

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
"МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА"

На правах рукописи

**КОЧЕГУРА
ТАТЬЯНА НИКОЛАЕВНА**

**МОЛЕКУЛЯРНЫЕ И КЛЕТОЧНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ВЛИЯНИЯ
СОПУТСТВУЮЩЕГО САХАРНОГО ДИАБЕТА 2 ТИПА НА ТЕЧЕНИЕ
СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ**

14.03.03 – патологическая физиология
03.01.04 – биохимия

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Научные консультанты:
академик РАН, доктор
биологических наук,
профессор В.А. Ткачук
доктор медицинских наук,
профессор Е.В. Парфенова

Москва – 2017

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	16
1.1. Современное состояние проблемы хронической сердечной недостаточности при ее сочетании с метаболическими нарушениями.....	16
1.1.1. Молекулярные механизмы в патогенезе хронической сердечной недостаточности.....	22
1.1.1.1. Роль натрийуретических пептидов и системы эндотелина в патогенезе хронической сердечной недостаточности с сопутствующим сахарным диабетом 2 типа.....	22
1.1.1.2. Роль адипоцитокинов в патогенезе хронической сердечной недостаточности с сопутствующим сахарным диабетом 2 типа.....	26
1.1.1.3. Роль ангиогенных факторов роста в патогенезе хронической сердечной недостаточности с сопутствующим сахарным диабетом 2 типа.....	29
1.1.2. Клеточные механизмы в патогенезе хронической сердечной недостаточности с сопутствующим сахарным диабетом 2 типа. Роль метаболических факторов риска.....	35
1.1.2.1. Эндотелиальная дисфункция как ранний этап повреждения сосудов в патогенезе хронической сердечной недостаточности с сопутствующим сахарным диабетом 2 типа...	37
1.1.2.2. Роль циркулирующих прогениторных клеток в репарации сосудов.....	44
1.1.2.3. Роль мезенхимальных стволовых клеток в репарации сосудов.....	47
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	52
2.1. Клиническая характеристика групп обследованных. Дизайн исследования.....	52
2.2. Функциональные методы исследования.....	63
2.3. Биохимические и молекулярные методы исследования.....	67
2.4. Клеточные методы исследования.....	72
2.5. Статистический анализ.....	80
ГЛАВА 3. ВЛИЯНИЕ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ РИСКА НА ПРОГЕНИТОРНЫЕ КЛЕТКИ СОСУДОВ.....	82

3.1. Влияние гипергликемии на функциональные характеристики мезенхимальных стромальных клеток.....	83
3.1.1. Влияние гипергликемии на количество мезенхимных стволовых клеток с высоким клоногенным потенциалом в популяции мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани...	83
3.1.2. Влияние гипергликемии на пролиферативную активность и апоптоз мезенхимальных стромальных клеток.....	84
3.1.3. Влияние гипергликемии на миграцию мезенхимальных стромальных клеток.....	87
3.1.4. Влияние гипергликемии на уровень гликозилирования клеточных белков.....	88
3.1.5. Влияние гипергликемии на ангиогенную активность мезенхимальных стромальных клеток.....	90
3.1.6. Влияние гипергликемии на экспрессию факторов, регулирующих ангиогенез.....	92
3.2. Влияние липопротеидов низкой плотности <i>in vitro</i> на мезенхимальные стромальные клетки.....	98
ГЛАВА 4. РЕГЕНЕРАТИВНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК СОСУДОВ У БОЛЬНЫХ ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА И СОПУТСТВУЮЩИМ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2 ТИПА.....	106
4.1. Особенности функциональных характеристик мезенхимальных стромальных клеток у больных ишемической болезнью сердца и сопутствующим сахарным диабетом 2 типа.....	107
4.1.1. Клинико-демографическая характеристика больных ишемической болезнью сердца и сопутствующим сахарным диабетом 2 типа.....	107
4.1.2. Функциональная активность мезенхимальных стромальных клеток у больных ишемической болезнью сердца и сопутствующим сахарным диабетом 2 типа.....	107
4.1.2.1. Иммунофенотип мезенхимальных стромальных клеток у больных ишемической болезнью сердца и сопутствующим сахарным диабетом 2 типа.....	107
4.1.2.2. Пролиферативная активность мезенхимальных стромальных клеток у больных ишемической болезнью сердца и сопутствующим сахарным диабетом 2 типа.....	108

4.1.2.3 Ангиогенная активность мезенхимальных стромальных клеток у больных ишемической болезнью сердца и сопутствующим сахарным диабетом 2 типа.....	109
4.1.2.4. Роль ингибитора активатора плазминогена-1 в регуляции ангиогенной активности мезенхимальных стромальных клеток у больных ишемической болезнью сердца и сопутствующим сахарным диабетом 2 типа.....	114
ГЛАВА 5. КЛИНИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ (БИОХИМИЧЕСКИЕ) ФАКТОРЫ, АССОЦИИРОВАННЫЕ С НЕБЛАГОПРИЯТНЫМ ТЕЧЕНИЕМ ИШЕМИЧЕСКОЙ ХРОНИЧЕСКОЙ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ С СОПУТСТВУЮЩИМ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2 ТИПА.....	122
5.1. Клинико-функциональные характеристики больных с ишемической хронической сердечной недостаточностью и сопутствующим сахарным диабетом 2 типа.....	122
5.2. Циркулирующие концентрации натрийуретических пептидов и эндотелина-1 у больных с ишемической хронической сердечной недостаточностью и сопутствующим сахарным диабетом 2 типа....	129
5.3. Циркулирующие концентрации натрийуретических пептидов и эндотелина-1 и частота сердечно-сосудистых осложнений у больных с ишемической хронической сердечной недостаточностью и сопутствующим сахарным диабетом 2 типа.....	140
ГЛАВА 6. МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ У БОЛЬНЫХ ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА КАК ФАКТОРЫ ОТЯГОЩЕННОГО ТЕЧЕНИЯ ИШЕМИЧЕСКОЙ ХРОНИЧЕСКОЙ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ.....	155
6.1. Анализ композиционного состава тела и его клиническое значение у больных с ишемической хронической сердечной недостаточностью, ассоциированной с ожирением и сахарным диабетом 2 типа.....	155
6.2. Циркулирующие адипоцитокينات у больных с ишемической хронической сердечной недостаточностью и сопутствующим ожирением и сахарным диабетом 2 типа.....	164
ГЛАВА 7. КЛИНИЧЕСКОЕ И ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ АНГИОГЕННЫХ ФАКТОРОВ РОСТА У БОЛЬНЫХ С ИШЕМИЧЕСКОЙ	

ХРОНИЧЕСКОЙ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ И СОПУТСТВУЮЩИМ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2 ТИПА.....	185
7.1. Клиническое значение циркулирующих ангиогенных факторов роста у больных с ишемической хронической сердечной недостаточностью и сопутствующим сахарным диабетом 2 типа....	185
7.2. Прогностическое значение циркулирующих ангиогенных факторов роста и частота сердечно-сосудистых осложнений у больных с ишемической хронической сердечной недостаточностью и сопутствующим сахарным диабетом 2 типа.....	195
ГЛАВА 8. КЛИНИЧЕСКОЕ И ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК И ЧАСТОТА СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ У БОЛЬНЫХ С ИШЕМИЧЕСКОЙ ХРОНИЧЕСКОЙ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ И СОПУТСТВУЮЩИМ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2 ТИПА.....	208
8.1. Количество циркулирующих прогениторных клеток у больных с ишемической хронической сердечной недостаточностью.....	210
8.1.1. Влияние гипергликемии на количество циркулирующих прогениторных клеток у больных с ишемической хронической сердечной недостаточностью и сопутствующим сахарным диабетом 2 типа.....	212
8.1.2. Количество циркулирующих прогениторных клеток у больных сахарным диабетом 1 типа.....	215
8.2. Прогностическое значение циркулирующих прогениторных клеток у больных с ишемической хронической сердечной недостаточностью и сопутствующим сахарным диабетом 2 типа....	216
8.3. Анализ прогностической значимости исследованных молекулярных факторов и циркулирующих прогениторных клеток у больных с ишемической хронической сердечной недостаточностью и сопутствующим сахарным диабетом 2 типа.....	223
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	232
ВЫВОДЫ.....	237
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	240
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	242
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	245
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	299

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Хроническая сердечная недостаточность (ХСН), в большинстве случаев ишемической этиологии, остается одной из важнейших проблем современной кардиологии, несмотря на существенный прогресс в медикаментозном, эндоваскулярном и хирургическом лечении. В последние годы наблюдается неуклонно прогрессирующий рост распространенности ХСН, приобретающий характер эпидемии, что является значительной социальной и экономической нагрузкой на общество [7, 32, 34]. В Российской Федерации ХСН диагностирована у 7% населения, причем у людей старше 90 лет ее частота достигает 70%. Пятилетняя выживаемость после постановки диагноза ХСН составляет менее 50% [49, 78, 105].

В настоящее время как в России, так и во всех развитых странах мира в структуре основных причин ХСН помимо артериальной гипертензии (АГ) и ИБС возрастает доля сахарного диабета 2 типа (СД2), который в общероссийской выборке встречается в 16 % случаев и достигает 27% в общеевропейской выборке [48, 120, 360, 364]. При этом метаболические нарушения, в частности гипергликемия, как фактор риска смерти, занимает третье место, уступая только артериальной гипертензии и курению, а ожирение входит в пятерку лидеров факторов риска смерти [93, 112, 230, 293].

При ХСН, наличие сопутствующего СД2 сопряжено с более высокой общей и сердечно-сосудистой смертностью, а также с большей частотой нефатальных осложнений, являющихся причинами повторных госпитализаций [115, 188, 252]. Важная роль СД2, как коморбидности, осложняющей течение ХСН, диктует необходимость выяснения патофизиологических механизмов, посредством которых сопутствующий СД2 может ухудшать прогноз ХСН, что необходимо для повышения эффективности лечения данной категории больных.

Большинство сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) сопряжены с нарушениями углеводного и липидного обмена, к которым со временем присоединяется воспаление в жировой ткани, развитие резистентности к инсулину и ожирение, эндотелиальная дисфункция, атеросклеротическое ремоделирование сосудов, гипертрофия миокарда, увеличение его жесткости и диастолическая дисфункция левого желудочка (ДД ЛЖ) [21, 35, 375]. В последнее десятилетие в качестве молекулярных факторов, вовлеченных в усугубление структурно-функциональных изменений сердца и сосудов у больных ССЗ, сочетающимися с метаболическими нарушениями, рассматриваются такие, как дисбаланс циркулирующих гормонов [211], факторов роста [214], воспалительных цитокинов [275] и адипокинов [206]. Помимо этого, в последние годы представлены убедительные доказательства роли стволовых и прогениторных клеток в репарации и обновлении тканей сердца и сосудов, а также влиянии факторов риска ССЗ на клеточное звено репаративных-регенеративных процессов [225, 257, 340, 384]. В связи с этим особый интерес и актуальность для современной кардиологии представляет исследование влияния сопутствующего СД2 и присущих ему метаболических нарушений (гипергликемии и гиперлипидемии) на стволовые и прогениторные клетки, вовлеченные в репарацию сердца и сосудов в комплексе с изучением циркулирующих гормонов, ангиогенных факторов, воспалительных цитокинов и адипокинов и в сопоставлении с нарушениями систолической и диастолической функции сердца, выраженностью эндотелиальной дисфункции, прогнозом течения больных с ХСН, что позволит выявить новые мишени для терапевтических воздействий, направленных на улучшение прогноза этой категории кардиологических больных.

Степень разработанности темы исследования. Известно, что СД2, как коморбидность, лидирует среди прочих заболеваний, отягощающих клиническое течение всех без исключения ССЗ, в основном за счет раннего развития сердечно-сосудистых осложнений, ухудшающих прогноз. Длительное

время считалось, что компенсация углеводного обмена у больных СД2 является ключевым фактором профилактики сердечно-сосудистых осложнений, однако, данные мета-анализов показали, что даже интенсивный контроль гликемии не уменьшает риск развития сердечно-сосудистых осложнений [274, 288, 377]. Это позволило предположить, что мишенью воздействий, направленных на предотвращение неблагоприятного влияния сопутствующего СД2, должны быть и другие факторы, определяющие механизмы этого влияния. В экспериментальных исследованиях убедительно показана роль стволовых и прогениторных клеток в репарации сердца и сосудов [57, 64, 122, 172, 342, 389]. Более того, нарушения функционирования этих клеток могут быть вовлечены в развитие микро- и макрососудистых осложнений. В последние годы большое внимание привлечено к исследованию влияния сахарного диабета и гипергликемии на функциональное состояние циркулирующих эндотелиальных прогениторных клеток (ЭПК), участвующих в репарации поврежденного эндотелия и васкулогенезе в ишемизированных тканях. Показано, что уменьшение продукции оксида азота при СД 2 типа является ключевым фактором, определяющим нарушение репаративных функций ЭПК, что может способствовать дисфункции эндотелия [196, 221, 393]. Нарушение функций ЭПК при сахарном диабете обусловлено множественными патофизиологическими механизмами, включающими воспаление, оксидативный стресс, дисфункцию Akt и eNOS сигнальных путей, обусловленную нарушением экспрессии регуляторных микро РНК (miR-126), что может воздействовать на различные функции ЭПК: дифференцировку и мобилизацию в костном мозге, выживание в циркуляции, хоуминг и участие в неоваскуляризации тканей [224, 289, 407]. Особое внимание привлечено к исследованию молекулярных механизмов влияния высокой концентрации глюкозы на прогениторные клетки. Установлено, что увеличенная продукция активных форм кислорода митохондриями играет критическую роль в развитии дисфункции ЭПК при воздействии высокой концентрации глюкозы [210, 240].

Однако, остается неясным, насколько нарушения функционального состояния прогениторных клеток, вызванные сопутствующим сахарным диабетом, могут влиять на прогноз больных. Поскольку в реализации репаративных процессов в тканях принимают участие различные типы прогениторных клеток, включающие помимо циркулирующих клеток костномозгового происхождения и тканевые резидентные прогениторные клетки, для понимания механизмовотягощающего влияния сопутствующего СД2 на течение сердечной недостаточности важно исследовать влияние диабета и сопутствующих ему метаболических нарушений и на другие типы прогениторных клеток, а также другие компоненты, определяющие важнейшее звено организма - систему регенерации. К таким компонентам относятся факторы роста, цитокины, хемокины и адипокины.

Цель исследования: выяснение молекулярных и клеточных механизмов, ассоциированных с сопутствующим сахарным диабетом 2 типа и влияющих на течение и прогноз у больных с ишемической (постинфарктной) хронической сердечной недостаточностью.

Задачи исследования:

1. Исследовать механизмы влияния метаболических нарушений (гипергликемии и гиперлипидемии) в условиях моделирования *in vitro* на прогениторные клетки.
2. Оценить ангиогенные свойства мезенхимальных стволовых (стромальных) клеток жировой ткани при ишемической болезни сердца и сопутствующем сахарном диабете 2 типа.
3. Исследовать влияние сопутствующего сахарного диабета 2 типа на клинико-биохимические и функциональные характеристики пациентов с ишемической болезнью сердца и постинфарктной хронической сердечной недостаточностью.
4. Изучить уровни ангиогенных факторов роста, циркулирующих натрийуретических пептидов, адипоцитокинов и эндотелина-1 у пациентов с

ишемической болезнью сердца и постинфарктной хронической сердечной недостаточностью при сочетании с сахарным диабетом 2 типа.

5. Оценить корреляцию выраженности диастолической дисфункции миокарда левого желудочка у больных постинфарктной хронической сердечной недостаточностью, сочетающейся с сахарным диабетом 2 типа с уровнем в крови натрийуретических пептидов, эндотелина-1, ангиогенных факторов роста и адипоцитокинов.

6. Исследовать влияние сопутствующего сахарного диабета 2 типа на количество циркулирующих прогениторных клеток у больных ишемической болезнью сердца с постинфарктной хронической сердечной недостаточностью.

7. Изучить в процессе проспективного наблюдения прогностическое значение: количества циркулирующих прогениторных клеток, уровня ангиогенных факторов роста и адипоцитокинов, эндотелина-1 в связи с уровнем натрийуретических пептидов у пациентов постинфарктной хронической сердечной недостаточностью, сочетающейся с сахарным диабетом 2 типа.

Научная новизна. Впервые в экспериментально-клиническом исследовании проведен анализ влияния сопутствующего сахарного диабета 2 типа, с присущими ему метаболическими нарушениями (гипергликемией и гиперлипидемией), у больных ишемической болезнью сердца и постинфарктной ХСН, на комплекс параметров, характеризующих систему репарации/регенерации тканей и органов: на характеристики циркулирующих и тканевых прогениторных клеток, уровень факторов роста, регулирующих ангиогенез, цитокинов и адипокинов. В результате проведенных исследований впервые получены данные о повреждающем действии метаболических нарушений (гипергликемии и гиперлипидемии) на клеточное звено системы регенерации: на циркулирующие прогениторные клетки и резидентные прогениторные клетки - МСК жировой ткани, которые являются наиболее

широко используемым в регенеративной медицине типом клеток для аутологичной клеточной терапии.

Впервые установлено, что у пациентов ХСН, при наличии СД2, гипергликемия ассоциируется со снижением количества ЦПК, участвующих в обновлении/репарации эндотелия и васкулогенезе в ишемизированных тканях, и подавляет способность МСК стимулировать ангиогенез посредством паракринных эффектов, что является важной составляющей репаративных/регенеративных процессов.

Впервые установлено, что наличие сопутствующего сахарного диабета 2 типа у пациентов с постинфарктной ХСН ассоциируется с повышенным уровнем ангиогенных факторов (VEGF, VEGFR1, HGF) в периферической крови, который не коррелирует с тяжестью ХСН, но ассоциируется с выраженностью нарушений углеводного обмена.

В работе впервые показано, что значительное снижение количества $CD34^{+}$ ЦПК ассоциируется с плохим прогнозом (более высокой смертностью) у пациентов с постинфарктной ХСН, сочетающейся с сахарным диабетом 2 типа.

Теоретическая значимость работы. Несмотря на то, что за последние 20 лет произошла смена парадигм как во взглядах на патогенез, так и на лечение ХСН, тем не менее, исследования, посвященные влиянию коморбидности, в частности, СД2 на течение сердечной недостаточности с позиции ухудшения регенеративных процессов, крайне ограничены. Результаты данной работы указывают, что нарушения в клеточном звене регенерации, обусловленные влиянием сопутствующего СД2, могут являться новым патогенетическим звеном, отягощающим течение постинфарктной ХСН. Из этого следует, что стволовые и прогениторные клетки и механизмы, регулирующие их регенеративные функции, являются перспективными мишенями для разработки новых подходов к лечению этой категории больных.

Практическая значимость работы. В ходе выполнения данного исследования установлено, что количество $CD34^{+}$ ЦПК является

перспективным новым прогностическим маркером для больных постинфарктной ХСН, особенно при сочетании с СД2, что необходимо подтвердить в крупных проспективных исследованиях. Выявленное в исследовании значительное снижение количества CD34⁺ ЦПК у больных с неблагоприятным прогнозом течения ХСН указывает на эту категорию больных, как на целевую для применения клеточной терапии. Разработанная электронная карта-история болезни используется для дальнейших проспективных исследований в Научно-консультативном отделе ФГБУ "НМИЦ кардиологии" Минздрава России.

Методология и методы исследования. Работа состоит из трех частей. Первая - экспериментальная часть работы посвящена изучению механизмов влияния метаболических нарушений (гипергликемии и гиперлипидемии) в условиях их моделирования *in vitro* на важные для регенерации свойства мезенхимальных стволовых клеток. Для этого нами были использованы *in vitro* модели (клеточные модели), имитирующие воздействие метаболических факторов на клетки, а именно на функциональные свойства МСК жировой ткани, определяющие их регенеративный потенциал.

Вторая клинико-экспериментальная часть работы посвящена сравнительному исследованию функциональных характеристик МСК жировой ткани, в частности, их способности стимулировать ангиогенез за счет паракринной активности, у больных ИБС в сочетании с СД2 и без СД2 и пациентов без ИБС.

Третья, клиническая часть работы включала одномоментное и проспективное исследование больных ИБС с постинфарктной ХСН с сопутствующим СД2 и без СД2, а также одномоментное клиническое исследование больных СД 1 и 2 типов в качестве контрольных групп. На первом этапе клинической части работы проводилось одномоментное исследование клинических особенностей больных в сопоставлении с данными оценки функции сердца, функции эндотелия, показателями ремоделирования

сосудистой стенки, составом тела, молекулярными и клеточными факторами, вовлеченными в компенсаторно-приспособительные реакции при ХСН. На втором этапе в ходе проспективного наблюдения проведен анализ клинического течения ХСН и риска развития неблагоприятных сердечно-сосудистых событий в сопоставлении с исходными уровнями исследованных параметров и факторов для определения их прогностической значимости.

Положения, выносимые на защиту:

1. В условиях моделирования метаболических нарушений (гипергликемии и гиперлипидемии) *in vitro* установлено повреждающее действие этих факторов на свойства МСК (стволовых клеток), важные для реализации их регенеративного потенциала, что, вероятно, может являться важным фактором неблагоприятного влияния сахарного диабета 2 типа на течение постинфарктной ХСН.

2. Активность системы натрийуретических пептидов у пациентов с ишемической ХСН, в сочетании с СД2, ассоциируется со степенью диастолической дисфункции ЛЖ и не компенсирует высокую сывороточную активность эндотелина-1.

3. У пациентов с ишемической ХСН сопутствующие нарушения углеводного обмена, но не тяжесть сердечной недостаточности, ассоциируются с повышением уровней ангиогенных факторов роста (VEGF, sVEGFR1 и HGF) в периферической крови.

4. У пациентов с ишемической ХСН в сочетании с СД2, низкий уровень циркулирующих прогениторных клеток ассоциируется с гипергликемией, не зависит от тяжести сердечной недостаточности и является независимым предиктором неблагоприятного течения ИБС.

Степень достоверности и апробация работы. Апробация диссертации состоялась 18 апреля 2017 г. на совместном заседании кафедры биохимии и молекулярной медицины, лаборатории генных и клеточных технологий, лаборатории постгеномных технологий Факультета фундаментальной

медицины МГУ имени М.В. Ломоносова, научно-поликлинического отделения медицинского научно-образовательного центра МГУ и лаборатории ангиогенеза ФГБУ "Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии" Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Основные результаты работы были представлены на российских и международных конференциях: Всероссийский симпозиум по биологии клетки в культуре "Культивируемые клетки как основа клеточных технологий", Санкт-Петербург, (2009), 9th International Congress on Coronary Artery Disease (ICCAD), Venice, (2011), the 3rd International Congress on Abdominal obesity, Quebec - Canada, (2012), V Всероссийская научно-практическая конференция "Стволовые клетки и регенеративная медицина", (2013), Heart Failure Congress, Lisbon - Portugal, (2013), ESC Congress, Amsterdam - Netherlands, (2013). Российский национальный конгресс кардиологов "Инновации и прогресс в кардиологии", Казань (2014), IV международная научно-практическая конференция "Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине", Казань, (2014), IV съезд физиологов СНГ, Сочи - Дагомыс, (2014), Heart Failure Congress 2014 and the 1st World Congress on Acute Heart Failure, Athens, Greece, (2014), the American Society of Gene & Cell Therapy, Washington, (2014), Российский национальный конгресс кардиологов, Санкт-Петербург, (2017), III Национальный конгресс по Регенеративной медицине, Москва, (2017).

Внедрение результатов в практику. Материалы диссертационного исследования внедрены и используются в учебном процессе кафедры биохимии и молекулярной медицины, кафедры физиологии и общей патологии факультета фундаментальной медицины ФГБОУ ВО "Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова". Результаты исследования внедрены в лабораторную практику Отдела лабораторной диагностики медицинского научно-образовательного центра ФГБОУ ВО "Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова".

Публикации результатов исследования. По теме диссертации опубликовано 35 печатных работ, из них 20 – в изданиях, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий или входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России для опубликования основных научных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук и издания, приравненные к ним, в том числе 5 патентов на изобретение РФ.

