. Транскрипт для ингибитора меланомы присутствует, например, в клетках самой меланомы, для PLTP и CALB2 — в атероме, и т.д. Однако вероятность встретить их вместе где-либо, кроме миксомы, и при этом в определенном соотношении, ничтожно мала. Таким об-

разом, удалось выявить транскрипционные маркеры генов, которые в совокупности определяют уникальность картины их экспрессии в миксеме. Интересно, что фосфолипазу A₂ как секретлируемый белок, вероятно, можно использовать в качестве дооперационного иммунологического диагностического средства.

Мы убедились, что экспрессионным анализом на ДНК-микрочипах можно искать и находить маркеры опухолей, получать их генетические портреты и составлять целые атласы.

© Бибилашвили Р.Ш.,
кандидат физико-математических наук
НИИ экспериментальной кардиологии,
лаборатория генной инженерии

Антиаритмические препараты нибентан и РГ-2

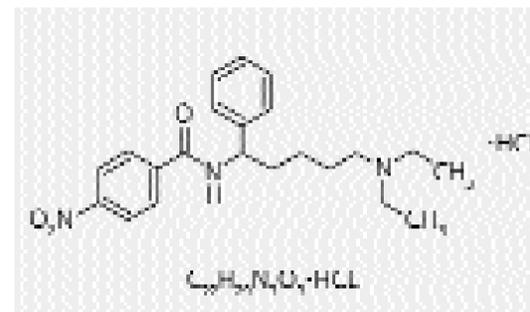


В норме клетки миокарда (кардиомиоциты) сокращаются и расслабляются согласованно, что обеспечивает регулярный ритм в деятельности перегоняющей кровь сердца. Невозбужденные кардиомиоциты обладают потенциалом покоя, который под действием различных стимулов меняется. Входящие в клетку катионы (прежде всего Na⁺ и Ca⁺) деполяризуют мембрану, а выходящие (в основном K⁺) — гиперполяризуют. Стремительное изменение потенциала покоя, при котором мембрана теряет свой нормальный заряд (фаза деполяризации) до положительного значения (фаза овершута), и последующее возвращение к уровню покоя (фаза реполяризации) называют потенциалом действия. Зарождается импульс в клетках сино-атриального узла (водителя ритма), далее возбуждение передается по предсердиям, достигает проводящей системы и распростра-

няется по желудочкам, что обеспечивает последовательное сокращение предсердий и желудочков (фаза систолы), а затем их расслабление (диастола).

При аритмиях меняется место и частота возникновения импульсов, нарушается их регулярность и проводимость. Причинами тому могут стать ишемия миокарда, пороки сердца (особенно митрального клапана), электролитные нарушения, изменения кислотно-основного состояния, различные интоксикации (например, при передозировке сердечных гликозидов), эндокринные заболевания, энергетические нарушения. При инфаркте миокарда частота возникновения аритмий достигает 90%.

Все существующие антиаритмические средства, по классификации Vaughan Williams, делят на четыре класса: I — блокаторы натриевых каналов, II — β-адреноблокаторы, III — сред-



Структурная формула нибентана.

ства, удлиняющие реполяризацию, IV — блокаторы медленных кальциевых каналов.

В 70—80-е годы прошлого столетия наиболее популярны были антиаритмики I класса, в последние же десятилетия тактика лечения нарушений сердечного ритма и выбор препаратов изменились, и на то есть веские причины. Дело в том, что все антиаритмические лекарственные средства сами могут вызывать аритмии (вплоть до появления желудочковой тахикардии). Выраженность аритмо-

генного эффекта зависит от многих факторов: сократительной функции левого желудочка (чем она ниже, тем больше вероятность развития эффекта), концентрации в крови электролитов (ионов калия, кальция, магния), вида аритмии (например, желудочковая пароксизмальная тахикардия на фоне антиаритмического препарата может трансформироваться в тахикардию типа «пируэт» — *torsade de pointes*). Более всего этим «грешат» препараты I класса, которые оказались смертельно опасны при лечении желудочковых аритмий у пациентов, перенесших инфаркт миокарда или имеющих другую органическую патологию сердца. Более того, обнаружено, что использование этих препаратов для лечения суправентрикулярных (предсердных) нарушений ритма, в частности мерцательной аритмии, также может приводить к смерти.

В настоящее время больше внимания стали уделять антиаритмикам III класса, действие которых связано с увеличением длительности трансмембранных потенциалов за счет замедления реполяризации в волокнах предсердий и желудочков. Число таких средств пока ограничено: кроме амиодарона (кордарона) и соталола известно лишь несколько новых препаратов, которые, однако, не

нашли широкого применения. Наиболее часто используемый и эффективный амиодарон имеет серьезные недостатки: долго накапливается в жировой ткани, в течение нескольких недель выводится, что создает неудобства при его назначении и отмене, а также обладает побочными действиями, ограничивающими его применение. Все это стимулировало поиск новых антиаритмиков III класса.

Более 20 лет назад в Химикофармацевтическом институте синтезировано несколько соединений, наиболее перспективное из которых получило название нибентан. Электрофизиологические механизмы действия этого средства и его антиаритмическая активность подробно изучены на животных в лаборатории электрофизиологии сердца, а клинические испытания прошли в отделе клинической электрофизиологии РКНПК. Установлено, что нибентан, уменьшая выходящий калиевый ток задержанного выпрямления, увеличивает продолжительность трансмембранного потенциала действия кардиомиоцитов за счет удлинения фаз реполяризации без изменения скорости нарастания потенциала действия. Важно, что нибентан, увеличивая длительность рефрактерных периодов (когда кардиомиоциты находятся в невозбужденном состоя-

нии) миокарда предсердий и желудочков, не влияет на процессы проведения возбуждения по сердцу. По клинической эффективности он приближается к электрической кардиоверсии (дефибриляции): положительный эффект достигает 80% после однократного внутривенного введения в дозе 125 мкг/кг, причем эффективен он при купировании не только пароксизмов мерцания и трепетания предсердий, но и хронических (до трех лет) формах этих заболеваний. И все же у нибентана есть ограничения. Во-первых, он разрешен для клинического применения только в условиях стационара под контролем мониторов, поскольку аритмогенный эффект в виде *torsade de pointes* отмечен в 3% случаев. Во-вторых, выпускается он только в виде ампул.

Дальнейшие поиски в ряду аналогов нибентана в Центре химии лекарственных средств привели к созданию нового химического соединения — РГ-2. По результатам наших экспериментов, выполненных на модели фибрилляции предсердий у собак, РГ-2 обладает сходной с нибентаном антиаритмической активностью, причем в дозе на порядок более низкой — 5–10 мкг/кг, что позволяет надеяться на минимальное аритмогенное действие нового препарата.

© Академик Розенштраух Л.В.

НИИ экспериментальной кардиологии,
лаборатория электрофизиологии сердца

© Голицын С.П.,

доктор медицинских наук

Институт клинической кардиологии им.А.Л.Мясникова,
отдел клинической электрофизиологии