Личный вклад автора в исследование. Диссертант непосредственно участвовал в планировании и организации исследований, проведении всех экспериментов *in vitro*, анализе экспериментальных и клинических результатов, формулировке научных положений и выводов, написании статей и представлении результатов работы на научных конференциях. Личный вклад автора в написании научных работ по теме диссертации - 85%. Соавторы указаны в публикациях.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 308 страницах текста, содержит 41 рисунок, 41 таблицу. Состоит из разделов: "Введение", "Обзор литературы", "Материалы и методы", "Результаты и обсуждение", "Заключение", "Выводы", "Практические рекомендации", "Список литературы". Библиография включает 416 ссылок, из них 50 отечественных и 366 иностранных авторов.

ГЛАВА 1

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Современное состояние проблемы хронической сердечной недостаточности при ее сочетании с метаболическими нарушениями

Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) являются основной причиной смерти во всем мире. На сегодняшний день среди всех ССЗ ишемическая болезнь сердца (ИБС) и ее осложнения (инфаркт миокарда и хроническая сердечная недостаточность) занимают лидирующие позиции.

По данным Российских эпидемиологических исследований распространенность ХСН в общей популяции составила 7%, в том числе клинически выраженная - 4,5%, увеличиваясь от 0,3% в возрастной группе от 20 до 29 лет до 70% у лиц старше 90 лет. В РФ основными причинами ХСН являются артериальная гипертензия (АГ) и ИБС. Их комбинация встречается у половины пациентов. Примерно половина больных ХСН имеют сниженную фракцию выброса левого желудочка (ХСН-СФВ), другая половина - нормальную (ХСН-НФВ) [7, 17, 21, 32, 34, 49, 78, 104, 105]

Общим для всех эпидемиологических исследований является вывод о резком повышении заболеваемости ХСН с увеличением возраста больных, что ведет к "постарению" контингента пациентов с ХСН в целом [104, 230].

До 1990-х годов 60-70% пациентов с ХСН умирали в течение 5 лет. Современная терапия позволила уменьшить как количество повторных госпитализаций в связи с декомпенсацией ХСН, так и смертность. Тем не менее, в РФ средняя годовая смертность среди пациентов с ХСН I-IV ФК составляет 6%, а среди больных с клинически выраженной ХСН - 12% [7, 49, 176].

Несмотря на достигнутые успехи в лечении ХСН прогноз больных по-прежнему серьезный. Все еще остается открытым вопрос о том, почему, несмотря на проводимое лечение с применением в первую очередь таких

патогенетических средств терапии, как ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента (иАПФ), блокаторы рецепторов к ангиотензину II, β -адреноблокаторы, антагонисты минералокортикоидных рецепторов, реализующих свои эффекты через устранение негативного влияния чрезмерной нейрогормональной активации на уровне основных органов-мишеней, сердечная недостаточность прогрессирует и приводит к летальным исходам.

Одним из возможных объяснений недостаточной эффективности традиционных подходов в лечении ХСН может являться влияние коморбидной патологии на тяжесть и прогноз ХСН [48, 49]. Наличие у больного ХСН сопутствующих заболеваний, среди которых чаще всего встречаются АГ, обменные нарушения, включая сахарный диабет 2 типа (СД2) и ожирение ускоряет развитие сердечно-сосудистых катастроф и в целом ухудшает прогноз. Взаимодействие ХСН с диабетом или ожирением, а также с теми функциональными и морфологическими изменениями, которые происходят на фоне соответствующей фармакотерапии, может существенно изменять как клиническую картину и течение основного заболевания, так и характер осложнений. Можно предполагать, что подобная коморбидность вносит определенный вклад в механизмы отягощения и прогрессирования ХСН [10, 48, 62, 120, 141, 147, 178, 406].

Отмечено, что в большинство проведенных рандомизированных клинических исследований авторы включали больных с ХСН отдельной патологией, делая, например, диабет, как коморбидность, критерием исключения. Поэтому подробные исследования, посвященные оценке сочетания тех или иных отдельно взятых заболеваний, трудно отнести к работам, изучающим ХСН при сопутствующей патологии.

В исследовании ЭПОХА-ХСН было показано, что относительный вклад диабета в развитие ХСН уступает лишь АГ и ИБС [7, 32, 48], но каким образом диабет реализует процессы развития ХСН, это вопрос остается до конца

неизученным. Отсутствие научного подхода к оценке коморбидности влечет за собой пробелы в понимании механизмов отягощения ХСН в случае ее сочетания с метаболическими нарушениями [10, 367, 371].

Наибольшим изменениям само понимание патогенеза ХСН была подвергнуто в последние десять лет, результатом чего стал пересмотр национальных и международных рекомендаций по диагностике и лечению ХСН [21, 33, 343].

В наши дни концепция патогенеза ХСН включает в себя представления о роли гиперактивации симпатической нервной системы, ангиотензин-альдостероновой системы, об иммунопатологии сердечной недостаточности, о роли апоптоза в утрате функционирующих кардиомиоцитов и генетических факторов [9] в развитии систолической и диастолической дисфункции сердца, но не учитывает влияние коморбидных состояний [360].

На сегодняшний день помимо изменения этиологической структуры сердечной недостаточности, имеются также некоторые характерные эпидемиологические черты, в частности, отмечается все большее старение населения, признаки ХСН чаще стали встречаться у пациентов более старших возрастных групп с сопутствующими обменными нарушениями, включая СД2 и нарушение жирового обмена [48, 262, 263, 360, 364, 394]. Поэтому проблема ХСН при таких коморбидных состояниях как диабет и ожирение является чрезвычайно актуальной.

В настоящее время СД2 стали относить к ССЗ, поскольку смертность при диабете обусловлена именно сердечно-сосудистыми осложнениями. Наиболее частыми, ранними и инвалидизирующими осложнениями СД2 являются такие как диабетическая ретинопатия, диабетическая нефропатия, ИБС, инфаркт миокарда, сердечная недостаточность, артерио-венозные тромбозы, полинейропатия. У больных СД2 смертность от болезней сердца и инсульта выше в 2-3 раза, слепота - в 10 раз, нефропатия - в 12-15 раз, гангрена нижних конечностей - почти в 20 раз, чем среди населения в целом. По оценкам в 2010

году 3,4 млн. человек умерли от последствий высокого содержания сахара в крови натошак [112, 187,193, 230, 365]. По прогнозам, в 2030 году диабет станет седьмой по значимости причиной смерти [248].

По данным Spanish National Registry on Heart Failure-"Registro Nacional de Insuficiencia Cardíaca" (RICA) мультицентрового проспективного 3х-летнего исследования с участием 1082 пациентов, среди которых 490 больных (45,3%) страдали СД2 и 592 больных ХСН с сохраненной ФВЛЖ (54,7%), в течение первого года наблюдения умерло 287 больных (из них 151 с СД2); 383 больных были повторно госпитализированы по поводу декомпенсации ХСН (среди них 197 больных с СД2). Было показано, что СД2 ассоциируется со всеми случаями смерти (HR 1,54; 95%CI 1,20-1,97, $p=0,001$) и регоспитализаций (HR 1,46; 95%CI 1,18-1,80, $p<0,001$). Уровень смертности между больными ХСН с сохраненной ФВЛЖ и больными ХСН со сниженной ФВЛЖ не отличался [86, 110, 114, 115, 139].

В проспективном клиническом исследовании с участием 8683 больных СД2 было показано, что уровни гликозилированного гемоглобина $HbA1c <6\%$ (HR=1,60, 95% CI 1,38-1,86, $p<0,0001$), так же как $HbA1c >10\%$ (HR = 1,80, 95% CI 1,60-2,16 $p<0,0001$) были независимыми факторами риска развития ХСН. У 8% больных СД2 в течение $5,5 \pm 2,8$ лет ($M \pm SD$) наблюдения была диагностирована сердечная недостаточность. Авторы отмечают, что меньшая индивидуальная вариабельность $HbA1c$ у больного СД2 ассоциируется с меньшим риском ХСН [45, 93, 99, 288, 317, 351]. Связь нарушений углеводного обмена и развитием ССЗ, включая сердечную недостаточность, продемонстрирована и в ряде других исследований [166], однако механизмы, лежащие в их основе до сих пор не выяснены. В числе вероятных механизмов прогрессирования ХСН, ассоциированной с нарушением углеводного обмена, исследователи обсуждают апоптоз клеток сосудов и оксидативный стресс [56, 68, 70, 82, 94].

По итогам недавно завершившегося международного многоцентрового исследования EMPA-REG OUTCOME с участием больных СД2 и сердечно-сосудистыми событиями в анамнезе, посвященного оценке влияния перорального приема 10 мг и 25 мг препарата эмпаглифлозин (селективный и конкурентный ингибитор натрийзависимого переносчика глюкозы 2-го типа) на сердечно-сосудистую заболеваемость и смертность у больных диабетом, было документировано, что независимо от наличия или отсутствия сердечной недостаточности, эмпаглифлозин достоверно уменьшал показатель госпитализации по поводу сердечной недостаточности, сердечно-сосудистой смертности и общей смертности у пациентов с СД2 и высоким сердечно-сосудистым риском. Возможно, что механизмы, определившие снижение ССС, связаны в большей степени с влиянием на сердечную недостаточность, однако, вероятны и другие плеiotропные эффекты препарата. Некоторые эксперты высказали гипотезу, что кардиопротективные свойства эмпаглифлозина, по-видимому, обусловлены ангиопротекторным действием, нежели антигипергликемическими или антигипертензивными свойствами препарата [416].

Диабет характеризуется не только повышенным содержанием глюкозы в плазме натощак, но в большинстве случаев, характеризуется и другими метаболическими нарушениями, такими как дислипидемия (гиперхолестеринемия, гипертриглицеридемия), гиперурикемия, гипергомоцистеинемия, которые сами по себе являются доказанными факторами риска ХСН и смерти, также как ожирение, которое часто сопутствует СД2 [160, 185, 188, 232, 250].

По последним глобальным оценкам ВОЗ с 1980 года число лиц во всем мире, страдающих ожирением более чем удвоилось. В 2008 году более 1,4 млрд. взрослых людей в возрасте 20-ти лет и старше страдали от избыточного веса. Из этого числа свыше 200 млн. лиц мужского пола и почти 300 млн. лиц женского пола страдали ожирением. В 2008 году 35% людей в возрасте 20 лет и

старше имели избыточный вес, а 11% страдали от ожирения. 65% населения мира проживают в странах, где избыточный вес и ожирение приводят к смерти большее число людей, чем пониженная масса тела. Ожирение и диабет ассоциируется с увеличением сердечно-сосудистого риска и смертностью. В популяционном исследовании Glogner S. et al. (2014), с участием 83 021 больных диабетом в течение 7 лет наблюдения было обнаружено, что ожирение ($ИМТ > 30 \text{ кг/м}^2$) ассоциируется с увеличенным риском госпитализаций как среди мужчин так и среди женщин по поводу ХСН. Было убедительно показано, что ожирение является мощным фактором риска ХСН у больных диабетом 2 типа [161, 282, 293].

В ретроспективном исследовании Pinho E. M. et al. (2014), при наблюдали 503 больных с систолической ХСН в течение 5 лет было показано, что избыточная масса тела при ХСН ассоциируется с большей выживаемостью только в случае отсутствия диабета (больные ХСН без СД2 $HR=0,93$; 95% CI: 0,89-0,98 кг/м^2 vs. больные ХСН, сочетающейся с СД2 $HR=0,99$; 95% CI: 0,94-1,04; $P=0,009$). $ИМТ < 25 \text{ кг/м}^2$ увеличивал риск смерти больных ХСН в 1,9 раза (95% CI: 1,23-2,94) независимо от сопутствующего диабета [293, 373, 374].

В настоящее время дискутируется "парадокс ожирения" и при диабете. Известно, что 85% больных СД2 страдают избыточной массой тела или ожирением, однако все еще до конца не выясненным остается вопрос каким образом диабет инициирует нарушение жирового обмена или же наоборот, избыточная масса тела является фактором риска диабета [30, 40, 43, 45, 366].

Так, по данным McEwen L.N. et al. (2007), в исследовании с участием 8733 больных диабетом, наблюдавшихся более 3-х лет показано увеличение общей ($n=79$) и сердечнососудистой ($n=336$) смертности у больных СД2 с нормальной массой тела в сравнении с больными диабетом, имеющими избыточный вес [252].

В проспективном исследовании с участием 5202 больных с ССЗ в течение 34,5 месяцев Doehner W. et al. (2012), обнаружили высокую общую смертность

у лиц с ИМТ < 22 кг/м² или с ИМТ = 22-25 кг/м² в сравнении с больными ожирением [125, 371, 375].

Eeg-Olofsson K. et al. (2009), при наблюдении 13 087 больных СД2 без хронической ИБС на момент включения в исследование выявили увеличение общей и ССС у больных СД2 и ожирением, в сравнении с больными СД2 и нормальной массой тела [132, 235].

Проспективное исследование NHANES с участием 602 больных диабетом было одним из первых, в котором не было обнаружено взаимосвязи ожирения и общей смертности, однако была выявлена прямая взаимосвязь ожирения и смертностью от сердечно-сосудистых причин у больных СД2 [147].

Несмотря на достаточное количество клинических исследований, подтверждающих взаимосвязь заболеваний обменного характера (диабета и ожирения) и смертностью от сердечно-сосудистых причин, фундаментальных исследований, направленных на поиск механизмов отягощения ХСН при нарушениях углеводного и жирового обмена крайне недостаточно.

1.1.1. Молекулярные механизмы в патогенезе хронической сердечной недостаточности

1.1.1.1. Роль натрийуретических пептидов и системы эндотелина в патогенезе хронической сердечной недостаточности с сопутствующим сахарным диабетом 2 типа

Особое место в патогенезе ХСН принадлежит натрийуретическим пептидам (НУП).

Известно, что у больных сердечной недостаточностью НУП противодействуют перегрузке давлением и объемом, обладают антифибротическим и антигипертрофическим действием на миокард [106, 111, 254].

Последние эпидемиологические исследования продемонстрировали, что NT-proBNP (N-terminal pro B-type natriuretic peptide, N-концевой фрагмент

предшественника мозгового натрийуретического пептида) и MR-proANP (midregional pro-atrial natriuretic peptide, среднерегиональный предсердный натрийуретический пропептид) снижены у больных ожирением, диабетом и инсулиновой резистентностью в целом [61, 138, 164, 302].

Предпосылками для отдельных клинических исследований НУП у больных с метаболическими нарушениями послужили сведения о том, что жировая ткань содержит рецепторы BNP и ANP, которые регулируют многие метаболические процессы, в том числе аппетит, основной обмен, секрецию адипокинов, интенсивность липолиза. Недавние проспективные исследования показали, что низкий уровень циркулирующих NT-proBNP и MR-proANP является независимым фактором риска развития диабета 2 типа [61, 163, 164, 242, 264, 355].

Несмотря на то, что у больных с систолической сердечной недостаточностью показания к выполнению теста на НУП определены достаточно четко, более того, хорошо известны диагностические значения этих маркеров, по-прежнему остается неясной их прогностическая значимость у больных ХСН, сочетанной с СД2 и нарушением жирового обмена и этот вопрос нуждается в дальнейших исследованиях.

В последнее время значительный интерес для исследователей представляет эндотелиновая система, однако, ее роль у больных систолической ХСН, сочетанной с метаболическими нарушениями, включая сахарный диабет, остается не выясненной. Не решенным остается вопрос о взаимосвязи повышенной концентрации циркулирующих эндотелинов и сердечно-сосудистыми осложнениями у больных ИБС и неэффективности ингибиторов эндотелиновых рецепторов у больных ХСН [281, 97], хотя для лечения артериальной легочной гипертензии эти препараты доказали свою эффективность [66, 92].

Эндотелиновая система представлена тремя вазоактивными пептидами (эндотелины-1,2,3). Наибольшей биологической активностью обладает

эндотелин-1 (ЭТ-1). Он секретируется эндотелиальными клетками, фибробластами сердца и кардиомиоцитами. Секреция ЭТ-1 стимулируется ангиотензином II, который, в свою очередь также высвобождается при растяжении кардиомиоцитов. При длительном воздействии ишемии наблюдается персистирующая секреция ЭТ-1, что приводит к гипертрофии миокарда.

По данным некоторых авторов плазменная концентрация ЭТ-1 ассоциируется с пожилым возрастом, курением, низкой фракцией выброса, перенесенным ИМ, реваскуляризирующими вмешательствами на коронарных артериях [23, 178, 200]. На моделях животных с сердечной недостаточностью и у больных ИБС показано повышение экспрессии и активности эндотелин-превращающего фермента, повышение экспрессии ЭТ-1 и ЭТ-А рецепторов [71, 256, 402].

ЭТ-1 реализует свои эффекты через ЭТ-А и ЭТ-В рецепторы. Рецептор ЭТ-А обладает большей афинностью к ЭТ-1, по сравнению с ЭТ-2 и ЭТ-3 и преобладает в сердце. Кроме того, скорость диссоциации комплекса ЭТ-А/ЭТ-1 очень низка, связывание между ними практически необратимое, возможно также ковалентное связывание. Также имеются сведения о том, что интернализация комплекса происходит чаще диссоциации и определяет ответ ЭТ-1. Период полураспада ЭТ-1 менее 5 минут и концентрация в плазме очень низка, но ЭТ-1 локальный может модулировать функцию сердца. Рецептор ЭТ-В не обладает селективностью по отношению к изоформам ЭТ. Относительное содержание рецепторов ЭТ-1 зависит от камер сердца. Так, в предсердиях их число превышает количество рецепторов в желудочках [280, 306, 350].

В экспериментальной работе Widyantoro B. et al (2010) показано, что ЭТ-1 стимулирует трансдифференцировку эндотелиальных клеток в фибробласты, избыточная кумуляция которых способствует развитию фиброза сердца [388].

Повышение уровня эндотелина-1 в плазме при ХСН было выявлено в многочисленных экспериментальных и клинических исследованиях. Так, было

установлено, что при сердечной недостаточности, развивающейся вследствие кардиомиопатии или других причин, продукция эндотелина-1 в миокарде значительно превышала нормальный уровень [71]. При этом концентрация эндотелина-1 в плазме положительно коррелирует с функциональным классом сердечной недостаточности. Исследования у больных показали, что уровень эндотелина-1 и его предшественника больше коррелирует с измененными показателями гемодинамики [28, 202]. Отмечено, что количество рецепторов к эндотелину значительно больше у больных с дисфункцией ЛЖ, развившейся вследствие острой ишемии, чем у больных с дилатационной кардиомиопатией [402]. Вместе с тем ни аффинность, ни популяции субтипов рецепторов не отличались между собой. Таким образом, можно говорить о целостной системе аутопаракринной регуляции, связанной с биосинтезом эндотелина-1 при острой ишемии миокарда и последующем развитии ХСН.

Доказанная во время клинических исследований и в эксперименте неоднородность повышения локальной продукции ЭТ-1, на примере застойной СН, подтверждает способность ЭТ-1 оказывать аутопаракринное влияние на миокард. Наиболее существенное повышение пула гормона было зарегистрировано в миокарде ЛЖ, тогда как в предсердиях и правом желудочке его концентрация не отличалась от нормального уровня. Rothermund L. et al. (2000) установили, что повышение миокардиального пула ЭТ-1 способствует формированию дисфункции ЛЖ с вовлечением Ca^{2+} -зависимых механизмов и представили данные о существовании негативной связи между тканевым содержанием ЭТ-1 и степенью ретенции Ca^{2+} в саркоплазматический ретикулум кардиомиоцитов [306].

Таким образом, результаты многих исследований свидетельствуют о тесной позитивной ассоциации между тяжестью дисфункции ЛЖ, с одной стороны, и активностью тканевой и плазменной составляющей эндотелиновой системы - с другой. Причины повышения тканевой концентрации ЭТ-1 при сердечной недостаточности в настоящее время дискутируются.

Можно выделить, по крайней мере, несколько механизмов, посредством которых ЭТ-1 ухудшает течение сердечной недостаточности. Так, известно, что ЭТ-1 способен оказывать непосредственное токсическое действие на сердечную мышцу и приводить к развитию и прогрессированию сердечной недостаточности. Он может потенцировать митотические влияния других факторов на миокард, а также индуцировать развитие вентрикулярных аритмий [280, 388]. Кроме того, экспрессия рецепторов эндотелина в сердце способна вызывать эксцентрическую гипертрофию ЛЖ. Не исключена возможность того, что нарушения эндотелий-зависимой вазодилатации могут быть обусловлены десенсibilизацией рецепторов эндотелина типа В. Интересно, что по мере прогрессирования сердечной недостаточности экспрессия рецепторов к ЭТ-1 повышается, а их чувствительность - снижается. Предполагают, что утрата положительного инотропного эффекта у больных с тяжелой стадией сердечной недостаточности может быть связана с резким уменьшением плотности рецепторов эндотелина типа А на мембране кардиомиоцитов.

Однако, имеющиеся на сегодняшний день данные клинических исследований не позволяют сделать окончательные выводы о клинической и прогностической значимости циркулирующего ЭТ-1 у больных ХСН, сочетанной в том числе, с диабетом, что является актуальным вопросом при изучении роли коморбидной патологии в отягощенном течении сердечной недостаточности.

1.1.1.2. Роль адипоцитокинов в патогенезе хронической сердечной недостаточности с сопутствующим сахарным диабетом 2 типа

На протяжении длительного времени внимание исследователей привлечено к изучению роли адипоцитокинов жировой ткани в развитии сердечно-сосудистых осложнений у больных ИБС [123, 124, 154, 276, 344]. В настоящее время обнаружено несколько десятков адипоцитокинов и многие из них еще недостаточно охарактеризованы. Среди наиболее изученных с позиции химической структуры и биологической функции адипокинов жировой ткани

выделяют лептин и адипонектин, основным источником которых является преимущественно подкожный жир [51].

Дополнительными источниками лептина служат также висцеральный жир, периваскулярная жировая ткань, эпикардиальный жир, желудок и плацента [298, 344]. По некоторым данным, содержание лептина в эпикардиальном жировом отложении у больных ИБС выше, чем у больных без ИБС [98]. На мышечных кардиомиоцитах показано, что введение лептина стимулирует захват клетками жирных кислот, (но не глюкозы) и кратковременное их окисление, которое в дальнейшем значительно замедляется и способствует внутриклеточной аккумуляции липидов [76, 283]. Результаты аутопсий также свидетельствуют о накоплении липидов в ткани миокарда. По данным других авторов, лептин уменьшает площадь инфаркта после ишемии-реперфузии [253], оказывает кардиопротективное, антиапоптотическое действие на кардиомиоциты в условиях ишемии и гипоксии миокарда, [326]. Для лептина документировано провоспалительное, тромбогенное и проатерогенное действие на эндотелий [73, 108, 245, 270, 321, 390]. В ряде экспериментальных работ обнаружено влияние лептина на гипертрофию миокарда [190, 239, 243, 266, 395], однако в клинических исследованиях это не всегда находило подтверждение [59].

В целом, в клинических исследованиях продемонстрированы неоднозначные результаты. В отдельных исследованиях показана ассоциация повышенного уровня циркулирующего лептина и артериальной гипертензией у больных с ожирением без СД2 [338], в других работах взаимосвязи лептина и сердечно-сосудистыми событиями не выявлено [247]. Клиническое значение циркулирующего лептина у больных сердечной недостаточностью исследовалось в меньшей степени. Имеются единичные работы, в которых показано, что уровень лептина повышен у больных ХСН как без кахексии, так и при кахексии [126, 124], однако его клинико-прогностическая значимость до конца не ясна.

Адипонектин у человека циркулирует преимущественно в виде низкомолекулярного гексамера и высокомолекулярной фракции - мультимера (high molecular weight, HMW). Большинство физиологических эффектов HMW фракции адипонектина условно делятся на метаболические и сосудистые и реализуются посредством трех рецепторов- AdipoR1, AdipoR2 и T-кадгерина [6, 119, 177, 209, 279, 286]. В первом случае адипонектин улучшает чувствительность клеток-мишеней к инсулину и уменьшает инсулиновую резистентность, нормализует липидный профиль. Вазапротективное, антиатерогенное действие адипонектина связывают с его антиоксидантными, антитромбогенными и противовоспалительными свойствами на эндотелий и антипролиферативным действием на гладкомышечные клетки. Есть сведения о том, что адипонектин увеличивает содержание циркулирующих прогениторных клеток, модулирует их функции, участвует в восстановлении эндотелиального монослоя и процессах ангиогенеза [362].

Однако, клиническое значение адипонектина у больных ИБС до сих пор дискутируется, не совсем понятны механизмы его кардиопротективного действия. По отдельным сведениям низкий уровень циркулирующего адипонектина является фактором риска как для ССЗ, так и их осложнений, а также связан с прогрессированием коронарного кальциноза артерий [199, 324, 325]. У больных ИБС по сравнению с пациентами без ИБС, сопоставимыми по ИМТ и возрасту, отмечается снижение концентрации адипонектина в крови [201, 213]. Имеются данные о том, что гипoadипонектинемия ассоциируется с повышенным риском развития острого коронарного синдрома независимо от других "традиционных" метаболических и сердечнососудистых факторов риска [199, 213]. Кроме того, по данным коронарной ангиографии, низкий уровень адипонектина в сыворотке может быть предиктором тяжести течения атеросклероза и объема поражения коронарных сосудов [373, 374].

Несмотря на то, что во многих исследованиях прослеживается ассоциация лептина и адипонектина и сердечно-сосудистой патологией [206, 212, 233, 246],

их роль в развитии ХСН, сочетанной с СД2 или нарушением жирового обмена, остается невыясненной, что объясняет актуальность изучения этого вопроса.

1.1.1.3. Роль ангиогенных факторов роста в патогенезе хронической сердечной недостаточности с сопутствующим сахарным диабетом 2 типа

Факторы роста представляют собой полипептиды, которые либо секретируются клеткой, либо высвобождаются при гибели клетки. Большинство факторов роста, включая ангиогенные (АФР), были открыты как часть секрета опухоли клеток. В дальнейшем было установлено, что все клетки организма, в том числе прогениторные, секретируют те или иные биоактивные пептиды. Относительно недавно, стало известно, что прогениторные клетки сосудов, к которым относятся предшественники эндотелиальных клеток, мобилизующиеся из костного мозга в ответ на ишемию и повреждение сосудов, а также мезенхимальные прогениторные клетки субэндотелиального пространства интимы и адвентиция, принимают участие в неоваскуляризации [60, 69, 259, 305, 361].

За последнее десятилетие накоплено достаточное количество результатов экспериментальных работ, в которых убедительно показано, что введение прогениторных клеток, в том числе, мезенхимальных, стимулирует образование новых сосудов у животных на модели ишемии миокарда или ишемии задней конечности. Большинство исследователей склоняются к тому, что восстановление и рост новых сосудов из предсуществующих обусловлен паракринной активностью прогениторных клеток, результатом которой является изменение пролиферативного и дифференцировочного потенциала клеток поврежденной ткани.

Как уже ранее отмечалось, прогениторные клетки под воздействием эндогенных стимулов секретируют различные цитокины и факторы роста, в том числе ангиогенные VEGF, HGF, FGFb, ангиопоэтины и другие. Однако, сведений о том, как изменяется ангиогенный потенциал мезенхимальных клеток, включая МСК-ЖТ у больных ишемической болезнью сердца и

диабетом недостаточно, но крайне важно для как для понимания механизмов ангиопатии у этой группы больных, так и для регенеративной кардиоангиологии в целом.

В сыворотке или плазме крови обнаруживается большинство ангиогенных факторов роста и, хотя, истинный источник их происхождения окончательно не установлен, некоторые из циркулирующих АФР вызывают интерес как возможные маркеры сердечно-сосудистых заболеваний.

В семейство VEGF входит 5 белков, включая плацентарный фактор роста (PlGF). Наиболее полно охарактеризована структура и биологическая функция VEGF-A и его изоформ (VEGF121, VEGF145, VEGF165, VEGF189 и VEGF206). VEGF-A является основным фактором, обеспечивающим как формирование новых сосудов с участием прогениторных клеток, так и стабилизацию незрелых кровеносных сосудов. VEGF-A связывается с двумя близкими по строению мембранными тирозинкиназными рецепторами (VEGFR1/FLT1 и VEGFR2/FLK1), которые активно экспрессируются эндотелиальными клетками. VEGF-A препятствует апоптозу эндотелиальных клеток, стимулирует их пролиферацию и миграцию в область неоангиогенеза.

В нашей лаборатории было показано, что высокая глюкоза снижает миграционную активность эндотелиальных клеток *in vitro*. Было продемонстрировано, что ЭК, культивируемые в условиях высокой глюкозы (25 мМоль) в сравнении с ЭК, культивируемыми в условиях с нормальной концентрацией глюкозы в среде (5 мМоль) в значительно меньшей степени образуют капиллярно-подобные структуры. Помимо этого, было обнаружено, что в ЭК, культивируемых как в условиях стабильной так периодической гипергликемии, снижено содержание мРНК рецептора VEGF [3, 20]. Полученные данные могут в определенной степени объяснять нарушение процессов ангиогенеза и репарации в целом у больных с нарушением углеводного обмена, включая диабет.

Результаты немногочисленных клинических исследований циркулирующего VEGF у больных с различными ССЗ неоднозначные [27, 28, 244]. Большинство исследований посвящено оценке VEGF-A у больных с микроангиопатиями при диабете.

Так, в исследовании Wang J. et al. (2014), с участием 50 больных СД2 и пролиферативной ретинопатией повышенный уровень VEGF-A стекловидного тела ассоциировался с прогрессированием ретинопатии после витрэктомии (OR=1,539; $p=0,036$). Содержание VEGF-A стекловидного тела позитивно коррелировало с уровнем VEGF-A плазмы больных диабетической пролиферативной ретинопатией ($p<0.001$) [381].

В работе Berezin A. et al. (2014), у больных АГ повышенный уровень VEGF-A в сыворотке являлся независимым предиктором совокупных сердечнососудистых событий в течение года после ишемического инсульта. В отдельных исследованиях у больных ХСН взаимосвязи между уровнем циркулирующего VEGF-A и кардиоваскулярными исходами обнаружено не было [75].

Отдельное внимание уделяется изучению плацентарного фактора роста (PlGF) при заболеваниях ишемического генеза. Впервые PlGF был обнаружен в плаценте как АФР, позднее во многих других тканях, включая миокард. В экспериментальных исследованиях помимо ангиогенных свойств PlGF были описаны также провоспалительные и проатерогенные эффекты; как цитокин, он стимулирует пролиферацию эндотелиальных прогениторных клеток и их мобилизацию из костного мозга, улучшает неоваскуляризацию в зоне инфаркта, оказывает кардиопротективное действие [171, 189, 222]. Введение PlGF животным в составе аденовирусной конструкции увеличивает ветвление коллатералей и стимулирует ангиогенез при ишемии нижней конечности и инфаркте [236]. Интрамиокардиальное введение PlGF грызунам с инфарктом миокарда увеличивает плотность эндотелиальных клеток в перинфарктной

зоне, замедляет дилатацию камер сердца и сохраняет систолическую функцию ЛЖ [241, 307].

Однако, по результатам ограниченных клинических исследований повышенный уровень циркулирующего PlGF ассоциируется с высоким риском ИБС у здоровых индивидов (RR: 1,58; 95% CI: 1,03-2,41), [87] и является независимым предиктором сердечно-сосудистой заболеваемости и смертности у больных диабетом 1 типа [353] и независимым предиктором неблагоприятных исходов у больных с острым коронарным синдромом [171, 220]. Клиническое значение циркулирующего PlGF у больных сердечной недостаточностью и сопутствующими метаболическими нарушениями не изучено и нуждается в исследованиях.

Фактор роста гепатоцитов (HGF) секретируется клетками мезенхимального происхождения и является плеотропным фактором, который регулирует рост, подвижность и морфогенез различных типов клеток, несущих HGF рецептор c-met [265, 409]. Первоначально он был открыт как сильный митоген для гепатоцитов, почему и получил свое название. Однако позже были обнаружены его эффекты на другие клетки, включая эндотелиальные, эпителиальные, гладкомышечные, двигательные нейроны, стволовые клетки сердца и пр. Он стимулирует ангиогенез, являясь сильным митогеном и хемоаттрактантом для эндотелиальных клеток, подавляет апоптоз эндотелия, играя критическую роль в его восстановлении после повреждения [397, 405], обладает противовоспалительным действием, проявляя благодаря этим свойствам антиатерогенную активность [170]. Индуцируя экспрессию матриксных металлопротеаз, HGF оказывает мощный антифибротический эффект [109]. Он подавляет апоптоз кардиомиоцитов, активирует миграцию в очаг повреждения резидентных стволовых клеток сердца, стимулируя репаративные процессы в миокарде [116, 151]. В некоторых исследованиях показано, что HGF экспрессируется в гладкомышечных клетках, но реализует свои функции через рецептор c-met эндотелиальных клеток. Он способствует

миграции гладкомышечных клеток и макрофагов в неоинтиму при повреждении эндотелиального монослоя и участвует в поддержании его атерогенности [29, 255].

Помимо этого HGF является митогеном и инсулинотропным агентом для β -клеток. Нарушение HGF/c-met сигналинга способствует гибели β -клеток и ускоряет развитие диабета [150, 258]. В почках HGF опосредует эпителиостромальные и эндотелио-мезангиальные взаимодействия, способствуя локальным репаративным процессам, ведущим к регрессии гломерулосклероза при диабетической нефропатии [29, 145, 249].

HGF присутствует в периферической крови, хотя происхождение циркулирующего HGF не выяснено. Плазменная концентрация HGF увеличена при таких ССЗ, как артериальная гипертензия [170], атеросклероз [312], инфаркт миокарда [168], инсульт [313].

В работе Konya H. et al. (2014), обнаружена взаимосвязь между повышенным уровнем сывороточного HGF, ТКИМ ($r=0.24$, $p=0.0248$) и размером бляшки ($r=0.27$, $p=0.0126$) у больных ИБС и каротидным атеросклерозом, предположив, что циркулирующий HGF может быть маркером атеросклеротической макроангиопатии у больных СД2 [208]. Имеются данные, о том, что у больных СД2 циркулирующий HGF обратно коррелирует с уровнем HbA1c и ожирением [29, 203, 269, 301]. Вместе с тем, по сведениям Nishimura, M. et al. (1998), сочетание СД2 и АГ сопровождается увеличением HGF в крови [277].

Таким образом, в ходе экспериментальных и клинических исследований было продемонстрировано, что на уровень циркулирующего HGF оказывают влияние такие стимуляторы как ишемическое повреждение ткани, АГ, дисфункция эндотелия и гипергликемия. К факторам, которые ассоциируются с пониженным содержанием HGF в циркуляции относят ангиотензиноген II и TGF- β . Однако, диагностическое или прогностическое значение плазменного уровня HGF мало исследовалось у больных с сочетанной сердечно-сосудистой

и эндокринной патологией, в частности при сердечной недостаточности, сочетающейся с метаболическими расстройствами. Имеющиеся данные позволяют предполагать, что уровень циркулирующего HGF мог бы быть дополнительным диагностическим и прогностическим маркером, а также маркером эффективности терапии у данной категории больных ХСН [29].

Не достаточно изучена клиническая и прогностическая значимость циркулирующих ангиопозтинов, которые также вовлечены в процессы ангиогенеза при хронических ишемических повреждениях.

Ангиопозтин-1 и ангиопозтин-2 секретируется мезенхимальными клетками. Оба фактора связываются с тирозинкиназным рецептором Tie2 на эндотелиальных клетках. В отличие от других ангиогенных факторов ангиопозтины не вызывают митогенного ответа или индукции тубулогенеза при связывании с рецепторами Tie2. Ангиопозтин-2 выступает в качестве инициального ангиогенного сигнала, способствующего эффективному действию других ангиогенных факторов (FGFb, VEGF). В отсутствие ангиогенных факторов ангиопозтин-2 приводит к индукции апоптоза эндотелиоцитов. Ангиопозтин-1 участвует в созревании незрелых кровеносных сосудов, действует позднее VEGF, обуславливая ветвление сосудов и их ремоделирование через межклеточные и клеточно-матриксные контакты [251, 303].

В работе Patel J.V. et al. (2009), с участием 194 больных стабильной ИБС не было обнаружено различий в содержании циркулирующих ангиопозтина-1, ангиопозтина-2 и VEGF в зависимости от тяжести систолической дисфункции ЛЖ [290]. В проспективном 2-х летнем исследовании с участием 132 пациентов с ИМ и подъемом сегмента ST обнаружена ассоциация пониженного содержания ангиопозтина-1 (OR 2,977, 95% CI 1,16-7,63, $p=0,023$), низкой фракции выброса левого желудочка (OR 0,958, 95% CI 0,92-0,99, $p=0,022$), множественного атеросклеротического поражения артерий (OR 3,013, 95% CI

1,19-7,60, $p=0,019$) и большими сердечнососудистыми событиями (коронарная смерть, нефатальный ИМ, инсульт) в течение одного года [234].

Таким образом, существующие на сегодняшний день данные небольших по объему клинических исследований циркулирующих ангиогенных факторов, противоречивы и нуждаются в дополнительных исследованиях с участием отдельной группы больных с сердечной недостаточностью и метаболическими нарушениями. Подобные исследования необходимы как для оценки прогностической значимости ангиогенных факторов у этой категории больных, так и для понимания механизмов развития ХСН с участием ангиогенных факторов роста.

1.1.2. Клеточные механизмы в патогенезе хронической сердечной недостаточности с сопутствующим сахарным диабетом 2 типа. Роль метаболических факторов риска

Среди новых, мало изученных потенциальных механизмов отягощения сердечной недостаточности, сочетанной с сахарным диабетом рассматривается нарушение процессов эндогенной регенерации сосудов и репарации ишемизированных тканей [101, 102].

По современным представлениям ключевую роль в регенеративных процессах в организме играют стволовые и/или прогениторные клетки, способные к самовоспроизведению, дифференцировке и к воспроизведению различных клеток других видов, то есть к трансформации через этапы клеток-предшественников в высокодифференцированные органо-специфичные клетки, например, в эндотелиальные клетки, гладкомышечные клетки, кардиомиоциты, клетки крови, гепатоциты и другие.

За последние 20 лет накоплен огромный экспериментальный и достаточный клинический материал, подтверждающий возможность и эффективность трансплантации постнатальных стволовых/прогениторных клеток и введения ростовых факторов для восстановления поврежденных

тканей, в том числе миокарда, хотя вопрос о кардиомиоцитарной дифференцировке прогениторных клеток костного мозга или клеток предшественников из других источников, все еще остается нерешенным [4, 18, 25].

Считается, что суммарный эффект благоприятного влияния клеточной терапии на морфо-функциональные показатели сердца при его ишемическом повреждении, является результирующей паракринных влияний трансплантированных клеток и стимуляции собственной эндогенной репарации миокарда. Предполагается, что сходным образом прогениторные клетки стимулируют неоангиогенез, капиллярогенез, уменьшая выраженность ишемии и в других тканях [25].

В настоящее время многие типы прогениторных клеток проходят различные стадии клинических испытаний при таких сердечнососудистых заболеваниях как инфаркт миокарда, постинфарктная сердечная недостаточность (ишемическая кардиомиопатия), ишемические поражения артерий нижних конечностей, включая диабетическую стопу [25].

Данные литературы об эффективности клеточной терапии у больных с ХСН по результатам клинических исследований неоднозначные и порой противоречивые. Отчасти это обусловлено применением разных типов клеток и методов их введения, разными дозами клеточного препарата. Предполагают, что малая эффективность клеточной терапии у отдельных больных сердечной недостаточностью может быть обусловлена индивидуальными особенностями пациента и его сопутствующих заболеваний (возраст и старение, наличие сопутствующих факторов риска ССЗ и заболеваний, сопровождающихся нарушениями углеводного обмена, включая диабет, гиперлипидемия и курение). Все больше исследователей склоняются к мнению, что аутологичная клеточная терапия должна быть персонифицированной, с учетом всех индивидуальных особенностей потенциального донора и, соответственно, кандидата для трансплантации клеток [22, 23, 24, 25].

С учетом вышесказанного, исследование влияния таких факторов риска как гипергликемии, дислипидемии, старения на прогениторные клетки сосудов крайне важно как для понимания механизмов отягощения ХСН в случае ее сочетании с метаболическими нарушениями, в частности, с диабетом, так и планирования аутологичной клеточной терапии у этой группы больных.

1.1.2.1 Эндотелиальная дисфункция как ранний этап повреждения сосудов в патогенезе хронической сердечной недостаточности с сопутствующим сахарным диабетом 2 типа

Хорошо известно, что морфологической основой для развития ИБС и сердечной недостаточности является атеросклероз. Эндотелиальная дисфункция (ЭД) является одним из основных патофизиологических механизмов развития и самым ранним признаком атеросклероза, а также предиктором сердечнососудистых осложнений. ЭД играет важную роль не только в атерогенезе и возникновении ишемии миокарда, но и в развитии коронарного тромбоза, ремоделировании левого желудочка и прогрессировании сердечной недостаточности [1, 117, 173, 272, 275].

В норме эндотелиальные клетки формируют монослой в кровеносных сосудах организма, создающий барьер между стенкой сосуда и элементами крови, а также активно участвуют во внутреннем гомеостазе организма. Эндотелий регулирует многие процессы с помощью сигнальных молекул - медиаторов, экспрессирующихся на его поверхности или выделяемых в кровь и окружающие ткани. В ответ на постоянное воздействие со стороны кровотока механических воздействий, метаболических нарушений, тромбоцитарных факторов, нейротрансмиттеров, гормонов, эндотелиальные клетки выделяют вещества, вызывающие как вазодилатацию (оксид азота - NO, простациклин, брадикинин, эндотелиальный гиперполяризующий фактор), так и вазоконстрикцию (эндотелин, вазоконстрикторные простагоиды). Кроме того, на поверхности эндотелия происходит превращение мощнейшего

вазоконстриктора ангиотензина из неактивной формы (ангиотензин I) в активную (ангиотензин II) [329, 403, 407, 412].

Среди молекулярных механизмов ЭД при воздействии традиционных сердечно-сосудистых факторов риска (гипергликемии, гиперлипидемии, никотина, повышенного артериального давления и др.), обсуждается нарушение локальной продукции NO и повышенный окислительный стресс. В основе последних лежит избыточная генерация эндотелий-зависимого супероксида, инактивирующего синтезированные молекулы NO и стимулирующего окисление липопротеидов низкой плотности, а также способствующего повреждению мембран эндотелиоцитов пероксинитритом и гидроксильными радикалами [327].

Участие оксида азота во внутрисосудистом гомеостазе заключается не только в его вазодилатирующем эффекте, осуществляемом через цГМФ-зависимый механизм, но и в ингибировании адгезии тромбоцитов к поверхности эндотелия и, в меньшей степени, в подавлении их агрегации. Кроме того, NO влияет на транскрипцию генов, отвечающих за ингибирование экспрессии MCP-1 (моноцитарный хемотаксический белок-1), и молекул адгезии, способствующих трансэндотелиальной миграции в стенку сосуда лейкоцитов [413]. Таким образом, NO отвечает за вазодилатацию, обусловленную расслаблением гладкомышечных клеток, ингибирует адгезию и агрегацию тромбоцитов, предотвращает миграцию и пролиферацию клеток, разрастание атеросклеротической бляшки.

Повышенный окислительный стресс запускает патологический каскад, начинающийся с увеличения продукции сосудистых цитокинов (интерлейкина-1, фактора некроза опухолей α (TNF- α)) и приводящий к экспрессии на поверхности эндотелиальных клеток молекул адгезии (молекул адгезии сосудистого эндотелия - VCAM-1, межклеточных молекул адгезии - ICAM-1, эндотелиально-лейкоцитарных молекул адгезии – ELAM (Е-селектин)),

привлекающих моноциты и другие лейкоциты к поверхности эндотелиальных клеток и обуславливающих их адгезию [128, 140, 148, 149, 156].

На уровне клеточного звена ЭД ассоциируется с повреждением и ускоренным апоптозом ЭК [103, 129]. Предполагается, что под длительным или повторяющимся воздействием сердечно-сосудистых факторов риска (в том числе у лиц пожилого возраста, при курении, гипергликемии, гиперхолестеринемии) может происходить не только нарушение функции эндотелия, но и потеря целостности эндотелиальных клеток, их старение, десквамация и выход в кровоток. Однако, данных, убедительно демонстрирующих неблагоприятное влияние факторов риска на клетки сосудов все еще недостаточно. Отчасти это обусловлено тем, что изменились представления о процессах обновления эндотелиального монослоя.

Физиологические свойства эндотелиального монослоя зависят не только от степени повреждения, но и от его способности к восстановлению. Поэтому важным звеном в предупреждении дисфункции эндотелия является его эффективная регенерация [172, 383].

К циркулирующим "меткам" повреждения эндотелия относятся микрочастицы - фрагменты эндотелиальных клеток, образующиеся при их повреждении или десквамации эндотелиального монослоя. В крови пациентов с тяжёлой артериальной гипертонией, периферическим и коронарным атеросклерозом, отмечалось повышение концентрации фактора фон Виллебранда (vWF) - биохимического маркера эндотелиального повреждения, а также увеличение количества микрочастиц и погибших эндотелиальных клеток [77, 117, 294, 299].

На сегодняшний день "золотого стандарта" для определения ЭД не существует. До настоящего времени в клинической практике среди инструментальных методов для диагностики ЭД традиционно применяется функциональная проба с гиперемией плечевой артерии с оценкой эндотелий-зависимой вазодилатации (ЭЗВД) [89, 337]. Достоинством пробы является ее

неинвазивность и простота в исполнении. Однако, недостатком пробы является то, что она дает информацию о функциональном состоянии артерий, которое не всегда отражает характер и степень выраженности морфологических изменений сосудов. При этом ультразвуковое исследование сосудов (чаще брахиоцефальных или сонных) с расчетом толщины комплекса интима-медиа (ТКИМ) в большей степени характеризует атеросклеротические изменения и не позволяет оценить функциональный резерв артерий. Поэтому, как правило, оценка ЭЗВД и оценка ТКИМ исследования проводятся одновременно, однако, даже при их сочетанном применении клиницист может получить результаты, противоречащие друг другу, что затрудняет диагностику ЭД, особенно ее ранние проявления.

Специальные дорогостоящие лабораторные методы позволяют оценивать некоторые циркулирующие факторы, лишь косвенно характеризующие ЭД, среди которых выделяют молекулы адгезии (ICAM-1, VCAM, E-селектин), метаболиты NO, но не нашедшие широкого применения в клинике.

Важно также отметить, что лекарственных препаратов с прямым ангиопротективным действием для коррекции ЭД в клинической практике не существует, лишь немногие из них по некоторым данным улучшают состояние эндотелия. Так, например, сенситайзеры инсулина (тиазолидиндионы), обладая плеiotропным эффектом, ингибируют *in vitro* экспрессию VCAM-1 и ICAM-1 на активированных эндотелиальных клетках, уменьшают моноцитарно-макрофагальный хоуминг в бляшке. В отдельных клинических исследованиях показано уменьшение частоты приступов стенокардии и улучшение ангиографической картины у больных СД2 и ИБС на фоне терапии тиазолидиндионами [12, 13, 80, 215, 391].

Результаты клинических исследований о благоприятном влиянии иАПФ, также как и гиполипидемических препаратов (статинов и фибратов) на функцию эндотелия по результатам пробы с реактивной гиперемией и пробы с ацетилхолином неоднозначны и противоречивы у разных групп больных.

В небольших клинических исследованиях показано, что прием per os L-аргинина в дозе 7 г/день в течение 6 месяцев не влияет на показатели ЭД у больных диабетом 1 типа, в то время как прием ингибитора редуктазы (Липитор) в дозе 40 мг/день в течение 6 месяцев типа улучшает ЭЗВД. Применение антиоксидантов- витаминов Е и С как средств коррекции ЭД обсуждается с позиции комплексной терапии диабета и атеросклероза, но не является научно-обоснованным и доказанным [297].

Среди механизмов развития ЭД при ХСН рассматриваются следующие: повышение активности эндотелиального АПФ, сопровождающееся увеличением синтеза АТII и ускорением распада брадикинина; подавление экспрессии/инактивация эндотелиальной NO-синтазы и снижение синтеза NO (обусловленные хроническим снижением кровотока и извращением реакции на напряжение сдвига, повышением уровня провоспалительных цитокинов и фактора некроза опухоли, подавляющих синтез NO, увеличением концентрации свободных радикалов, инактивирующих NO, повышением уровня циклооксигеназозависимых эндотелиальных факторов констрикции, компенсирующих дилатирующее влияние NO); повышение циркулирующего эндотелина-1, оказывающего вазоконстрикторное и пролиферативное действие.

При сахарном диабете основным фактором, повреждающим стенку кровеносных сосудов является гипергликемия. Так, повышение уровня глюкозы приводит к чрезмерной продукции диацилглицерина, что в свою очередь вызывает активацию протеинкиназы C в эндотелиальных клетках. Это приводит к увеличению продукции эндотелина-1 и сосудосуживающих простагландинов, а также ангиотензин-превращающего фермента. Все эти белки обладают непосредственным или опосредованным повреждающим действием на способность стенки кровеносных сосудов поддерживать нормальный тонус [310, 354].

Более того, высокая концентрация глюкозы приводит к гиперпродукции белков внеклеточного матрикса эндотелиальными клетками, что вызывает

увеличение толщины базальной мембраны и изменение проницаемости сосудистой стенки. Таким образом, высокая концентрация глюкозы плазмы вызывает уменьшение эндотелий-зависимой вазодилатации, увеличение вазоконстрикции, стимуляцию гиперплазии гладкомышечных клеток интимы артерий, ремоделирование сосудистой стенки и ускоренное развитие атеросклероза и сердечно-сосудистых осложнений [227, 274, 278].

Повреждение эндотелия под действием высокой концентрации глюкозы способствует тромбогенезу в сосудах микроциркуляторного русла. Предполагается, что изменение поверхностного заряда эритроцитов, содержащих гликозилированный гемоглобин, вызывает их агрегацию, активацию перекисного окисления липидов и повреждение мембран эндотелиальных клеток [331].

Другим, не менее важным механизмом повреждения эндотелия является гликозилирование биологически активных молекул, включая факторы свертывания крови и факторы роста, необходимые для нормальной функциональной активности эндотелиальных клеток. Так, высокая концентрация глюкозы приводит к гликозилированию таких компонентов противосвертывающей системы, продуцируемых эндотелием, как антитромбин II, простациклин, а также активаторы плазминогена и их рецепторы, что способствует формированию тромбов. Кроме того, как уже было отмечено выше, гипергликемия приводит к развитию окислительного стресса. Повышение продукции активных форм кислорода и гликирование белков эндотелия обуславливают снижение продукции вазодилататоров, включая NO и простациклин [412].

Повреждение эндотелиальных клеток также развивается в результате активации в них сорбитолового пути метаболизма глюкозы. Накопление в клетках сорбитола в результате активации альдозоредуктазы может приводить к осмотическому отеку и гибели клеток [278, 327]. Имеются сообщения о том, высокая глюкоза оказывает влияние и на другие типы клеток, в частности,

культивирование индуцированных плюрипотентных стволовых клетках человека в среде с содержанием глюкозы в концентрации 30,5 ммоль/л стимулирует их пролиферацию, вызывает гиперэкспрессии аквапоринов и осмотическое ремоделирование цитоскелета [240].

При диабете не только увеличивается повреждение эндотелиальных клеток, но и происходит подавление регенерации эндотелиальной выстилки. Так, при диабетической микроангиопатии происходит изменения напряжения сдвига, снижение образования факторов роста, включая VEGF (фактор роста эндотелия) и HGF (фактор роста гепатоцитов) и их рецепторов, а также изменяется синтез компонентов базальной мембраны. Однако, механизмы обуславливающие недостаточность регенерации эндотелия при гипергликемии, остаются недостаточно изученными.

Ранее считалось, что в случае локального повреждения эндотелиального слоя, его репарация происходит за счёт пролиферации соседнего неповреждённого эндотелия. В последнее время стали накапливаться данные о том, что прогениторные клетки сосудов, такие как циркулирующие прогениторные клетки (ЦПК) и мезенхимальные стволовые клетки (МСК) являются альтернативным механизмом обновления эндотелия [64, 65, 152, 155, 296, 335] и, соответственно, могут быть маркерами ЭД, однако это требует отдельных исследований с участием группы больных, у которых в основе заболевания лежит ЭД. К такой группе могут относиться пациенты с ХСН и сахарным диабетом.

Учитывая вышесказанное, гипергликемия приводит к дисфункции эндотелиальных клеток, нарушению не только процессов обновления и восстановления эндотелиальной выстилки после повреждения, но и процессов капиллярогенеза. В этой связи выяснение влияния гипергликемии на функциональную активность клеток сосудистой стенки представляется актуальным как для диагностики ЭД, так и для разработки подходов к

профилактике и коррекции функции эндотелия и роста сосудов в целом, в том числе, у больных сердечной недостаточностью, сочетанной с диабетом.

1.1.2.2 Роль циркулирующих прогениторных клеток в репарации сосудов

Действие ряда цитокинов и факторов роста приводит к мобилизации и высвобождению прогениторных клеток из костного мозга. Попадая в кровоток, они мигрируют к местам повреждения сосудов и ишемии тканей, частично включаются в область дефекта эндотелия сосудистой стенки, частично участвуют в формировании новых сосудов [67, 305, 310].

Локальная микросреда костного мозга, так называемая "ниша стволовых клеток", состоящая из фибробластов, остеобластов и эндотелиальных клеток, регулирует состояние стволовых клеток: покой или мобилизация. Под действием ишемии, индуцирующей мобилизацию ЦПК, цитокины блокируют взаимодействие между стволовыми и стромальными клетками костного мозга, что позволяет стволовым клеткам высвобождаться из костного мозга, проходить через эндотелий синусоидов и выходить в кровоток. Этот процесс регулируется протеиназами: эластазой, катепсином G и матриксными металлопротеиназами (ММП) [414]. G-CSF является цитокином, стимулирующим высвобождение эластазы и катепсина G из нейтрофилов, и используется в клинической практике для мобилизации CD34+ клеток. Указанные протеиназы расщепляют связи/белки стромальных клеток костного мозга, связывающие их с интегринами гематопоетических стволовых клеток. Индуцированная фактором роста эндотелия сосудов (VEGF), фактором-1 стромальных клеток (SDF-1) и плацентарным фактором роста (PlGF) мобилизация стволовых клеток опосредуется ММП-9. Повышение локальной концентрации ММП-9 в костном мозге приводит к расщеплению Kit-лиганда пограничной мембраны и высвобождению растворимого kit-лиганда (известного также как фактор стволовых клеток - SCF) [90, 95, 96, 361].

После высвобождения стволовых клеток из костного мозга происходит их направленная миграция и встраивание в зоны ишемии или сосудистого повреждения. Все эти процессы носят название "хоуминг". Предполагается, что "хоуминг" представляет собой последовательность хорошо скоординированных этапов привлечения ЦПК в поврежденную сосудистую стенку и зоны ишемии, включающих хемотаксис, адгезию и трансэндотелиальную миграцию, после чего происходит дифференцировка ЦПК в зрелые эндотелиальные клетки.

Этап "хоуминга" заключается в адгезии предшественников к активированным цитокинами и ишемией эндотелиальным клеткам и трансмиграции ЦПК через эндотелиальный монослой. Известно, что интегрины опосредуют адгезию различных клеток, в том числе гематopoэтических стволовых клеток и лейкоцитов к эндотелиальным клеткам и белкам субэндотелиального матрикса [361]. Восстановление эндотелиального монослоя в большей степени зависит от адгезии ЦПК к поврежденной поверхности сосуда, что опосредовано специальными витронектиновыми рецепторами, ингибирование которых замедляет реэндотелизацию *in vivo* [90].

Не только мобилизация, но и миграция в зону ишемии и встраивание ЦПК в поврежденную стенку сосуда или во вновь образующиеся сосуды, регулируются ангиогенными факторами роста и цитокинами (VEGF, фактором роста фибробластов - FGF, SDF-1, G-CSF, ангиопоэтином и др.) [144, 179, 359].

Заключительным этапом является дифференцировка ЦПК - превращение их в стенке сосуда в функционально зрелые эндотелиальные клетки. Сигнальный каскад, регулирующий дифференцировку во взрослом организме, изучен мало. Тем не менее, известно, что VEGF играет важнейшую роль в стимуляции дифференцировки в эндотелиальные клетки различных популяций предшественников ($CD34^{+}$, $CD133^{+}$, моноклеарных клеток периферической крови), культивированных *ex vivo* [122].

В зависимости от времени появления в процессе культивирования *in vitro*, выделяют два типа ЦПК: "ранние" и "поздние". "Ранние" ЦПК представляют

собой гетерогенную клеточную популяцию, включающую несколько клонов, способных дифференцироваться в "поздние". Общими для обоих типов являются фенотипические признаки, характерные для эндотелия. В то же время, они различаются по морфологии, пролиферативной активности, способности к выживанию, по профилям экспрессии генов, а в ответ на добавление *in vitro* VEGF - по продукции NO, способности к формированию трубочек и встраиванию в сосудистый монослой. Несмотря на эти различия, оба типа вносят сходный вклад в неоваскулогенез *in vivo*. Высокая ангиогенная способность "ранних" предшественников эндотелиальных клеток *in vivo*, несмотря на низкую активность *in vitro*, может быть объяснена повышенной секрецией этими клетками ангиогенных цитокинов [182, 183, 322, 323].

Для оценки и идентификации циркулирующих прогениторных клеток по наличию на их поверхности характерных антигенов применяется цитофлюориметрический анализ с использованием меченых флюоресцентными метками специфичных антител [65, 131, 175].

Предполагается, что в норме ЦПК вносят вклад в постоянно идущее в сосудах обновление эндотелиального слоя путём встраивания в места его повреждения и служат клеточным ресурсом для локального замещения утратившего свои функции эндотелия и, таким образом, участвуют в поддержании баланса между повреждением эндотелия и его регенерацией [172].

Участие ЦПК в реэндотелизации подтверждается рядом работ. Так, у пациентов с рестенозами внутри стентов после чрескожных коронарных вмешательств, отмечается снижение количества и нарушение адгезивной способности циркулирующих ЦПК [152]. Напротив, при введении в системный кровоток культивированных ЦПК [179] или увеличении их количества *in vivo* с помощью статинов [376, 386], эстрогенов [341], гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (G-CSF) [207] или физической нагрузки [216] улучшается реэндотелизация, подавляется формирование неоинтимы и

предотвращается рестенозирование [357]. В клинических исследованиях показана связь между повышением количества циркулирующих ЦПК и снижением риска сердечно-сосудистых событий [26, 37, 315, 319, 322, 384], что подтверждает сосудопротективное действие ЦПК.

1.2.2.3 Роль мезенхимальных стволовых клеток в репарации сосудов

В последнее десятилетие появились сведения о том, что мезенхимальные клетки, в том числе мезенхимальные клетки жировой ткани (МСК-ЖТ) являются одним из типов постнатальных прогениторных клеток, вовлеченных в репаративные процессы в организме. Стало известно, что МСК-ЖТ локализуются периваскулярно, в периэндотелиальном компартменте и способны стимулировать не только рост кровеносных сосудов, но и обеспечивают их стабилизацию [308, 380, 382, 396].

Так, в нашей лаборатории было показано, что МСК-ЖТ могут непосредственно участвовать в формировании сосудов за счет перицитарных клеток, имеющих в их составе и несущих маркеры перицитов такие, как NG2. Они оказывают стабилизирующий эффект на формирующиеся CD31-позитивные структуры за счет межклеточных контактов и стимуляции эндотелиальной дифференцировки прогениторных клеток [36, 38, 41, 260, 267]. Кроме того, МСК-ЖТ способны секретировать проангиогенные факторы, такие как VEGF, bFGF, PDGF-BB, HGF и TGF β , и таким образом стимулировать рост и развитие капиллярной сети [231, 225]. В условиях *in vitro* среда культивирования МСК-ЖТ значительно улучшает выживание эндотелиальных клеток человека, культивируемых в обедненной ростовыми факторами среде, а сами МСК-ЖТ, как и эндотелиальные клетки, способны формировать капилляроподобные структуры на поверхности матригеля [39, 268, 330, 334].

Таким образом, существенный вклад в стимуляцию неоваскуляризации МСК-ЖТ вносят их паракринные эффекты, при этом именно секреторная активность клеток в большей степени, чем дифференцировочные свойства, определяет их ангиогенную и тканепротективную эффективность [44, 46, 47]. В

условиях гипоксии происходит стимуляция проангиогенных свойств МСК-ЖТ, обусловленных в значительной степени повышением экспрессии проангиогенных факторов и снижением экспрессии факторов, подавляющих ангиогенез [15].

МСК-ЖТ представляют собой популяцию клеток, обладающих высокой степенью пластичности, высоким ангиогенным потенциалом, обусловленным в значительной степени их способностью секретировать многие проангиогенные и антиапоптотические факторы, они также могут являться эффективным клеточным вектором для переноса терапевтических генов [50, 308, 415, 169].

Использование генетически модифицированных МСК-ЖТ, сочетание генной и клеточной терапии, позволяет усилить положительные стороны каждого метода [50]. Введение в клетки генов ангиогенных и антиапоптотических факторов позволяет уменьшить гибель клеток после трансплантации, а также количество вводимых клеток, необходимое для достижения эффекта. Относительная безопасность и низкая травматичность процедуры выделения МСК из жировой ткани, их высокая пролиферативная активность и способность стимулировать и стабилизировать сосудистые структуры представляет их перспективными кандидатами для аутологической клеточной терапии заболеваний, в основе которых лежит ишемия тканей. Однако, для оценки эффективности аутологичной клеточной терапии с использованием МСК-ЖТ, в том числе, в терапии ишемической кардиомиопатии, сочетанной с диабетом, необходимы исследования, направленные на изучение многих других факторов риска.

К числу факторов риска, которые действуют в течение многих лет, можно отнести ЛПНП. При хроническом циркулировании в крови они подвергаются модификации за счет выброса клетками свободных радикалов и продуктов перекисного окисления липидов, а также вследствие повышенной концентрации в крови и межклеточной жидкости ряда ферментов и некоторых метаболитов [22, 237, 238, 318]. Так, например, установлено, что глюкоза

инициирует атерогенную окислительную модификацию ЛПНП *in vitro* и у больных СД2. Обнаружено, что нормализация уровня глюкозы крови у этих больных в процессе сахароснижающей терапии сопровождается существенным снижением окисленности ЛПНП [31]. Окисленные ЛПНП депонируют холестерин и другие липиды в стенках сосудов, в клетках крови, что вызывает мозаичные повреждения сосудов. Установлено, что уровень окисленных ЛПНП, циркулирующих в крови, является независимым предиктором ИБС. Так, уровень циркулирующих окисленных ЛПНП в концентрации от 6 до 14 мкг/мл является предиктором субклинического атеросклероза; уровень циркулирующих окисленных ЛПНП в концентрации от 13 до 75 мкг/мл документирован для лиц с выраженным атеросклеротическим поражением сосудов и тяжелой ИБС [31]. Вопрос о том, какова концентрация окисленных ЛПНП в тканях и стенке сосудов, остается не выясненным. Несмотря на то, что взаимосвязь между уровнем липопротеидов плазмы крови и развитием атеросклероза была установлена достаточно давно, механизмы влияния окисленных ЛПНП на атерогенез до конца не ясны. За последние годы накопились данные, указывающие, что атерогенез представляет собой не пассивное отложение липидов в стенке сосудов, а является активным процессом, в который одновременно вовлечены несколько типов резидентных и пришедших из крови клеток, связанных между собой паракринной регуляцией (эндотелиальные клетки, перициты, фибробласты, гладкомышечные клетки, моноциты, тромбоциты, эритроциты) [31]. В одной из работ было продемонстрировано, что культивирование гладкомышечных клеток аорты в среде, содержащей 50 мкг/мл окисленных ЛПНП, сопровождается активацией рецептора проренина в этих клетках независимо от ангиотензина II, что также может быть причиной более ранних атеросклеротических изменений в сосудах [100, 230]. Тем не менее, сведения о влиянии окисленных ЛПНП на прогениторные клетки крайне немногочисленны и неоднозначны [22]. Влияние окисленных ЛПНП на мезенхимальные клетки не изучено.

Таким образом, анализ литературы показал, что на сегодняшний день существует ряд принципиальных нерешенных вопросов, касающихся механизмов отягощения хронической сердечной недостаточности в разрезе "бремени" сопутствующих заболеваний, в частности, сахарного диабета 2 типа и ожирения.

Первый блок вопросов сосредоточен вокруг молекулярных маркеров ХСН, сочетающейся с метаболическими нарушениями. Это вопрос о том, насколько целесообразна оценка классических биомаркеров тяжести сердечной недостаточности и неблагоприятного прогноза - натрийуретических пептидов у больных ХСН и сопутствующим ожирением? Сохраняется ли прогностическая значимость натрийуретических пептидов у больных ХСН и сопутствующим СД2 в сравнении с больными ХСН без СД2? Какова роль эндотелина-1 как функционального антагониста натрийуретических пептидов у больных ХСН, сочетающейся с СД2 в сравнении с больными ХСН без СД2? Каково клиническое значение адипонектина и лептина у больных ХСН, сочетающейся с СД2 и ожирением, в сравнении с больными ХСН без СД2 и нормальным весом. Каково клиническое и прогностическое значение ангиогенных факторов роста у больных ХСН сочетающейся с СД2, в сравнении с больными ХСН без СД2?

Вторым, совершенно новым блоком нерешенных вопросов отягощенного течения ХСН при ее сочетании с СД2 являются вопросы оценки репаративного потенциала прогениторных клеток сосудов у больных ИБС при хроническом воздействии метаболических факторов риска, присущих диабету - гипергликемии и дислипидемии. Как изменяется количественное содержание циркулирующих прогениторных клеток костномозгового происхождения у больных ХСН сочетающейся с СД2, в сравнении с больными ХСН без СД2 и есть ли зависимость числа этих клеток от тяжести сердечной недостаточности? Какие изменения происходят в мезенхимальных стволовых клетках, ответственных за репарацию и обновление тканей, в том числе

эндотелия и сосудистой стенки в целом у больных с хронической ишемической патологией, к которым относятся постинфарктная хроническая сердечная недостаточность и диабет. При этом диабет как эквивалент ССЗ представляет собой модель двух, часто взаимосвязанных метаболических нарушений – высокой глюкозы и окисленных липопротеидов низкой плотности.

Ответы на эти вопросы помогут не только по-новому взглянуть на механизмы отягощения ХСН, сочетающийся с СД2 в сравнении с ХСН без СД2, но и наметить профилактические меры в отношении факторов риска сердечной недостаточности и диабета, что в конечном итоге позволит улучшить ситуацию в отношении большинства сердечно-сосудистых заболеваний.

ГЛАВА 2

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Диссертационное исследование состоит из трех частей. Первая - экспериментальная часть работы посвящена изучению влияния гипергликемии и нарушений липидного обмена (окисленных липопротеидов низкой плотности) на функциональное состояние МСК-ЖТ в условиях моделирования *in vitro*.

Первая клиническая часть работы посвящена изучению ангиогенных свойств мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани (МСК-ЖТ) у больных ишемической болезнью сердца и СД2.

Вторая клиническая часть посвящена изучению молекулярных и клеточных характеристик больных с ишемической (постинфарктной) ХСН и сопутствующим сахарным диабетом 2 типа, ассоциированных с неблагоприятным прогнозом течения ХСН.

2.1. Клиническая характеристика групп обследованных. Дизайн исследования

В рамках международного многоцентрового научного клинического исследования 2009-00-2.7-06-02-004 Седьмой Рамочной программы SICA-HF "Изучение молекулярно-клеточных механизмов сердечных заболеваний, ассоциированных с диабетом и избыточным весом" (Государственный контракт № 02.527.11.0007) проводился набор клинического материала.

В научно-диспансерном отделе Института клинической кардиологии ФГБУ "Национальный медицинский исследовательский Центр кардиологии" Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва (руководитель отдела - профессор Ф.Т. Агеев) проводили клинико-инструментальное обследование больных ИБС и формирование групп больных с ишемической (постинфарктной) ХСН.

Общелабораторное обследование проводилось в лаборатории клинической биохимии Института клинической кардиологии "Национальный медицинский исследовательский Центр кардиологии" Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Специальное лабораторное обследование больных (нейрогормоны, инсулин и с-пептид) проводилось в отделе нейрогуморальных и иммунологических исследований Института клинической кардиологии "Национальный медицинский исследовательский Центр кардиологии" Министерства здравоохранения Российской Федерации.

В отделе сердечно-сосудистой хирургии Института клинической кардиологии "Национальный медицинский исследовательский Центр кардиологии" Министерства здравоохранения Российской Федерации. (руководитель отдела - академик РАН Акчурина Р.С.) проводили клинко-инструментальное обследование и набор больных ИБС.

В лаборатории ангиогенеза Института экспериментальной кардиологии "Национальный медицинский исследовательский Центр кардиологии" Министерства здравоохранения Российской Федерации. (руководитель лаборатории - профессор Е.В. Парфенова) и в лаборатории кафедры биохимии и молекулярной медицины Факультета фундаментальной медицины ФГБОУ ВО "Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова" (заведующий кафедрой академик РАН В.А. Ткачук) проводилась оценка морфо-функциональных характеристик МСК-ЖТ больных ИБС, выполнены эксперименты по моделированию метаболических нарушений *in vitro*.

Все исследования были выполнены после получения информированного согласия пациента.

Часть обследованных составили группу из 112 человек, которая включена в проспективное исследование по изучению молекулярных и клеточных характеристик, связанных с неблагоприятным прогнозом больных ИБС с постинфарктной ХСН и сопутствующим СД2. В протокол исследования

включено 87 больных, среди которых 55 больных ИБС с постинфарктной ХСН II-III ФК по NYHA (47 мужчин и 8 женщин) в возрасте от 40 до 73 лет (средний возраст $59,8 \pm 8,5$ лет) и 32 больных СД2 (10 мужчин и 22 женщины) в возрасте от 49 до 74 лет (средний возраст $61,2 \pm 7,5$ лет). Группу сравнения составили 25 относительно здоровых добровольцев (15 мужчин и 10 женщин в возрасте от 42 лет до 71 года (средний возраст $56,7 \pm 8,7$ лет) без ИБС и других сердечно-сосудистых или тяжелых хронических заболеваний. Клинико-демографическая характеристика исследованных групп представлена в таблице 1.

Таблица 1 – Клинико-демографическая характеристика исследованных групп

Показатель	Группа сравнения, n=25	ХСН, n=55	СД2, n=32
Возраст, годы (M $\pm$ SD)	56,7 $\pm$ 8,7	59,8 $\pm$ 8,5	61,2 $\pm$ 7,5
Пол м/ж, n (%)	15/10	47/8	10/22
Длительность ИБС, лет	-	7,4 $\pm$ 5,0	
Длительность ХСН, лет	-	3,2 $\pm$ 2,7	
Длительность СД2, лет	-	5,9 $\pm$ 5,1	6,8 $\pm$ 6,7
ХСН II/III ФК NYHA, n (%)	-	34 (61,8)/ 21 (38,2)	-
Стенокардия напряжения 2/3 ФК, n (%)	-	26 (47,3)/ 3 (5,5)	-
Перенесенный ИМ, n (%)	-	55 (100)	-
Аневризма ЛЖ, n (%)	-	10 (18,2)	-
Пациенты, перенесшие АКШ, n (%)	-	5 (9,09)	-
Пациенты, перенесшие стентирование, n (%)	-	9 (16,4)	-
Нарушения ритма сердца, n (%)	-	26 (47,3)	-
АГ, n (%)	13 (52)	34 (61,8)	24 (75)
Перенесенный мозговой инсульт, n (%)	-	5 (9,09)	-
Гиперлипидемия, n (%)	12 (48)	26 (47,3)	14 (43,8)
ИМТ, кг/м ²	28,4 $\pm$ 4,4	30,8 $\pm$ 4,9	32,3 $\pm$ 5,8*
Ожирение, n (%)	9 (36)	33 (60)	15 (46,9)
Курение, n (%)	13 (52)	32 (58,2)	18 (56,3)
Стаж курения, лет	23,9 $\pm$ 3,2	24,3 $\pm$ 3,7	22,9 $\pm$ 6,3
Отягощенный семейный анамнез, n (%)	8 (14,5)	27 (49,09)	12 (21,8)

Примечание: * - достоверность отличий от показателя группы сравнения, $p < 0,05$

Критериями включения больных в исследование являлось наличие признаков ХСН II-IV ФК по классификации NYHA и стабильное состояние пациента. При определении диагноза ХСН использовали клинические критерии согласно Национальным рекомендациям ВНОК по диагностике и лечению ХСН [80]. Оценка ФК проводилась согласно классификации New York Heart Association (NYHA).

Причиной ХСН у 100% пациентов был перенесенный ранее инфаркт миокарда (ИМ). При этом в 100% случаев у больных ИБС перенесенный ИМ в анамнезе давностью 6 месяцев и более. Частота сопутствующей патологии у больных с ишемической ХСН представлена в таблице 2.

Таблица 2 – Сопутствующие заболевания у больных с ишемической ХСН

Сопутствующие заболевания	ХСН n=30	ХСН+СД2 n=25
Сахарный диабет 2 типа	-	25 (100%)
Гипотиреоз	7 (23,3%)	4(16%)
Хронический холецистопанкреатит	9 (30%)	5 (20%)
Хронический необструктивный бронхит	11(36,7%)	16 (64%)
Хронический пиелонефрит	4 (13,3)	6 (24%)
Варикозная болезнь вен нижних конечностей	6 (20%)	7(28%)

Все больные с ишемической ХСН получали стандартную базисную терапию: ингибиторы АПФ (эналаприл, периндоприл, рамиприл, фозиноприл) - 43 пациента (78,2%); антагонисты рецепторов к ангиотензину II (лозартан) – 12 человек (21,8%), диуретики (петлевые, тиазидные) - 37 человек (67,3%), β-адреноблокаторы (бисопролол, метопролол, карведилол, небиволол) - 41 человек (74,5%), антагонисты рецепторов к альдостерону (спиронолактон) - 22 человека (40,0%), сердечные гликозиды (дигоксин) - 8 человек (14,5%), статины (аторвастатин, симвастатин, розувастатин) - 55 человек (100%), антиагреганты (аспирин, плавикс) - 55 человек (100%), антагонисты кальция (амлодипин, верапамил, нифедипин) - 7 человек (12,7%), антиаритмики (амиодарон,

пропафенон) - 7 (12,7%). При наличии сопутствующей патологии проводилось соответствующее лечение.

Больные с ишемической ХСН в сочетании СД2, а также больные диабетом без ИБС получали пероральную сахароснижающую терапию, включающую бигуаниды (метформин) - 21 больной (87,5%) и 26 больных (81,3%), соответственно; производные сульфонилмочевины второй и третьей генерации (глибенкламид, гликлазид, глимепирид) - 15 больных (62,5%) и 23 больных (71,9%), соответственно; ингибиторы α -гликозидаз (акарбоза) - 4 больных (16,7%) и 4 больных (12,5%), соответственно. В группе ИБС, сочетанной с диабетом четверо больных получали инсулин. В группе диабета без ИБС двое больных получали инсулин (16,7% и 6,3%, соответственно).

Больные диабетом с сопутствующей АГ без ИБС получали антигипертензивную терапию, включающую ингибиторы АПФ (эналаприл, фозиноприл) - 24 больных (75%); сартаны - 8 человек (25%); β -адреноблокаторы (бисопролол, метопролол) - 18 больных (56,3%); 23 больных (71,9%) получали статины (розувастатин, симвастатин).

В группе сравнения из 25 человек у 13 (52%) диагностирована АГ I-II степени, I стадии, у 12 (48%) - гиперлипидемия; у 9 (36,0%) - ожирение I степени. Антигипертензивная терапия включала ингибиторы АПФ (эналаприл, фозиноприл) - 13 больных (52%); 5 больных (20,0%) - β -адреноблокаторы (бисопролол, метопролол); статины (розувастатин) - 12 больных (48%).

Не включали больных в исследование при наличии: гемодинамически значимого поражения клапанов сердца; кардиомиопатий (гипертрофической, дилатационной, рестриктивной); менее 6 месяцев после острых коронарных событий, эпизодов тромбоэмболии легочной артерии, острого нарушения мозгового кровообращения; острых воспалительных и хронических заболеваний в фазе обострения и неполной ремиссии; онкологических заболеваний и болезней крови; заболеваний щитовидной железы в стадии декомпенсации; тяжелой печеночной и почечной недостаточности; данных на

плохую переносимость используемых лекарственных препаратов; клинически выраженных нарушениях функции дыхания; хронического алкоголизма, психических расстройств.

Медиана проспективного наблюдения составила 3,7 [2,4:3,9] года. Полное обследование пациентов проводили при включении в исследование (1-я точка) и по завершении проспективного наблюдения (2 точка). При этом промежуточное обследование проводилось ежегодно, по редуцированному протоколу и включало рутинные лабораторные и инструментальные исследования.

Клиническое обследование включало подробный опрос больных с целью выяснения жалоб, анамнеза для уточнения длительности и характера течения ИБС (госпитализации по сердечно-сосудистым причинам, перенесенные ИМ, транзиторные ишемические атаки, ОНМК, венозные тромбозы и т.п.); уточнение наличия факторов риска ИБС (АГ, курение, избыточная масса тела, сахарный диабет 2 типа и другие нарушения углеводного обмена, гиперлипидемия и т.д.); отягощённого семейного анамнеза (указания на ИМ, ОНМК или внезапную смерть у ближайших родственников до 60 лет), а так же противопоказаний к включению в исследование; тщательный осмотр больного.

Всем пациентам в начале исследования и по завершении проспективного наблюдения проводили общеклиническое обследование с оценкой жалоб и клинического статуса, толерантности к физическим нагрузкам, качества жизни; лабораторное обследование с проведением общего и биохимического анализа крови, общего анализа мочи и инструментальные обследования (электрокардиографию (ЭКГ), эхокардиографию (Эхо-КГ), R-графию органов грудной клетки). Помимо стандартной схемы обследования всем исследуемым группам проводилось специальное биохимическое исследование.

В течение всего периода проспективного исследования за пациентами осуществляли мониторинг за состоянием здоровья. Для этого при первичном визите и первичном обследовании больному назначалась дата повторного

планового посещения либо больных приглашали на повторные визиты по телефону; во всех случаях пациент и/или его ближайшие родственники и лечащий врач могли контактировать по телефону. Оценивали такие показатели как общее состояние, толерантность к физическим нагрузкам, состояние гемодинамики, показатели структурно-функционального состояния ЛЖ с оценкой его инотропной функции (ФВ ЛЖ), частоту нарастания симптомов и признаков ХСН, частоту госпитализаций по поводу прогрессирования сердечной недостаточности и/или другим сердечнососудистым причинам.

По итогам проспективного наблюдения больные ИБС были разделены на две группы:

- 1) пациенты, у которых отмечалось благоприятное течение заболевания определяли как группа "А"
- 2) пациенты, у которых отмечалось неблагоприятное течение заболевания определяли как группу "Б".

Клиническое течение заболевания оценивали как благоприятное у больных, (вошедших в состав группы А), если в течение проспективного наблюдения на фоне адекватно проводимой терапии состояние пациента отвечало следующим критериям:

- стабильное состояние гемодинамических показателей, отсутствие нарастания симптомов и признаков ХСН;
- отсутствие госпитализаций по поводу СН или другим сердечнососудистым причинам или не более 1 раза в год;
- отсутствие снижения ФВ ЛЖ;
- сохранение прежнего ФК ХСН по NYHA или его уменьшение;
- у больных ХСН и сопутствующим СД2 - удовлетворительный контроль гликемии.

Критерии неблагоприятного течения ХСН у больных, вошедших в состав группы Б:

- увеличение ФК ХСН по NYHA на 1 и более в течение периода проспективного наблюдения;
- госпитализация по поводу СН или другим сердечнососудистым причинам более 1 раза в год;
- летальность либо другие неблагоприятные клинические события (повторные ИМ, мозговой инсульт, ТЭЛА и др.).
- прогрессивное снижение фракции выброса ЛЖ в течение исследуемого периода;
- У больных ХСН и сопутствующим СД2 - неудовлетворительный контроль гликемии.

Из общего количества больных с ишемической ХСН 12 пациентов были утеряны для наблюдения. Таким образом, структура исходов была проанализирована у 43 пациентов с ХСН: в группу "А" включено 25 пациентов (18 человек (72,0%) из группы ХСН без СД2 и 7 человек (28%) из группы ХСН с сопутствующим СД2; в группу "Б" включено 18 пациентов (6 больных из группы ХСН без СД2 (33,3%) и 12 человек (66,7%) из группы ХСН с сопутствующим СД2). Дизайн проспективного исследования представлен на рисунке 1.

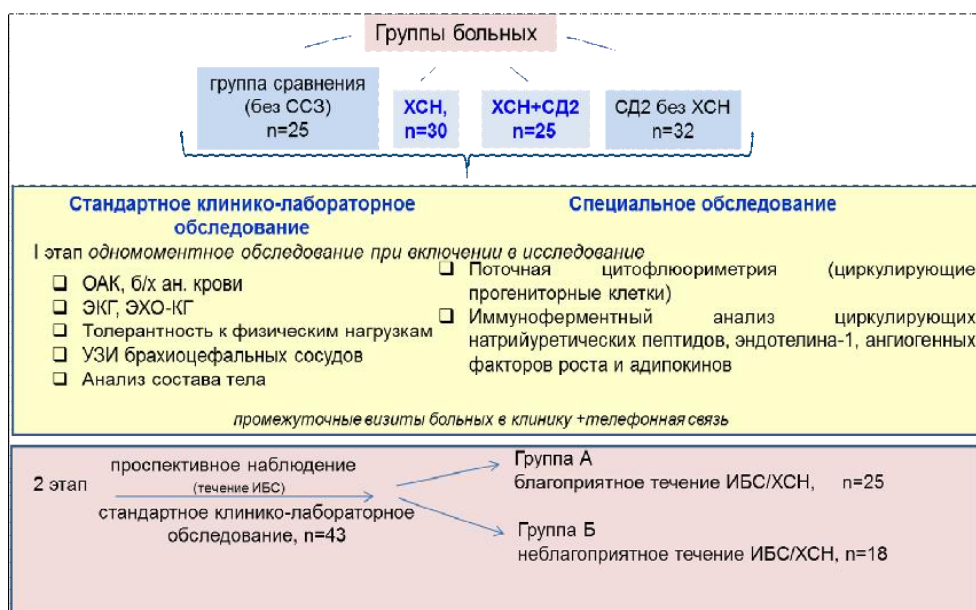


Рисунок 1 – Дизайн проспективного исследования

В одномоментное клиническое исследование для оценки ЦПК было включено 45 больных СД1 и 14 здоровых добровольцев, сопоставимых по возрасту и полу, но ожидаемо статистически значимо отличавшихся большим уровнем глюкозы плазмы натощак и гликозилированного гемоглобина. Критериями не включения были: СД2, состояние кетоацидоза, острые и хронические воспалительные заболевания, онкологические и системные заболевания, тяжелая анемия и другие гематологические заболевания, алкоголизм, пороки сердца, инфаркт миокарда в анамнезе, инсульт, оперативные вмешательства (в том числе и малоинвазивные процедуры) менее 6 месяцев назад, рефрактерная артериальная гипертензия (АД>180/100 мм рт. ст. на фоне гипотензивной терапии), ожирение, синдром диабетической стопы, диабетическая макроангиопатия, терминальная почечная недостаточность, диализ. Все пациенты подписывали информированное согласие на участие в исследовании. Протокол исследования был утвержден на заседании локального этического комитета ФГБУ ЭНЦ МЗ России от 19 января 2009 г. (протокол №1). Больным СД1 типа проводилось стандартное клинико-лабораторное обследование, включавшее общий анализ крови и мочи, биохимический анализ крови, определение HbA1c. Инструментальное обследование включало ЭКГ, ЭХО-КГ, нагрузочные пробы для исключения ИБС. Клиническая характеристика групп, включенных в исследование, представлена в таблице 3.

Таблица 3 – Клиническая характеристика групп, включенных в исследование

Показатели	Здоровые добровольцы	Больные СД 1
Всего, n=59	14	45
Возраст, годы	26,4±3,3	26,6±6,5
Мужской пол, n (%)	5(36)	20(44)
Длительность СД1, (годы)	-	13,3±7,5
Глюкоза плазмы натощак, ммоль/л	4,5±0,6	7,5±2,4
HbA1c, %	4,7±0,7	8,4±2,0
Артериальная гипертензия, n (%)	-	19(42)
СКФ (MDRD мл/мин/1,73 м ²)	98,0±7,9	105,9±24,2
ОХС, ммоль/л	4,3±0,7	4,8±1,4
ХС ЛПНП, ммоль/л	2,0±0,5	2,6±1,2
ХС ЛПВП, ммоль/л	1,9±0,5	1,7±0,6
ТГ, ммоль/л	1,0±0,4	1,1±0,8
Физические нагрузки, n(%)	7(50)	24(53)

В клинико-экспериментальную часть диссертационной работы дополнительно было включено 79 больных, среди которых 32 больных ИБС, 28 больных ИБС и сопутствующим сахарным диабетом 2 типа. Группу контроля составили 19 человек без сердечно-сосудистой патологии и тяжелых хронических заболеваний. Эти пациенты были включены в исследование для оценки влияния ишемической болезни сердца и диабета на ангиогенные свойства мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани. Данным больным помимо стандартного клинико-лабораторного обследования были выполнены высокотехнологичные лечебно-диагностические процедуры: коронароангиография (КАГ), транслюминальная баллонная коронарная ангиопластика (ТБКА) и стентирование, аортокоронарное шунтирование.

Больным ИБС и высоким риском смерти/тяжелых сердечно-сосудистых осложнений была выполнена КАГ с использованием, как правило, трансфеморального доступа в условиях рентгеноперационной на ангиографической установке "Philips Integris Allura" и "General Electric Innova 4100" [130,135]. Для количественной оценки стенозов применяли компьютерную программу установки "General Electric Innova 4100". Поражение коронарных артерий (КА) $>50\%$ принято считать существенным/гемодинамически значимым, а $<50\%$ - гемодинамически незначимым [135]. По степени поражения КА (баллы) пациенты были разделены на группы: 0- (стеноз $< 50\%$), 1 (стеноз одной главной КА $> 50\%$), 2 (стеноз 2 главных КА $>50\%$) и 3 (стеноз 3 КА $> 50\%$) [130, 135].

Пробу с дозированной физической нагрузкой проводили пациентам с синусовым ритмом на ЭКГ (тредмил на аппарате Schiller Cardiovit по модифицированному протоколу). Показаниями к проведению тредмил-теста служили рекомендации ВНОК [33]. Результат оценивали как положительный - появление типичного приступа стенокардии или ее эквивалента в сочетании с ЭКГ-признаками ишемии миокарда: депрессия сегмента ST горизонтального или косонисходящего типа глубиной $\geq 1,0$ мм, измеренная на расстоянии 80 мс при ЧСС <125 уд./мин или 60 мс при ЧСС ≥ 125 уд./мин от точки "j";

отрицательный - отсутствие горизонтальной или косонисходящей депрессии сегмента ST глубиной $\geq 1,0$ мм на расстоянии 60–80 мс от точки "j" в любом из 12 стандартных отведений ЭКГ во время теста или после его окончания в сочетании с отсутствием типичного ангинозного приступа или его эквивалента при достижении субмаксимальной ЧСС; или сомнительный (типичный приступ стенокардии без горизонтальной или косонисходящей депрессии сегмента ST глубиной $\geq 1,0$ мм на расстоянии 60-80 мс от точки "j". Определяли также толерантность к физической нагрузке на основании времени и мощности достигаемой нагрузки: < 6 мин (2,4–4,3 METs) - низкая; 6–12 мин (5,7–7,0 METs) - средняя; ≥ 12 мин ($\geq 8,4$ METs) - высокая [33].

Клинико-демографическая характеристика исследованных групп представлена в таблице 4.

Таблица 4 – Клинико-демографическая характеристика исследованных групп

Показатель	Группы исследования			p-value
	Группа сравнения, n=19	ИБС, n=32	ИБС+СД2, n=28	
Возраст, годы	56,7 $\pm$ 12,3	62,3 $\pm$ 8,6	61,0 $\pm$ 8,2	
Пол, мужской, n(%)	5 (26,3%)	29 (90,6%)	17 (60,7%)	NS
ФК стабильной стенокардии напряжения, n (%)	-	II ФК-8 (25%),	II ФК-5 (18%),	NS
		III ФК - 13 (41%),	III ФК-9 (32%),	
		IV ФК – 11 (34%)	IV ФК-14 (50%)	
ИМ в анамнезе, n(%)	-	20 (63%)	18 (64%)	NS
Атеросклероз коронарных артерий, n(%)	-	2КА-6 (18,8%)	2КА-5 (17,9%)	NS
		3КА-26 (81,3%)	3КА-23 (82,1%)	
Фракция выброса, %	57,8 $\pm$ 1,8	55,0 $\pm$ 9,8	58,0 $\pm$ 9,2	NS
Артериальная гипертензия, n (%)	3 (15,8%)	27 (84%)	24 (86%)	$< 0,05$
Ожирение, n (%)	12 (63%)	20 (63%)	19 (68%)	NS
ИМТ, кг/м ²	28,6 $\pm$ 3,7	30,6 $\pm$ 0,8	28,14 $\pm$ 1,07	NS
Глюкоза, ммоль/л	5,46 $\pm$ 2,2	5,4 $\pm$ 3,2	10,1 $\pm$ 4,1	$< 0,05$
Триглицериды, ммоль/л	1,7 $\pm$ 1,3	2,1 $\pm$ 1,1	1,9 $\pm$ 0,9	NS
Общий холестерин, ммоль/л	4,4 $\pm$ 0,4	4,5 $\pm$ 0,4	4,9 $\pm$ 0,9	NS
Медикаментозная терапия перед АКШ				
β -блокаторы	-	27 (84%)	23 (82%)	NS
Антиагреганты	-	32 (100%)	28 (100%)	NS
Статины	-	28 (88%)	25 (89%)	NS
иАПФ	-	20 (63%)	18 (64%)	NS
Антагонисты кальция	-	13 (41%)	12 (43%)	NS
Диуретики	-	23 (72%)	21 (75%)	NS
Нитраты	-	27 (84%)	23 (82%)	NS

Примечание: ФК-функциональный класс; p-value – для множественного сравнения групп; NS - Non-significant.

Дизайн клинико-экспериментального исследования представлен на рисунке 2.



Рисунок 2 – Дизайн клинико-экспериментального исследования

2.2. Функциональные методы исследования

Стандартное инструментальное обследование включало измерение АД, регистрацию ЭКГ в 12 отведениях, трансторакальную двухмерную ЭХО-КГ, суточное мониторирование ЭКГ по Холтеру, тредмил-тест (по показаниям).

Артериальное давление (АД) измеряли на правой руке в положении сидя после 5-10 минутного отдыха 3 раза через 5 минут, в анализ включали среднее 2 измерений; частоту сердечных сокращений (ЧСС) измеряли в течение 60 сек. в положении пациента сидя после отдыха.

Электрокардиографическое исследование проводилось в 12-ти стандартных отведениях по общепринятой методике на электрокардиографе "SONOS-2500" (Hewlett Packard).

Эхокардиографическое исследование было выполнено на ультразвуковом аппарате iE33 фирмы "Phillips" (Германия) опытным специалистом, находившимся в неведении относительно того, какую терапию принимал тот или иной участник исследования. Для повышения точности измерений в каждом случае усреднялись значения, полученные в 6 последовательных

сердечных циклах у пациентов с синусовым ритмом и в 10 последовательных сердечных циклах у пациентов с мерцательной аритмией.

В ходе исследования определялись стандартные структурно-функциональные показатели сердца (переднезадний размер левого предсердия, толщина межжелудочковой перегородки и задней стенки левого желудочка, конечно-систолические и конечно-диастолические размеры и объёмы левого желудочка, фракция выброса и индекс относительной толщины стенок левого желудочка), а также индекс массы миокарда левого желудочка и доплеровские показатели диастолической функции левого желудочка [35].

Диастолическую функцию ЛЖ оценивали с помощью импульсного доплеровского исследования трансмитрального кровотока и кровотока в легочных венах, тканевого доплеровского исследования диастолического подъёма основания ЛЖ и М-модального цветного исследования скорости распространения раннего диастолического кровотока в ЛЖ. При этом определяли следующие показатели: время изоволюмического расслабления ЛЖ (ВИВР); время замедления кровотока раннего диастолического наполнения ЛЖ (DT); максимальные скорости раннего диастолического наполнения (E) и наполнения в систолу предсердий (A) и их соотношение (E/A); продолжительность наполнения ЛЖ в систолу предсердий (A dur); продолжительность обратного диастолического кровотока в легочных венах (Ar dur); разницу продолжительности волны A и волны Ar (Adur-Ar dur); максимальные скорости диастолического подъёма основания ЛЖ в раннюю диастолу ($\acute{e}$) и в систолу предсердий ($\acute{a}$), а также соотношение $E/\acute{e}$; скорость распространения раннего диастолического кровотока в ЛЖ (V_p) и соотношение E/V_p . Для минимизации трансляционного ("передаточного") влияния соседних сегментов усредняли значения скоростей $\acute{e}$ из области межжелудочковой перегородки и боковой стенки ЛЖ. Поскольку длительно существующее высокое давление в лёгочном венозном русле на определённом этапе приводит к формированию артериальной лёгочной гипертензии, мы также определяли

систолическое давление в лёгочной артерии (СДЛА) по максимальной скорости трикуспидальной регургитации. У больных с мерцательной аритмией при наложении комплекса QRS электрокардиограммы на спектр трансмитрального кровотока интервал DT в этом спектре не измеряли [33, 35].

Определение функционального класса сердечной недостаточности проводили согласно классификации Нью-Йоркской ассоциации кардиологов (NYHA) (1964 г.), с использованием теста 6-минутной ходьбы [33].

Тест 6-минутный ходьбы проводили в утренние часы. Через 3-4 часа после легкого завтрака, обследуемые за сутки прекращали прием лекарственных препаратов (β -адреноблокаторов, иАПФ, БАР, антагонистов кальция, антиаритмических средств), которые могут повлиять на результаты теста, не курили по меньшей мере 2 часа до теста.

Тест 6-минутной ходьбы использовали для оценки толерантности к физической нагрузке больных ХСН. После измерения исходных АД, ЧСС и регистрации ЭКГ обследуемому предлагали в течение 6 мин ходить по коридору длиной 30-60 м и, затем измеряли (в метрах) пройденную дистанцию. Темп ходьбы пациенты выбирали самостоятельно с таким расчетом, чтобы после окончания теста они могли бы продолжить ходьбу без появления одышки, боли за грудиной, мышечной утомляемости или тяжести в ногах.

Результаты теста интерпретировали исходя из того, что дистанцию 550 м не более чем за 6 минут преодолевают только здоровые люди; 6-минутная дистанция больных ХСН I ФК составляет от 426 м до 549 м, а ХСН II ФК - от 301 м до 425 м. Для пациентов III и IV ФК по NYHA 6-минутная дистанция не превышает, соответственно, 300 м и 150 м [33].

Дуплексное сканирование брахиоцефальных артерий. В ходе исследования оценивали толщину комплекса интима-медиа (ТКИМ) и наличие атеросклеротических бляшек (АБ) в сонных артериях (СА). Оценка ТКИМ правой и левой общих сонных артерий (ОСА) проводилась с соблюдением всех требований экспертного соглашения Американского эхокардиографического

общества к оценке субклинического сосудистого поражения и кардиоваскулярного риска у пациентов без клинических признаков атеросклеротического поражения артерий. Критериями наличия АБ в СА являлось локальное утолщение участка СА более чем на 0,5 мм или на 50% в сравнении с окружающими участками или утолщение участка СА, более чем на 1,3 мм с протрузией его в сторону просвета сосуда [337].

Поток-зависимую вазодилатацию (ПЗВД) плечевой артерии (ПА) оценивали в пробе с реактивной гиперемией, на ультразвуковом аппарате "EnVisor HD" производства "Philips" (США), по протоколу D.S. Celermajer [89]. Манжету сфигмоманометра накладывали на плечо проксимальнее места сканирования ПА, затем путём нагнетания воздуха в манжету производилась артериальная окклюзия с давлением на 30-50 мм рт.ст. выше систолического АД (САД). Через 5 минут проводили декомпрессию манжеты, после чего непрерывно на протяжении 90 секунд регистрировали продольное изображение ПА. В течение всего исследования изображение ПА синхронизировалось с R-зубцом ЭКГ; все измерения диаметра (D) сосуда производились в конце диастолы. Изображения ПА фиксировались одновременно на видеомагнитофонную плёнку SVHS для последующего анализа. Диаметр ПА оценивали исходно, через 60 сек и 90 сек после декомпрессии манжеты. ПЗВД вычисляли по формуле: $\text{ПЗВД} = \{(\text{D}_{\text{реак.гип.}} - \text{D}_{\text{исх.}}) / \text{D}_{\text{исх.}}\} \cdot 100\%$, где D реакт.гип. - максимальный диаметр ПА через 60 или 90 сек. После декомпрессии манжеты, D_{исх.} - исходный диаметр ПА [337].

Биоимпедансометрию проводили с помощью анализатора оценки баланса водных секторов организма с программным обеспечением ABC-01 "Медасс". В ходе исследования оценивали абсолютные и относительные значения компонентов состава тела (жировой, мышечной массы, водных секторов). Метод основан на измерении антропометрических параметров и составляющих электрического импеданса участка тела пациента - активного сопротивления (R) и реактивного сопротивления (Xc). Материальным субстратом активного

сопротивления в биологическом объекте являются жидкости (клеточная и внеклеточная), обладающие ионным механизмом проводимости. Субстратом реактивного сопротивления (емкостный компонент импеданса) являются клеточные мембраны. Исследование проводили утром натощак, в положении больного лежа на кушетке; расположение электродов указано на рисунке 3.



Рисунок 3 – Расположение электродов в методике определения состава тела

2.3. Биохимические и молекулярные методы исследования

Кровь для биохимических исследований получали путем венепункции локтевой вены в интервал между 9 и 10 часами утра натощак (после двенадцати или четырнадцатичасового голода).

Всем участникам исследования проводили общий клинический, биохимический, коагулологический анализы крови; общий анализ мочи и анализ мочи по Нечипоренко.

Определение *глюкозы в плазме крови натощак* производили глюкозооксидазным методом на автоматическом анализаторе "Biosen 5030" (Германия).

У всех обследуемых с уровнем глюкозы плазмы натощак $>6,1$ ммоль/л проводили пробу на толерантность к глюкозе [11].

Проба на толерантность к глюкозе проводилась глюкозооксидазным методом на приборе "Biosen EKF" (Германия), в соответствии с рекомендациями [11]. Принцип пробы заключается в двукратном измерении содержания глюкозы в капиллярной крови - до нагрузки и через 2 часа после нее. Нагрузка с глюкозой заключается в следующем: 75 грамм безводной

глюкозы необходимо растворить в 250-300 мл. воды и выпить в течение 3-5 минут натощак.

Уровень глюкозы капиллярной крови $<5,6$ и через 2 часа после ПГТТ $<7,8$ - норма; натощак $\geq 6,1$ или через 2 часа после ПГТТ $\geq 11,1$ или случайное определение $\geq 11,1$; натощак $<6,1$ или через 2 часа после ПГТТ $\geq 7,8$ и $\leq 11,1$ - нарушенная толерантность к глюкозе; натощак $\geq 5,6$ и $<6,1$ и через 2 часа после ПГТТ $<7,8$ - нарушенная гликемия натощак [11].

Уровень гликозилированного гемоглобина (*HbA1c*) определяли методом боратного аффинного анализа, тест-системой фирмы "Drew Scientific" (Великобритания).

Липидный спектр крови определяли на биохимическом анализаторе "Synchron CX-7" фирмы "Beckman" (США) с использованием реактивов фирмы "Human" (Германия). Оценивали общий холестерин сыворотки крови (ОХС), холестерин липопротеидов высокой плотности (ХС ЛПВП), триглицериды, холестерин липопротеидов низкой плотности (ХС ЛПНП). Индекс атерогенности (ИА) рассчитывали по формуле: $ИА = ОХС - ХС\ ЛПВП / ХС\ ЛПНП$.

Уровень высокочувствительного С-реактивного белка (вч-СРБ) определяли высокочувствительным иммунотурбидиметрическим методом. Референсные значения: 0,0-0,5 мг/дл.

Исследование липидного спектра и вч-СРБ проводили на биохимическом анализаторе Hitachi 912 System (Roche, Швейцария).

Общий анализ мочи проводился по стандартной методике со световой микроскопией осадка.

Анализ мочи по Нечипоренко заключался в подсчёте клеток в камере Горяева.

У всех участников исследования для определения других показателей, включая циркулирующие цитокины, факторы роста, адипоцитокины, эндотелин-1 и натрийуретические пептиды получение образцов крови происходило по следующей схеме: 10 мл крови набирали в пробирку с

активатором свертывания для получения сыворотки и 10 мл крови с ЭДТА для получения плазмы. Образцы крови центрифугировали в режиме 3500 rpm в течение 20 минут после предварительного охлаждения центрифуги до температуры +4⁰С, после чего отбирали сыворотку и плазмы в криопробирки объемом по 500 мкл и немедленно замораживали. Аликвоты хранили при температуре -80⁰С.

Иммуноферментный анализ проводили для количественной оценки содержания молекулярных факторов (VEGF165, sVEGFR1, HGF, FGF basic, Angiopoietin-1, PlGF, общего и высокомолекулярного адипонектина, лептина, резистина) в образцах плазмы или сыворотки, а также в образцах культуральной среды с использованием соответствующих наборов реагентов серии Quantikyne (R&D Systems, США) в соответствии с протоколом производителя (таблица 5).

Таблица 5 – Коммерческие наборы, использованные для проведения иммуноферментного анализа (ELISA)

Параметр	Каталожный номер коммерческих наборов
Фактор роста эндотелия сосудов (VEGF)	Human VEGF Quantikine ELISA Kit, DVE00
Рецептор 1 типа к фактору роста эндотелия сосудов (VEGF R1/Flt-1)	Human VEGF R1/Flt-1 Quantikine ELISA Kit, DVR100B
Фактор роста гепатоцитов (HGF)	Human HGF Quantikine ELISA Kit, DHG00
Эндотелин-1 (ЭТ-1)	Endothelin-1 Immunoassay DET100
Фактор роста фибробластов основной (FGFb)	Human FGF basic Quantikine ELISA Kit, DFB50
Ангиопоэтин-1	Human Angiopoietin-1 Quantikine ELISA Kit, DANG10
Плацентарный фактор роста (PlGF)	Human PlGF Quantikine ELISA Kit, DPG00
Общий адипонектин	Human Total Adiponectin/Acrp30 Quantikine ELISA Kit, DRP300
Высокомолекулярный адипонектин	Human HMW Adiponectin/Acrp30 Quantikine ELISA Kit, DHWAD0
Лептин	Human Leptin Quantikine ELISA Kit, DLP00
Резистин	Human Resistin Quantikine ELISA Kit, DRSN00
Тромбоспондин-1 (THBS1)	Human Thrombospondin-1 Quantikine ELISA Kit, DTSP10
PAI-1	Human Serpin E1/PAI-1 Quantikine ELISA Kit DSE100

Уровень поглощения раствора в лунках определяли при длине волны 450 нм с коррективкой при 620 нм. Полученные значения концентрации исследуемого белка в образцах кондиционированных сред нормировали на количество клеток.

Определение сывороточного уровня MR-proANP (midregional pro-atrial natriuretic peptide, среднерегиональный предсердный натрийуретический пропептид) проводилось на анализаторе BRAHMS KRYPTOR compact с использованием коммерческого набора "БРАМС MR-proANP КРИПТОР" (Германия).

Определение сывороточного уровня NT-proBNP (N-terminal pro B-type natriuretic peptide, N-концевой фрагмент предшественника мозгового натрийуретического пептида), проводилось методом ИФА с помощью набора реактивов фирмы Elecsys and cobas analyzers на приборе Roche Achi Elecsys 2010.

Определение сывороточного уровня С-пептида и иммунореактивного инсулина (ИРИ) проводилось методом ИФА с помощью набора реактивов фирмы Elecsys and cobas analyzers на приборе Roche Achi Elecsys 2010. Референсные значения для инсулина и С-пептида составляли 2,6-24,9 мЕд/мл и 1,1-4,4 нг/мл соответственно.

Анализ гликозилирования белков методом флуоресцентной спектроскопии. Белки кондиционированной среды МСК-ЖТ концентрировали в 130 раз, используя 10кДа концентраторы. Поглощение при 280 нм и коэффициент экстинкции 1 (мг/мл) $\cdot$ 1см $\cdot$ 1 были использованы для выравнивания концентраций белка в образцах. Для измерений спектра флуоресценции использовали 0,5 мг/мл белка в 10 мМ ФБС. Спектры возбуждения и испускания флуоресценции анализировали на флуоресцентном спектрометре LS 55 (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). Гликозилирование альбумина и других белков сыворотки определяли по усилению

флюоресценции и/или ее сдвигу в сторону красной области спектра [3, 316, 392]

Анализ экспрессии генов ангиогенных факторов МСК-ЖТ. Содержание мРНК исследуемых факторов, участвующих в регуляции ангиогенеза, проводили методом ПЦР в реальном времени. Для этого из клеток выделяли РНК при помощи набора реагентов RNeasy Miny Kit (QIAGEN, США), затем на матрице РНК строили кДНК, используя набор Fermentas Reverse Transcription Reagents (Fermentas, Литва). Далее проводили ПЦР в реальном времени с использованием интеркалирующего красителя SYBR Green I (Евроген, Россия) и специально подобранных праймеров в амплификаторе BIO-RAD iQ5 Multicolor Real-time PCR detection system (Bio-rad, США). Данные для каждого образца нормировали по экспрессии генов *l7*, *b-actin* и *gapdh* [16].

Количественные ПЦР – эрреи. Общая РНК была выделена из МСК-ЖТ с помощью набора RNeasy Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany), в соответствии с прилагаемой инструкцией. Геномная ДНК была удалена с помощью свободной от РНКаз ДНКазой (Qiagen). Анализ экспрессии ангиогенных факторов проводили согласно протоколу RT2 Profiler PCR Array (SABiosciences, Frederick, MD, USA). Брали 2 мкг РНК из каждого образца и конвертировали в кДНК с использованием набора для синтеза первой цепи RT2 First Strand Kit (SABiosciences) и в составе смеси для ПЦР наносили на 96-луночный планшет Angogenesis PCR Array (cat. # PAHS-024, SABiosciences). Амплификация специфичных продуктов была проанализирована на приборе iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Среднее количество пороговых циклов Ct, полученных при амплификации генов "домашнего хозяйства" (*B2m*, *Rpl13a*, *G3pd* и *Ps1tp5bp1*) использовали для определения относительного порогового цикла измеряемого гена (ΔCt) в каждой лунке. Различия между значениями ΔCt МСК-ЖТ, культивированных в условиях нормогликемии или гипергликемии ($\Delta \Delta Ct$) были проанализированы с помощью непараметрического теста Вилкоксона [3, 408].

2.4. Клеточные методы исследования

Цитофлюориметрия в потоке. Взятие крови из кубитальной вены осуществлялось в утренние часы (между 9-10 ч), натощак, после 10-минутного отдыха и адаптации пациента/донора к окружающей обстановке, в положении сидя на стуле. Для исследования 10 мл крови забирали в пробирку с ЭДТА в качестве антикоагулянта. Полученный образец крови при комнатной температуре доставляли в лабораторию для оценки количества циркулирующих прогениторных клеток методом проточной цитофлюориметрии (сортер MoFlo, Beckman Colter, США). Из образцов крови выделяли моноклеарную фракцию с помощью раствора Hisopaque-1077 (Sigma-Aldrich, кат. № 10771) в соответствии с инструкцией производителя. Полученные клетки ресуспендировали в 150 мкл фосфатно-солевого буфера (ФСБ) с 2% бычьим сывороточным альбумином (конечная концентрация ~ 108/мл). Клеточную суспензию разделяли на 2 пробы: 1) пробу для выявления предшественников (100 мкл); 2) пробу с изотипическими контролями (50 мкл клеточной суспензии + 50 мкл ФСБ с 2% альбумином). Добавляли по 20 мкл на пробу флуоресцентно-меченные антитела и инкубировали в темном месте при легком перемешивании при комнатной температуре в течение 2 ч. Использовали следующие комбинации антител: 1). CD45-FITC (Beckton Dickinson, BD, кат № 555482), KDR-PE (R&D Systems, кат. № FAB357P), CD133-Biot (Miltenyi Biotec, кат № 130-090-852), Str-PerCP (Jackson ImmunoResearch, кат № 016-120-084, добавляли после 1 ч инкубации), CD34-APC (BD, № 555824), 2). CD45-FITC (BD, № 555482), IgG-PE (BD, № 555749), IgG-PerCP (R&D, № IC003C), Str-PerCP (Jackson ImmunoResearch, кат № 016-120-084, добавляли после 1 ч инкубации), CD34-APC (BD, № 555824).

По истечении периода окраски антителами разбавляли каждую пробу ФСБ до объема 1,5 мл и осаждали центрифугированием при ускорении $300g \times 10$ мин, удаляли супернатант, ресуспендировали в 600 мкл ФСБ (300 мкл для изотипического контроля) и добавляли Хехст 33342 (Invitrogen кат № H21492)

до конечной концентрации 10 мкг/мл. Инкубировали 20-90 мин при комнатной температуре. Анализировали клетки на проточном цитофлюориметре/сортировщике MoFlo (Beckman Colter, США) с использованием возбуждения на длинах волн 355, 488 и 635 нм. При этом накапливали не менее 2 млн. Хехст-положительных событий для первой пробы и не менее 1 млн. - для пробы с изотипическими контролями. Анализ данных осуществлялся при помощи программного обеспечения цитометра, (Summit для Beckman Coulter и FACSDiva для BD), или специализированного программного обеспечения FlowJo (Treestar Inc, США) или Kaluza (Beckman Coulter). Анализ проводился по следующей схеме:

1). Выделение фракции живых моноклеаров крови

а) На гистограмме Хехст красный (650-690 нм, линейная шкала), Хехст голубой (420-450 нм, линейная шкала) выделяли область живых клеток. Эти клетки характеризовались менее интенсивным окрашиванием и преобладанием голубой компоненты флюоресценции Хехста. Отображение этих клеток представлено на гистограмме прямого/бокового светорассеяния, (рисунок 4А).

б) На гистограмме (прямое, боковое светорассеяние) выделяли область лимфоцитов/НК-клеток/моноцитов (моноклеаров) и отображали эти клетки на гистограмме [CD45, CD34], (рисунок 4Б).

2). Определение CD34+ предшественников и содержания среди них KDR+ и CD133+ клеток

а) На гистограмме [CD45, CD34] выделяли клетки с высокой экспрессией CD34 и пониженной экспрессией CD45 (CD34+/CD45-Low, рисунок 4В). Эти клетки представляют собой большинство циркулирующих предшественников. Рассчитывали число CD34+/CD45-Low клеток на 1 миллион моноклеаров, выделенных в п.1б. Отображали эти клетки на гистограмме [KDR, CD133] или [IgG-PE, IgG-PerCP] для изотипического контроля.

б) С помощью пробы с изотипическим контролем определяли верхнюю границу базовой флюоресценции клеток в каналах PE и PerCP (рисунок 4Г). На

гистограмме [KDR-PE, CD133-PerCP] выделяли клетки, интенсивность флюоресценции которых в каналах PE и PerCP превышала базовую флюоресценцию (рисунок 4Д). Рассчитывали, какой % из CD34⁺ клеток экспрессирует KDR и CD133.

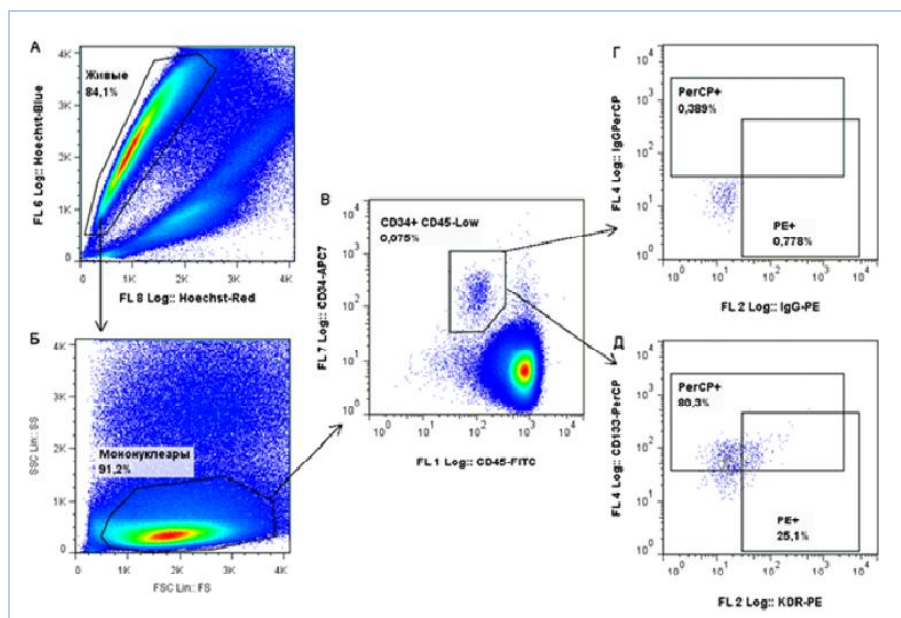


Рисунок 4 – Пример детекции субпопуляций предшественников среди мононуклеаров периферической крови

А. Выделение живых клеток на основании соотношения красной (Hoechst-Red) и голубой (Hoechst-Blue) флуоресценции Хёхста 33342. Б. Выделение мононуклеаров (лимфоциты, НК-клетки, моноциты) на основании светорассеяния. В. Идентификация CD34⁺/CD45^{Low} предшественников. Г. Определение базового уровня флюоресценции клеток в каналах PE и PerCP с помощью изотипических иммуноглобулинов. Д. Детекция KDR-положительных (PE⁺) и CD133-положительных (PerCP⁺) клеток

Воспроизводимость и контроли: CD34⁺ CD45^{Low} популяция практически всегда четко различима и обладает интенсивной окраской CD34. Среди 120 образцов мононуклеаров, проанализированных на Факультете фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова, в 98,3% из них

удалось четко различить эту популяцию клеток. В случае, когда популяция неразличима, проверяли юстировку прибора и корректность регистрации в канале APC. Если юстировка верна и параметры регистрации в канале APC в норме, осуществляли замену антитела к CD34. Если даже с новыми антителами популяция CD34⁺ CD45^{-Low} не регистрировалась или регистрировалась не четко, проверяли все реагенты, используемые в пробоподготовке и при необходимости, их заменяли.

Отрицательными контролями окраски на KDR, c-Kit, CD 133 служат клетки, окрашенные изотипическими антителами, конъюгированные с соответствующей специфическим антителам флюоресцентной меткой (Стрептавидин-Р PerCP для CD133).

Положительный контроль для CD34 не требуется, т.к. присутствует практически в каждом образце. CD133 экспрессирован почти на всех CD34⁺ CD45^{-Low} клетках, хотя и в меньшей степени. Сравнение уровня интенсивности свечения PerCP в изотипическом контроле и в пробе, окрашенной на CD133, позволяет понять, есть ли специфическое окрашивание CD133. Положительным контролем окрашивания на KDR являются CD45⁺ моноциты, т.к. они несут на поверхности все эти антигены, хотя и в умеренном количестве.

Надежность и достоверность подсчета популяций была оценена при помощи параллельной пробоподготовки, окраски и анализа двух проб из одного исходного образца крови. При этом различия по относительному содержанию CD34⁺ CD45^{-Low} клеток составляли менее 10% [23, 37, 42].

Выделение и культивирование клеток. Исследование проводили на культивируемых мезенхимальных стромальных клетках жировой ткани (МСК-ЖТ) и эндотелиальных клетках человека. МСК-ЖТ были выделены из жировой ткани взрослых доноров, полученной в ходе плановых хирургических вмешательств, согласно ранее опубликованному протоколу [3] с некоторыми модификациями [16]. Для этого жировую клетчатку измельчали на гомогенизаторе GentleMACS (Miltenyi) и смешивали с растворами ферментов

коллагеназы I типа (200 ед/мл) (Wornington) и диспазы (40 ед/мл) (Sigma) при соотношении объема ткани к объему ферментативного раствора 1:2. Образец инкубировали при 37°C в течение 45 мин, при периодическом интенсивном встряхивании. Затем к полученной суспензии добавляли равный объем среды DMEM с 10% ФБС для инактивации ферментов и центрифугировали при 200g в течение 5 мин. Супернатант удаляли, осадок ресуспендировали в деионизованной воде с целью лизиса эритроцитов. Осмотическое давление восстанавливали с помощью добавления десятикратного ФСБ. Полученную суспензию фильтровали через нейлоновые фильтры с размером пор 100 мкм (BD Falcon) и повторно осаждали с помощью центрифугирования при 200g в течение 5 мин. Клетки ресуспендировали в среде роста, поддерживающей рост недифференцированных мезенхимальных клеток (HyClone, Logan, UT, USA), содержащей 10% ростовой добавки (HyClone), 100 ед/мл пенициллина и 100 ед/мл стрептомицина, высаживали в чашки Петри с плотностью 5×10^4 /см² и инкубировали при 37°C и 5% CO₂. На следующий день в чашках меняли среду для удаления не прикрепившихся клеток. Клетки пассировали при достижении 70% монослоя с помощью обработки раствором ферментов (HyQ-Tase, HyClone). После первого пассирования клетки выращивали в течение 10-12 дней в условиях 5мМ или 25мМ концентрации глюкозы (высокую концентрацию глюкозы создавали, добавляя в среду роста D-глюкозу (Sigma Aldrich)). Среду роста меняли каждые 3 дня.

Цитометрический анализ фенотипа МСК-ЖТ. Все эксперименты проводили на мезенхимальных клетках жировой ткани человека второго пассажа. МСК-ЖТ идентифицировали по наличию поверхностных маркёров CD105, CD73 и CD90 и отсутствию CD45 и CD34 и способности к индуцированным характерным дифференировкам в остеогенном и адипогенном направлениях. Анализ с помощью проточной цитометрии показал, что преобладающее большинство клеток экспрессируют CD105, CD73 и CD90 и не

экспрессируют CD34 и CD45, т.е. являются мезенхимальными клетками (рисунок 5) [3, 15, 16, 22].

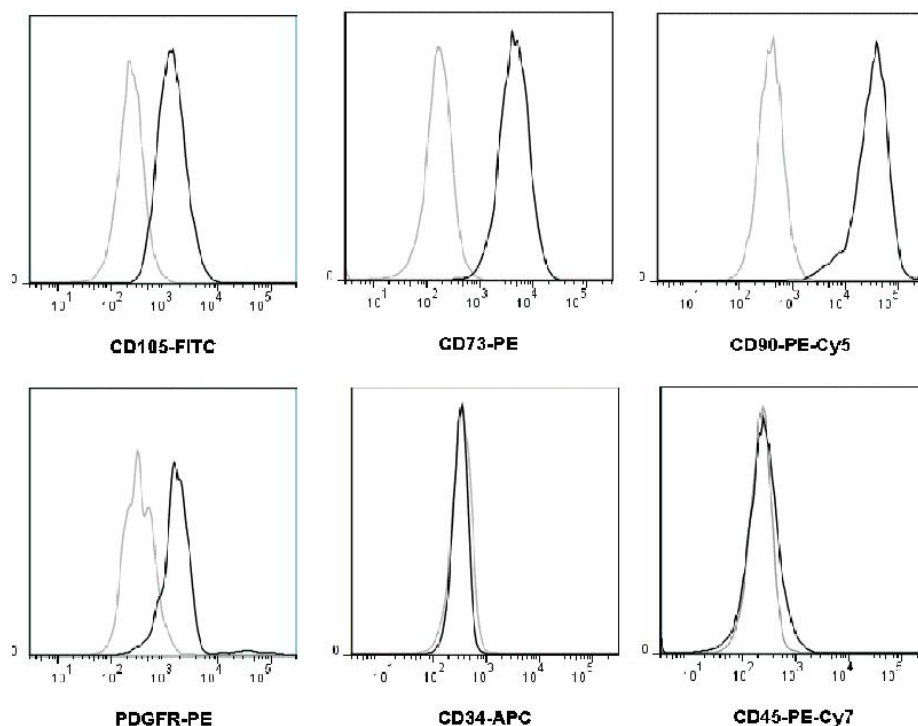


Рисунок 5 – Гистограммы распределения клеток по уровню экспрессии поверхностных антигенов, полученные с помощью проточной цитофлуориметрии [22]. Сплошной линией представлены гистограммы клеток, окрашенных специфическими антителами, линией со штрихами - изотипическими иммуноглобулинами, конъюгированными с аналогичными флуоресцентными красителями. По горизонтали - интенсивность флуоресценции флуоресцентного маркёра, по вертикали - интенсивность флуоресценции в зависимости от количества клеток в культуре. Под гистограммами - используемые конъюгаты специфических антител с флуоресцентными красителями

Также эти клетки экспрессируют рецептор тромбоцитарного фактора роста-B (PDGFR), являющийся характерным маркером перицитов. Подобное перекрытие маркёров МСК и перицитов наблюдалось и другими группами

исследователей [268], что может быть следствием близости этих двух типов клеток в иерархии дифференцировки.

Анализ миграции МСК-ЖТ на модели застывания царапины in vitro (wound scratch assay). Для анализа миграции МСК-ЖТ, доросшие до монослоя, инкубировали 24 часа в среде без сыворотки. Затем наносили царапину стерильным наконечником. Миграцию клеток в отсутствие стимулятора или при добавлении 10 нг/мл PDGF документировали с помощью цейтраферной видеосъемки в течение 10 часов. По окончании съемки, оценивали среднюю длину траектории клеток с помощью морфометрической программы MetaMorph7.1. [308].

Формирование капиллярноподобных структур in vitro. Для оценки влияния кондиционированной среды МСК-ЖТ, выращенных в условиях нормо- и гипергликемии, а также для оценки влияния суммарных продуктов секреции МСК-ЖТ больных ИБС и СД2 на формирование капиллярноподобных структур эндотелиальными клетками, 5×10^4 HUVEC высевали на 24-луночный планшет, покрытый Матригелем без факторов роста (BD Biosciences) и инкубировали в среде DMEM, содержащей 10% ФБС (HyClone), 200 мкг/мл ECGF (RELIA Tech GmbH, Germany), 5 Ед/мл гепарина, 1 мМ пирувата Na (GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA), 100 Ед/мл пенициллина и 100 Ед/мл стрептомицина (GIBCO BRL) и 20 мМ HEPES (Helicon) в присутствии концентрированной в 40 раз кондиционированной среды роста МСК-ЖТ при 37⁰С в течение 24 часов. Суммарную длину формирующихся капиллярноподобных структур оценивали в 5 случайных полях зрения в каждой лунке, используя программу MetaMorph 7.1 (Universal Imaging, Downingtown, PA, USA). Эксперименты повторяли трижды в трех параллелях. Достоверность различий анализировали с помощью U-критерия Манна-Уитни, различия с $p < 0,05$ считали статистически значимыми [3, 16].

Исследование влияния гипергликемии на функциональное состояние МСК-ЖТ при моделировании in vitro. МСК-ЖТ культивировали в стандартном

инкубаторе клеток в среде, поддерживающей рост недифференцированных мезенхимальных клеток (HyClone, Logan, UT, USA), содержащей 10% ростовой добавки (HyClone), 100 Ед/мл пенициллина и 100 Ед/мл стрептомицина. Клетки пассировали при достижении монослоя с помощью обработки раствором ферментов (HyQ-Tase, HyClone). После первого пассирования клетки помещали на 10–12 дней в условия 5мМ или 25мМ концентрации глюкозы (высокую концентрацию создавали, добавляя в среду роста D-глюкозу (Sigma Aldrich)). Среду роста меняли каждые 3 дня [3].

Исследование влияния окисленных липопротеидов низкой плотности на функциональное состояние клеток при моделировании гиперлипидемии in vitro. МСК-ЖТ были выделены из образцов жировой ткани здоровых доноров, полученных в ходе хирургического вмешательства. Ткань гомогенизировали механически и подвергали ферментативной обработке в растворе коллагеназы I типа ("Worthington Biochemical", США). Полученную суспензию фильтровали и лизировали эритроциты. Клетки ресуспендировали в среде культивирования Advance STEM Mesenchymal Stemcell Basal Medium ("HyClone", Великобритания) с содержанием сыворотки (10% stem cell growth supplement ("HyClone", Великобритания), 100 ед/мл пенициллина и 100 ед/мл стрептомицина ("GIBCO BRL"). После выделения клетки культивировали в пластиковых чашках в инкубаторе при 37⁰С и 5% CO₂ в субконфлуентном монослое до второго пассажа. Для эксперимента МСК-ЖТ первого пассажа, полученные от трех здоровых доноров, высаживали в концентрации 100 тыс/мл в 6 луночные планшеты и культивировали до достижения субконфлуентного монослоя. Нативные и окисленные ЛПНП в различных концентрациях добавляли в среду роста в условиях депривации и без депривации МСК. Депривацию клеток проводили в течение 24 ч путем смены среды роста МСК на среду без содержания сыворотки (0% stem cell growth supplement). Через сутки после добавления липопротеидов оценивали жизнеспособность МСК-ЖТ по количеству живых клеток методом проточной цитофлуориметрии [22].

Выделение липопротеидов. Липопротеиды низкой плотности (ЛПНП) ($d = 1.019-1.063$ г/мл) выделяли из плазмы здоровых доноров в возрасте 20-40 лет методом последовательного ультрацентрифугирования в градиенте NaBr в присутствии 1 мг/мл ЭДТА. Перед анализом липопротеиды диализовали против 0.01 М PBS (фосфатно-солевой буфер), pH 7.4. Определение концентрации белка проводили по методу Lowry [22].

Приготовление окисленных ЛПНП. Свежевыделенные ЛПНП диализовали против 0.01 М PBS и окисляли методом автоокисления на воздухе в течение ночи при 37°C. Окисление ЛПНП оценивали с помощью спектрофотометрии по уровню абсорбции на длине волны 234 нм и образованию конъюгированных диенов [22].

2.5 Статистический анализ

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием пакета статистических программ STATISTICA v. 8.0. и IBM SPSS Statistics 21. Определяли среднее значение и стандартное отклонение исследуемых количественных переменных, распределение которых существенно не отклонялось от нормального. Если распределение отклонялось от нормального, то для описания количественных признаков приводили медиану, интерквартильный размах, максимальное и минимальное значение. Для сравнительного анализа показателей в трех группах использовали ранговый непараметрический H-критерий Краскела-Уоллеса. Для попарного сравнения применяли U-критерий Манна-Уитни. Описание качественных данных проводилось путем построения таблиц сопряженности с указанием абсолютных и относительных частот встречаемости признаков. Попарное сравнение частот встречаемости признаков в группах проводили при помощи χ^2 - критерия.

Для описания качественных признаков использовали анализ таблиц сопряженности 2x3 (критерий χ^2 -квадрат), анализ таблиц сопряженности 2x2 проводили двусторонним точным критерием Фишера. Для проведения

корреляционного анализа был использован коэффициент ранговой корреляции Спирмена.

Для выявления вероятных предикторов неблагоприятного течения ИБС и ХСН применяли отношение шансов при указанном значении исследованной переменной в сравнении с отсутствием этого значения, для которого строились 95% доверительные интервалы.

Статистическую значимость в модели бинарной логистической регрессии каждого из включенных параметров оценивали по критерию Вальда, для которого также рассчитывалось точное p - значение.

Для оценки прогностического влияния факторов был выполнен ROC анализ. В зависимости от значения медианы количественных показателей строились кривые Каплана-Майера с анализом достоверности различий при помощи теста log-rank.

Уровень значимости для всех критериев принимали равным 0,05. В диссертации приведены точные p - значения для каждой вычисленной критериальной статистики до третьего знака после запятой.

ГЛАВА 3

ВЛИЯНИЕ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ РИСКА НА ПРОГЕНИТОРНЫЕ КЛЕТКИ СОСУДОВ

Хроническая гипергликемия вызывает нарушение роста кровеносных сосудов и ухудшает обновление эндотелия [8, 289].

Ранее нашей научной группой было показано, что гипергликемия вызывает подавление миграции эндотелиальными клетками, активация которой является ключевым начальным этапом ангиогенеза. Исследователи продемонстрировали, что ангиогенные свойства эндотелиальных клеток, оцененные по их способности формировать капилляроподобные структуры при стимуляции эмбриональной сывороткой, значительно снижаются в условиях, моделирующих гипергликемию. Обнаруженное авторами уменьшение содержания VEGFR2 на поверхности эндотелиальных клеток может быть причиной снижения их чувствительности к VEGF-A, и, соответственно, снижения их способности к миграции на VEGF и формированию ими капилляроподобных структур [20]. Таким образом, были получены убедительные данные о том, что в условиях гипергликемии *in vitro* наблюдается неблагоприятное для процессов ангиогенеза влияние на зрелые эндотелиальные клетки сосудов.

Однако, по современным представлениям, в репарации и регенерации тканей, в том числе, в сосудистой репарации, принимают участие и другие типы клеток. Для того, что бы выяснить, насколько гипергликемия может нарушать функциональные характеристики прогениторных клеток, мы исследовали мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки жировой ткани.

3.1. Влияние гипергликемии на функциональные характеристики мезенхимальных стромальных клеток

МСК обнаружены не только в ткани костного мозга и в жировой ткани, но присутствуют практически во всех тканях организма, локализуясь в стенке сосудов. Сегодня МСК считаются одним из самых перспективных типов постнатальных прогениторных клеток для регенеративной медицины благодаря их способности стимулировать ангио-артериогенез, рост нервных окончаний, регулировать иммунные реакции за счет секреции широчайшего спектра биологически активных молекул и внеклеточных везикул [320, 330, 336].

3.1.1. Влияние гипергликемии на количество мезенхимных стволовых клеток с высоким клоногенным потенциалом в популяции мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани

Регенеративные свойства гетерогенной популяции МСК-ЖТ в определенной степени зависят от присутствия в ней субпопуляций, проявляющих свойства постнатальных стволовых клеток. Показано, что среди МСК-ЖТ такой субпопуляцией являются клетки, несущие маркеры $CD49a^+/CD73^+$ [38].

Используя анализ иммунофенотипа МСК-ЖТ, культивированных при разных концентрациях глюкозы, мы обнаружили, что доля клеток, несущих маркерные антигены $CD105^+/CD73^+$, составляет $58\pm 8\%$ МСК, выращенных в условиях, моделирующих нормогликемию. Кроме того, $18\pm 7\%$ этих клеток содержали маркеры мезенхимальных стволовых клеток с высоким клоногенным потенциалом. В популяции МСК, культивированных в условиях, моделирующих гипергликемию, доля мезенхимальных стволовых клеток составила $56\pm 9\%$, а клеток, несущих маркерные антигены $CD49a^+/CD73^+$, $14\pm 6\%$ [3].

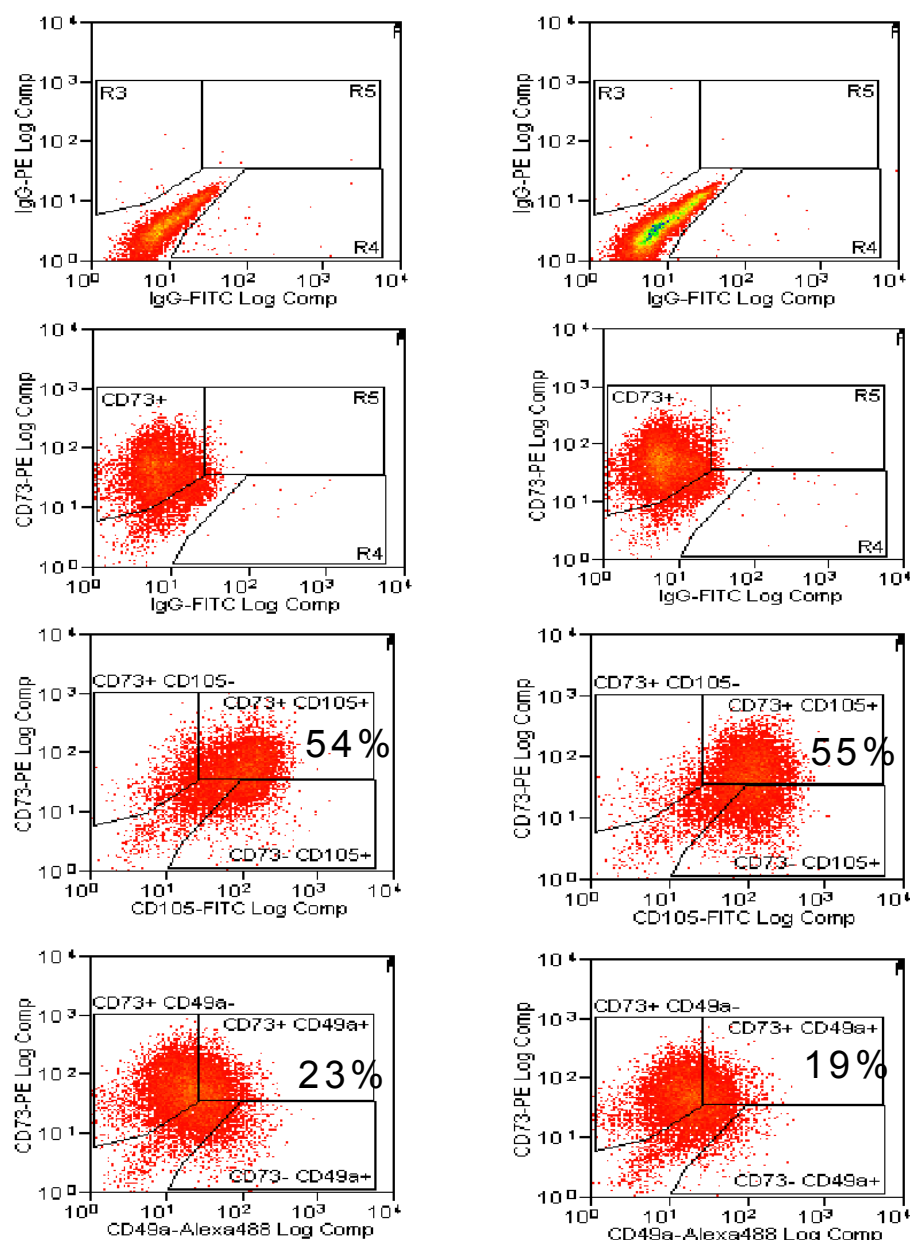
Таким образом, длительное культивирование в условиях, моделирующих постоянную гипергликемию, не влияет на содержание мезенхимальных стволовых клеток в популяции культивируемых МСК.

В настоящем исследовании мы акцентировали внимание на влиянии гипергликемии на основные функциональные характеристики прогениторных клеток, вовлеченных в процессы регенерации и репарации сосудов, поскольку все еще не выясненным остается вопрос о причинах и механизмах развития микро и макроангиопатии при диабете.

В нашей работе мы моделировали постоянную (хроническую) и периодическую гипергликемию, с той целью, чтобы имитировать эти нарушения углеводного обмена, которые имеют место быть как при сахарном диабете, так и при других нарушениях гликемии (нарушенная толерантность к глюкозе, нарушенная гликемия натощак, гестационный сахарный диабет и другие). В клинической практике вышеуказанные нарушения углеводного обмена часто сопутствуют ожирению, метаболическому синдрому, многим заболеваниям ССС (ИБС, ХСН, артериальная гипертензия и др.) и требуют раннего и более тщательного контроля метаболических факторов риска в целом у таких пациентов.

3.1.2. Влияние гипергликемии на пролиферативную активность и апоптоз мезенхимальных стромальных клеток

Поскольку повышенная концентрация глюкозы может влиять на пролиферацию и апоптоз клеток, мы сравнили жизнеспособность клеток, а также их способность к пролиферации и гибели в результате апоптоза, в популяции МСК, культивированных в условиях, моделирующих нормо- и гипергликемию. Мы обнаружили, что около 20% МСК-ЖТ 2 пассажа находятся в активных фазах клеточного цикла ($S+G_2+M$). Гипергликемия не оказывала влияния на долю пролиферирующих клеток в популяции ($14\pm 3,1\%$ при нормогликемии; $14,6\pm 4,3\%$ при гипергликемии) (рисунок 6, 7).



А.

Б.

Рисунок 6 – Цитометрический анализ содержания мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток в культивируемых МСК-ЖТ 2 пассажа [3]. Репрезентативные гистограммы цитометрического анализа клеток, окрашенных неспецифическими иммуноглобулинами, конъюгированными с флуорохромами FITC и PE (верхние панели) или специфическими антителами против CD73, CD105 и CD49, конъюгированными с флуорохромами FITC и PE. По оси ординат интенсивность флуоресценции PE (контрольные IgG или CD73). По оси абсцисс – интенсивность флуоресценции FITC (CD105 или CD49). А. – МСК, культивированные в условиях концентрации глюкозы 5,5 мМ. Б. - МСК, культивированные в условиях концентрации глюкозы 25 мМ

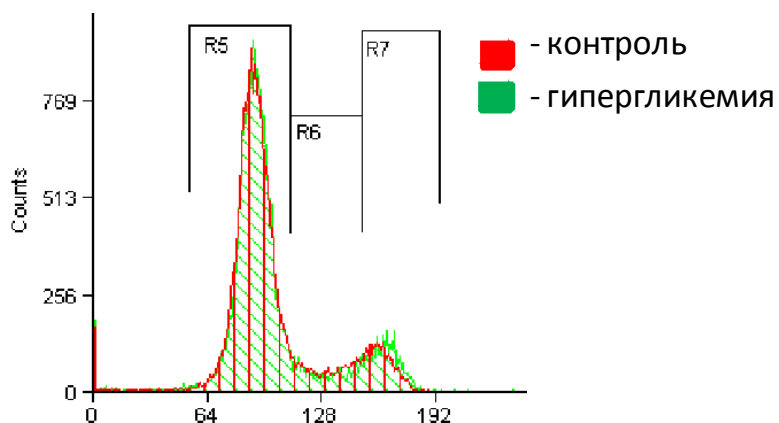


Рисунок 7 – Цитометрический анализ содержания ДНК в культивируемых МСК-ЖТ: репрезентативная гистограмма цитометрического анализа клеток, окрашенных ДНК-связывающим красителем Hoechst33342 [3]. По оси ординат количество клеток. По оси абсцисс - интенсивность флуоресценции Hoechst33342. R5 - клетки в G_0/G_1 -фазе клеточного цикла; R6 - клетки в S-фазе; R7 - клетки в G_2/M -фазе

При анализе жизнеспособности оказалось, что около 0,14% МСК-ЖТ, культивируемых в условиях нормогликемии, накапливали 7-AAD, что свидетельствовало о нежизнеспособности этих клеток. В популяции МСК, культивируемых в условиях высокой концентрации глюкозы, доля нежизнеспособных клеток составила не более 0,3% (рисунок 8). Однако, наблюдаемые различия оказались статистически не достоверными. Мы также обнаружили, что $0,3 \pm 0,09\%$ МСК, культивируемых в условиях нормальной концентрации глюкозы, находились на ранних стадиях апоптоза (связывали аннексин V, но не накапливали 7-AAD). Содержание апоптотных клеток в популяции МСК, культивируемых в условиях повышенной концентрации глюкозы, составило $0,26 \pm 0,08\%$. Таким образом, длительная инкубация в условиях высокой концентрации глюкозы не влияла на пролиферацию и жизнеспособность культивируемых МСК-ЖТ [3].

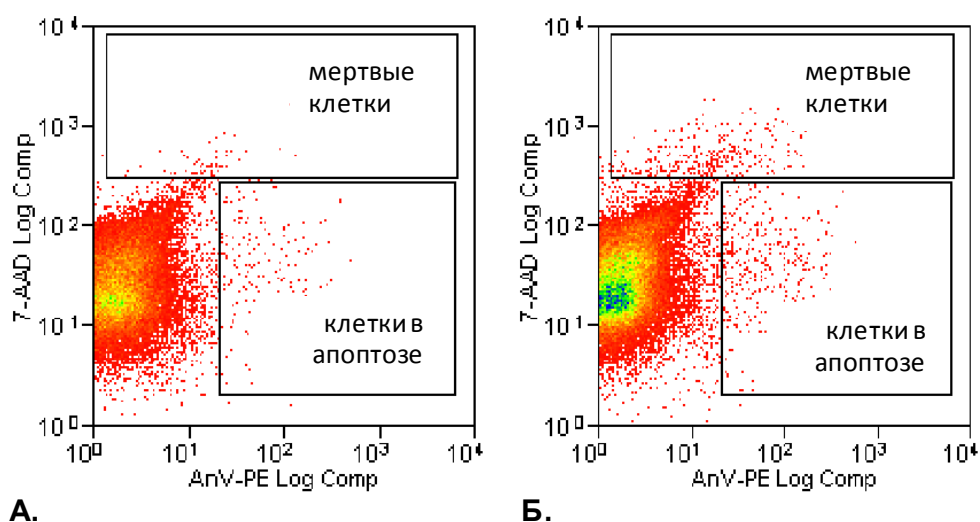


Рисунок 8 – Репрезентативные гистограммы цитометрического анализа клеток, окрашенных неспецифическими иммуноглобулинами, конъюгированными с флуорохромами FITC и PE (верхние панели) или специфическими антителами против CD73, CD105 и CD49, конъюгированными с флуорохромами FITC и PE [3]. По оси ординат интенсивность флуоресценции PE (контрольные IgG или CD73). По оси абсцисс - интенсивность флуоресценции FITC (CD105 или CD49). А. - МСК, культивированные в условиях концентрации глюкозы 5,5 мМ. Б. - МСК, культивированные в условиях концентрации глюкозы 25 мМ

3.1.3 Влияние гипергликемии на миграцию мезенхимальных стромальных клеток

Ранее в нашей лаборатории было показано, что МСК стимулируют не только рост, но и созревание кровеносных сосудов, секретируя стабилизирующие факторы роста (HGF, ангиопоэтин-1) и формируя физические контакты с эндотелиальными клетками [308]. Поскольку для стабилизации формирующихся сосудов необходимо привлечение МСК, миграция этих клеток необходима для адекватного ангиогенеза. Для оценки влияния повышенной концентрации на способность МСК-ЖТ к индуцируемой миграции мы сравнили скорость заращения царапины в монослое МСК, выращенных в условиях нормальной и повышенной концентрации глюкозы.

Оказалось, что в отсутствии стимулятора клетки, культивируемые как в присутствии 5,5 мМ, так и 25мМ глюкозы, мигрировали слабо, (рисунок 9). При добавлении наиболее стимулятора миграции МСК PDGF-BB, скорость заращения царапины увеличивалась более, чем в 3 раза. При этом клетки, выращенные в условиях 25мМ глюкозы, мигрировали несколько слабее, чем МСК, культивированные при 5,5мМ глюкозы (рисунок 9). Однако наблюдаемое различие не было статистически достоверным.

Таким образом, полученные данные указывают на то, что повышение концентрации глюкозы до 25 мМ не влияет на миграционную активность МСК.

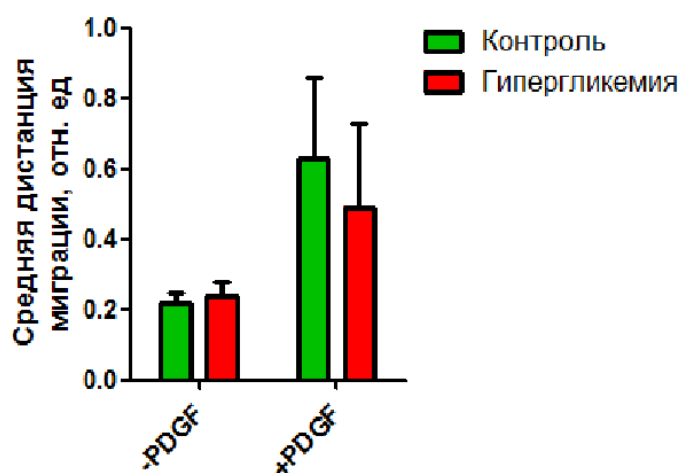


Рисунок 9 – Оценка миграции МСК на модели заращения царапины *in vitro* [5]. На диаграмме представлены средние значения $\pm$ стандартное отклонение ($n=15$) треков, пройденных клетками в течение 10 часов, в среде без стимуляторов (- PDGF) или при добавлении 10нг/мл рекомбинантного PDGF-BB человека (+ PDGF).

3.1.4. Влияние гипергликемии на уровень гликозилирования клеточных белков

Поскольку некаталитическое глюкозилирование белков является одной из причин патологического влияния хронической гипергликемии *in vivo*, мы предположили, что снижение функциональной активности ЭК *in vitro* также

может быть вызвано накоплением гликозилированных белков в среде культивирования.

Ранее было показано, что присутствие в среде гликозилированных белков может подавлять формирование капилляроподобных структур ЭК [224]. Более того, присутствующие в сыворотке факторы роста могут быть инактивированы посредством гликозилирования. Для того, чтобы оценить изменение содержания гликозилированных белков в гипергликемических средах, мы сравнили спектры флюоресценции белков кондиционированных сред ЭК, культивированных в условиях нормогликемии или гипергликемии. Присутствие гликозилированных белков в среде вызывает сдвиг флюоресценции в красную область спектра. Однако мы обнаружили, что спектры флюоресценции исследуемых сред не различались (рисунок 10) [3].

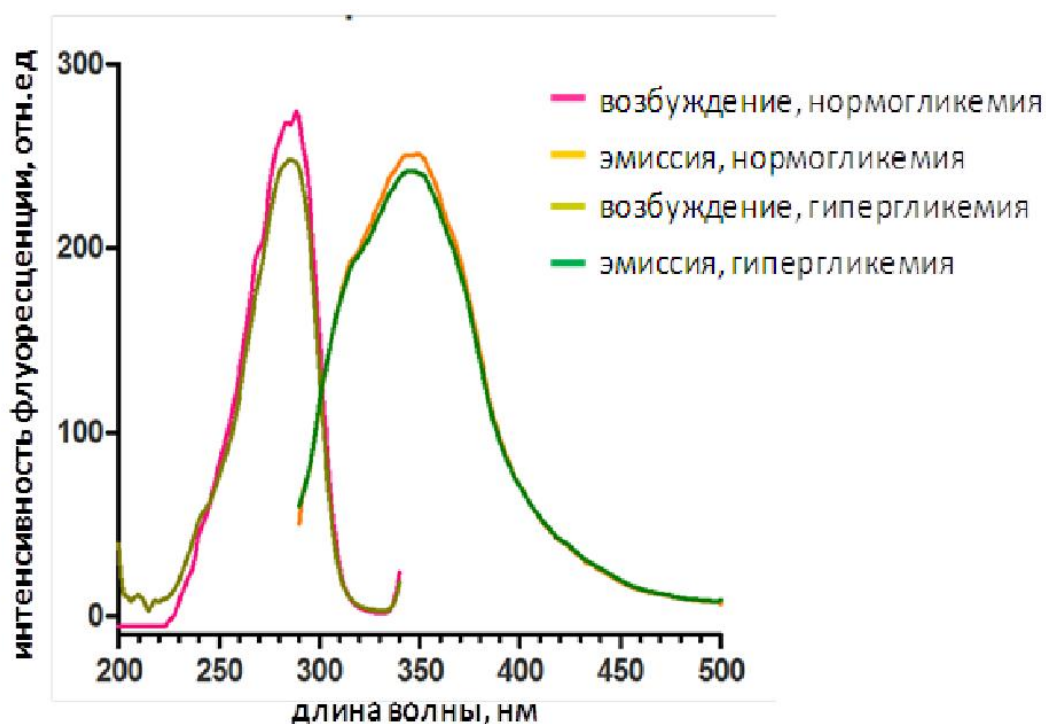


Рисунок 10 – Спектр флуоресценции кондиционированных сред [3]

Таким образом, механизм снижения ангиогенной активности ЭК, вызванного гипергликемией *in vitro*, не связан с гликозилированием белков.

3.1.5. Влияние гипергликемии на ангиогенную активность мезенхимальных стромальных клеток

Ранее было показано, что МСК-ЖТ стимулируют рост кровеносных сосудов посредством продукции цитокинов и факторов роста, которые индуцируют миграцию и пролиферацию эндотелиальных клеток [83, 180, 195]. Чтобы выяснить, как повышенная концентрация глюкозы влияет на ангиогенные свойства МСК, мы проанализировали влияния суммарных продуктов секреции МСК (кондиционированной этими клетками среды), культивированных в условиях, моделирующих гипер- и нормогликемию, на формирование капилляроподобных структур ЭК *in vitro*. Было показано, что кондиционированная среда МСК-ЖТ, культивированных при 25 мМ глюкозы в 3 раза хуже стимулировала формирование сосудистых структур *in vitro*, чем среда МСК-ЖТ, культивированных при 5,5 мМ глюкозы [3].

Рисунок 11 показывает, что суммарная длина капилляроподобных структур, сформированных ЭК в присутствии кондиционированной среды МСК-ЖТ, культивируемых в условиях 25 мМ глюкозы, составила $5,3 \pm 0,9$ ОЕ, по сравнению с $15,3 \pm 2,2$ ОЕ, формирующихся в присутствии кондиционированной среды клеток, культивированных при 5,5 мМ глюкозы ($n=9$; $p=0,001$) [3].

Таким образом, длительное культивирование МСК-ЖТ при повышенной концентрации глюкозы, подавляет способность продуктов секреции этих клеток стимулировать ангиогенез [3].

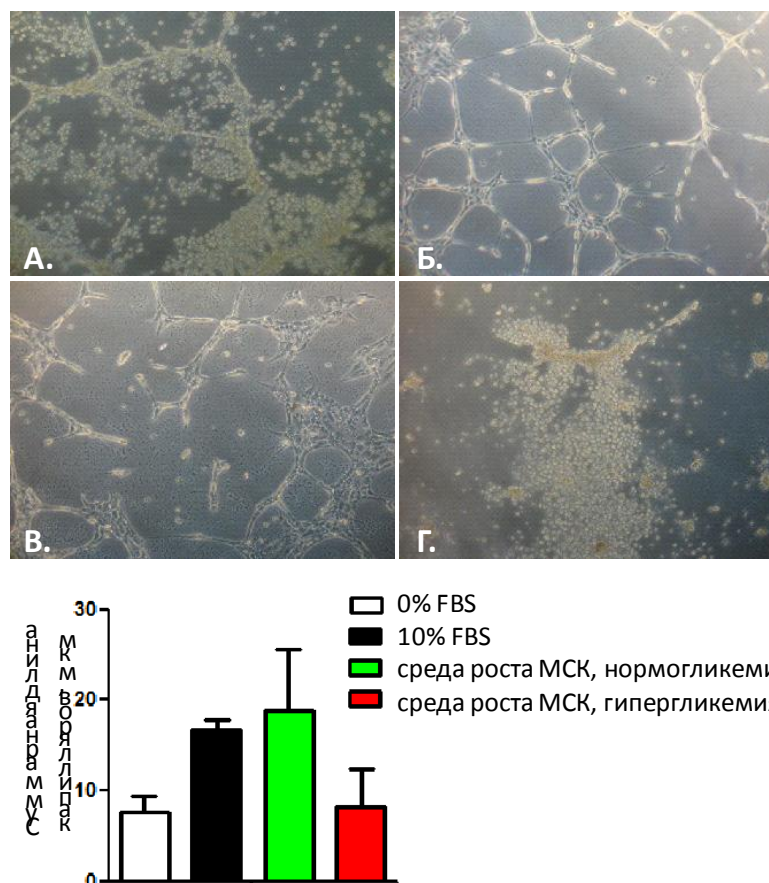


Рисунок 11 – Образование капилляроподобных структур ЭК под влиянием кондиционированной среды МСК [3]. А - Г. - Репрезентативные микрофотографии капилляров, сформированных ЭК на Матригеле. А. – Капилляры, образованные ЭК, в отсутствии FBS. Б. – Капилляры, образованные ЭК, в присутствии 10% FBS. В. – Капилляры, образованные ЭК, под действием кондиционированной среды МСК, выращенных в условиях нормальной концентрации глюкозы 5,5 мМ. Г. - Капилляры, сформированные ЭК, под действием кондиционированной среды МСК, выращенных в условиях повышенной концентрации глюкозы 25 мМ. Фазовый контраст, об. x10. Результаты морфометрического анализа суммарной длины капилляроподобных структур суммированы на диаграмме

3.1.6. Влияние гипергликемии на экспрессию факторов, регулирующих ангиогенез

Для исследования возможного механизма, посредством которого культивирование МСК-ЖТ в условиях, моделирующих гипергликемию, приводило к снижению способности продуктов секреции этих клеток стимулировать ангиогенез, был проведен анализ экспрессии 84 генов, кодирующих известные регуляторы ангиогенеза. Оказалось, что МСК-ЖТ, культивируемые при нормальной концентрации глюкозы, экспрессируют такие стимуляторы ангиогенеза как PIGF, VEGF-C, bFGF, IGF1, IL-6, IL-8, мидкин и TGF-бета1, (рисунок 12). Эти клетки также содержали мРНК ингибиторов ангиогенеза, таких как тканевые ингибиторы металлопротеаз 1 и 2, а также тромбоспондины 1 и 2. Из генов, регулирующих обмен белков внеклеточного матрикса, МСК наиболее выражено экспрессировали матриксные металлопротеазы 2 и 9, а также урокиназу [3].

Повышенная концентрация глюкозы 25 мМ вызвала изменения экспрессии 19 из 84 проанализированных генов (22%) ($p \leq 0,1$ по сравнению с нормогликемией); из них экспрессия 13 генов была повышена, и 6 - подавлена, (рисунок 13). В частности, культивирование МСК-ЖТ в условиях, моделирующих гипергликемию, вызывало повышение экспрессии тканевого ингибитора металлопротеаз -3 (в 2,6 раза; $p=0,03$ по сравнению с нормогликемией) при тенденции к снижению экспрессии металлопротеазы 9 (в 2,4 раза; $p=0,1$ по сравнению с нормогликемией). В тоже время, в условиях повышенной концентрации глюкозы в МСК повышалась экспрессия и некоторых стимуляторов ангиогенеза, таких, как ангиопоэтины (ангиопоэтин-2 (ANGPT2), ангиопоэтинподобный фактор 3 (ANGPTL3) и ангиопоэтинподобный фактор 4 (ANGPTL4), aFGF и лептин (рисунок 12) [3].

Мы также обнаружили, что культивирование при повышенной концентрации глюкозы стимулирует экспрессию плазминогена, цинк-зависимой металлопротеазы APN, транскрипционного фактора HAND2 и

нейропилинов 1 и 2. Однако, экспрессия других проангиогенных факторов роста или ингибиторов ангиогенеза существенно не изменялась (рисунок 12) [3].

Ген	Белок	Экспрессия, среднее ^a	Различие в экспрессии, раз ^c	SD различия ^c	p ^c
<u>Ангиопоэтины</u>					
ANGPT1	Ангиопоэтин 1	0.224	1.36	0.66	0.49
ANGPT2	Ангиопоэтин 2	0.350	1.83	0.41	0.1
ANGPTL 3	Ангиопоэтин - подобный 3	0.017	1.74	0.62	0.05
ANGPTL 4	Ангиопоэтин –подобный 4	0.471	1.55	0.37	0.03
<u>Факторы семейства VEGF</u>					
FIGF	Фактор роста эндотелия сосудов D	0.049	1.13	0.41	1
<u>PGF</u>	Плацентарный фактор роста	1.291	1.08	0.29	0.7
VEGFA	Фактор роста эндотелия сосудов A	0.946	0.90	0.29	0.7
<u>VEGFC</u>	Фактор роста эндотелия сосудов C	24.434	1.04	0.93	0.2
<u>Прочие</u>					
BAI1	Ингибитор ангиогенеза, специфичный для мозга 1	0.068	0.58	0.26	0.2
EGF	Эпидермальный фактор роста	0.277	0.54	0.15	0.2
EREG	Эпирегулин	0.055	1.56	1.45	0.7
FGF1	Фактор роста фибробластов 1	0.219	1.55	0.14	0.03
<u>FGF2</u>	Фактор роста фибробластов 2	36.700	1.40	0.46	0.7

IFNA1	Интерферон, альфа 1	0.129	1.29	0.18	0.2
IFNB1	Интерферон, бета 1	0.182	1.04	0.12	1
IFNG	Интерферон, гамма				
<u>IGF1</u>	Инсулино-подобный фактор роста	2.625	0.54	0.24	0.2
IL1B	Интерлейкин 1,бета	0.175	1.54	1.74	0.7
<u>IL6</u>	Интерлейкин 6	60.079	1.26	0.31	0.2
<u>IL8</u>	Интерлейкин 8	17.684	1.34	0.78	0.49
HGF	Фактор роста гепатоцитов	0.157	1.06	0.35	0.89
PDGFA	Фактор роста тромбоцитов, альфа	0.134	0.85	0.10	0.2
LEP	Лептин	0.044	2.60	1.04	0.03
<u>MDK</u>	Мидкин	1.811	0.84	0.17	0.49
PF4	Тромбоцитарный фактор 4	0.533	0.97	0.38	1
TGFA	Трансформирующий фактор роста альфа	0.277	1.48	0.89	0.49
<u>TGFB1</u>	Трансформирующий фактор роста бета1	36.430	0.63	0.16	0.2
<u>TGFB2</u>	Трансформирующий фактор роста бета 2	0.756	1.24	0.70	1
<u>TNFAIP 2</u>	Белок, индуцируемый фактором некроза опухолей альфа	3.750	0.95	0.11	0.7
TNF	Фактор некроза опухолей	0.067	2.64	1.11	0.03

Рисунок 12 – Изменение экспрессии генов факторов роста и цитокинов, вовлеченных в регуляцию ангиогенеза в МСК при длительном культивировании в условиях гипергликемии (25 мМ). ^a - Среднее уровня экспрессии, нормированное по уровню экспрессии 4 генов домашнего хозяйства (B2m, Rpl13a, G3pd and Ps1tp5bp1), умноженное на 1000, т.е. $1000/2\text{Среднее } \Delta\text{Ct}$. ^c – Значения медианы, стандартного отклонения и уровня значимости наблюдаемых различий между экспрессией в МСК, культивированных в условиях нормо- и гипергликемии, вычислено по методу, опубликованному Yuan et al. [1, 3]. Гены, экспрессия которых увеличивалась при гипергликемии, выделены красным. Аббревиатуры наиболее представленных генов выделены полужирным шрифтом и подчеркиванием [3].

На рисунке 13 представлено изменение экспрессии генов, вовлеченных в регуляцию процессов ангиогенеза (за исключением факторов роста и цитокинов) в МСК при длительном культивировании в условиях гипергликемии (25 мМ).

Ген	Белок	Экспрессия, среднее ^a	Различие в экспрессии, раз ^c	SD различия ^c	p ^c
<u>Мембранные рецепторы</u>					
CDH5	Кадгерин эндотелия сосудов	0.081	0.91	0.36	0.89
EFNA1	Эфрин-A1	0.203	1.27	0.52	0.49
EFNA3	Эфрин-A3	0.407	1.12	0.49	0.89
EFNB2	Эфрин-B2	0.055	1.02	0.55	0.7
<u>ENG</u>	Эндоглин	69.997	1.41	0.61	0.2
EPHB4	Эфриновый рецептор B4	0.426	0.54	0.16	0.03
FGFR3	Рецептор фактора роста фибробластов 3	0.051	1.16	0.39	0.7
<u>ITGAV</u>	Интегрин, альфа V	51.579	0.82	0.10	0.05
ITGB3	Интегрин, бета 3	0.195	1.04	0.32	1
<u>JAG1</u>	Джаггед 1	2.489	1.23	0.21	0.35
KDR	Рецептор со вставкой в киназном домене	0.059	1.61	0.71	0.7
<u>NRP1</u>	Нейропилин 1	35.788	1.35	0.27	0.05
<u>NRP2</u>	Нейропилин 2	2.341	1.39	0.09	0.1
PECAM1	Молекула адгезии тромбоцитов и эндотелия	0.243	1.25	0.13	0.2
<u>PLXDC1</u>	Плексин-домен содержащий, 1	2.290	0.73	0.13	0.05
S1PR1	Рецептор сфингозин-1 фосфата	0.498	1.16	0.13	0.05

<u>TGFB1</u>	Рецептор трансформирующего фактора роста бета 1	13.899	1.09	0.31	1
<u>Обмен матрикса</u>					
<u>ANPEP</u>	Аланил-аминопептидаза	38.582	1.56	0.27	0.03
COL18A1	Коллаген, тип XVIII, альфа 1	0.117	0.56	0.27	0.2
COL4A3	Коллаген, тип IV, альфа 3	0.101	0.55	0.13	0.1
LAMA5	Ламинин, альфа 5	0.615	1.02	0.16	0.69
<u>MMP2</u>	Матриксная металлопротеиназа 2	260.638	1.01	0.11	0.67
<u>MMP9</u>	Матриксная металлопротеиназа 9	3.599	0.42	0.08	0.1
<u>PLAU</u>	Урокиназа	2.623	0.84	0.12	0.2
<u>PLG</u>	Плазминоген	0.052	1.88	0.38	0.03
<u>SERPINF</u>	Альфа-2 антиплазмин 1	28.681	0.87	0.25	0.7
<u>STAB1</u>	Стабилин 1	1.595	0.88	0.06	0.1
<u>THBS1</u>	Тромбоспондин 1	57.591	0.93	0.10	0.7
<u>THBS2</u>	Тромбоспондин 2	25.019	1.09	0.10	0.67
<u>TIMP1</u>	Тканевой ингибитор металлопротеиназ 1	1761.787	1.16	0.15	0.2
<u>TIMP2</u>	Тканевой ингибитор металлопротеиназ 2	224.918	0.95	0.19	1
<u>TIMP3</u>	Тканевой ингибитор металлопротеиназ 3	0.041	2.60	0.71	0.03
<u>Хемокины</u>					
CCL11	Хемокин (C-C), 11	0.309	0.33	0.28	0.2

<u>CCL2</u>	Хемокин (C-C) , 2	1.200	1.78	1.17	0.5
<u>CXCL1</u>	Хемокин (C-X-C), 1	7.599	0.90	0.59	0.89
<u>CXCL5</u>	Хемокин (C-X-C), 5	1.200	1.69	1.27	0.49
<u>CXCL6</u>	Хемокин (C-X-C), 6	0.244	0.60	0.38	1

Факторы транскрипции (ФТ)

<u>HAND2</u>	ФТ, экспрессированный в производных сердца и нейрального гребня, 2	4.941	1.29	0.26	0.057
---------------------	--	-------	------	------	-------

<u>HIF1A</u>	Фактор, индуцируемый гипоксией, 1 альфа	481.727	1.13	0.11	0.2
<u>ID1</u>	Ингибитор связывания ДНК,1	41.608	1.09	0.31	0.89
<u>ID3</u>	Ингибитор связывания ДНК,3	0.341	0.89	0.40	0.7

Ферменты

<u>HPSE</u>	Гепариназа	0.838	1.03	0.19	1
<u>PTGS1</u>	Простагландин G/H синтаза	5.281	0.52	0.21	0.2
<u>SPHK1</u>	Сфингозин киназа 1	2.644	1.32	0.24	0.2
<u>TYMP</u>	Тимидин фосфорилаза	4.581	0.95	0.15	1
<u>AKT1</u>	Гомолог вирусного онкогена тимомы мыши	3.060	0.99	0.24	1

Рисунок 13 – Изменение экспрессии генов, вовлеченных в регуляцию ангиогенеза (за исключением факторов роста и цитокинов) в МСК при длительном культивировании в условиях гипергликемии (25 мМ). ^a - Среднее уровня экспрессии, нормированное по уровню экспрессии 4 генов домашнего хозяйства (B2m, Rpl13a, G3pd and Ps1tp5bp1), умноженное на 1000, т.е. $1000/2\text{Среднее } \Delta\text{Ct}$. ^c – Значения медианы, стандартного отклонения и уровня значимости наблюдаемых различий между экспрессией в МСК, культивированных в условиях нормо- и гипергликемии, вычислено по методу, опубликованному Yuan et al., [1, 3]. Гены, экспрессия которых возрастала при гипергликемии, выделены красным. Гены, экспрессия которых снижалась при гипергликемии, выделены зеленым. Аббревиатуры наиболее представленных генов выделены полужирным шрифтом и подчеркиванием [3].

Эти данные указывают на то, что в условиях повышенной концентрации глюкозы в МСК-ЖТ изменяется экспрессия комплекса генов, продукты которых участвуют в регуляции роста и ремоделирования кровеностных сосудов. Возможно, что наблюдаемое подавление ангиогенных свойств кондиционированной среды МСК обусловлено влиянием повышенной концентрации глюкозы на экспрессию и секрецию комплекса факторов, участвующих в регуляции ангиогенеза [3].

3.2. Влияние липопротеидов низкой плотности *in vitro* на мезенхимальные стромальные клетки

Для практической медицины, в частности, для применения МСК в качестве терапевтических средств важной является проблема "старения" МСК и возможное нарушение их свойств вследствие развития заболеваний у пациента. Так, например, при ишемической болезни сердца в крови и тканях изменяется содержание многих продуктов метаболизма (глюкозы, липидов, про- и антиоксидантов и др.). К числу факторов риска, которые действуют в течение многих лет, можно отнести липопротеиды низкой плотности (ЛПНП) [22].

При хроническом циркулировании в крови они подвергаются модификации за счет образования клетками свободных радикалов и продуктов перекисного окисления липидов, а также вследствие повышенной концентрации в крови и межклеточной жидкости ряда ферментов и некоторых метаболитов. Так, например, установлено, что глюкоза инициирует атерогенную окислительную модификацию ЛПНП *in vitro* и у больных сахарным диабетом 2 типа [270, 244, 210]. Обнаружено, что нормализация уровня глюкозы крови у этих больных в процессе сахароснижающей терапии сопровождается существенным снижением окисленности ЛПНП. Окисленные ЛПНП депонируют холестерин и другие липиды в стенках сосудов, в клетках крови, что вызывает мозаичные повреждения сосудов [22].

Установлено, что уровень окисленных ЛПНП, циркулирующих в крови, является независимым предиктором ишемической болезни сердца. Так уровень циркулирующих окисленных ЛПНП в концентрации от 6 до 14 мкг/мл является предиктором субклинического атеросклероза, а уровень циркулирующих окисленных ЛПНП в концентрации от 13 до 75 мкг/мл документирован для лиц с выраженным атеросклеротическим поражением сосудов и тяжелой ИБС [11].

Вопрос о том, какова концентрация окисленных ЛПНП в тканях и стенке сосудов, остается не выясненным. Несмотря на то, что взаимосвязь между уровнем липопротеидов плазмы крови и развитием атеросклероза была установлена достаточно давно, механизмы влияния окисленных ЛПНП на атерогенез до конца не ясны [22].

За последние годы накопились данные, указывающие, что атерогенез представляет собой не пассивное отложение липидов в стенке сосудов, а является активным процессом, в который одновременно вовлечены несколько типов резидентных и пришедших из крови клеток, связанных между собой паракриной регуляцией (эндотелиальные клетки, перициты, фибробласты, гладкомышечные клетки, моноциты, тромбоциты, эритроциты). Тем не менее, сведения о влиянии окисленных ЛПНП на прогениторные клетки крайне немногочисленны и неоднозначны. Влияние окисленных ЛПНП на МСК ЖТ не изучено совсем [22].

В этой части работы мы исследовали влияние нативных и окисленных ЛПНП на МСК с целью поиска новой клеточной мишени повреждающего действия факторов риска развития атеросклероза [22].

Эксперименты проводили как в условиях без депривации (в присутствии 10% stem cell growth supplement), моделируя *in vitro* условия, в которых функционируют нативные и окисленные ЛПНП *in vivo* (рисунок 14А), так и в условиях депривации МСК (0% stem cell growth supplement) (рисунок 14Б). Было обнаружено, что в условиях без депривации нативные ЛПНП не оказывают влияния на жизнеспособность МСК, а окисленные ЛПНП на 30-35%

уменьшают количество живых клеток в культуре по данным цитофлюориметрии (рисунок 14А). Наблюдаемое снижение жизнеспособности МСК, вероятно, обусловлено цитотоксическим эффектом окисленных ЛПНП, что документировано и для других типов клеток [11, 12]. При культивировании МСК в среде без сыворотки (0% stem cell growth supplement) действие нативных и окисленных ЛПНП на живые клетки также различалось (рисунок 14Б) [22].

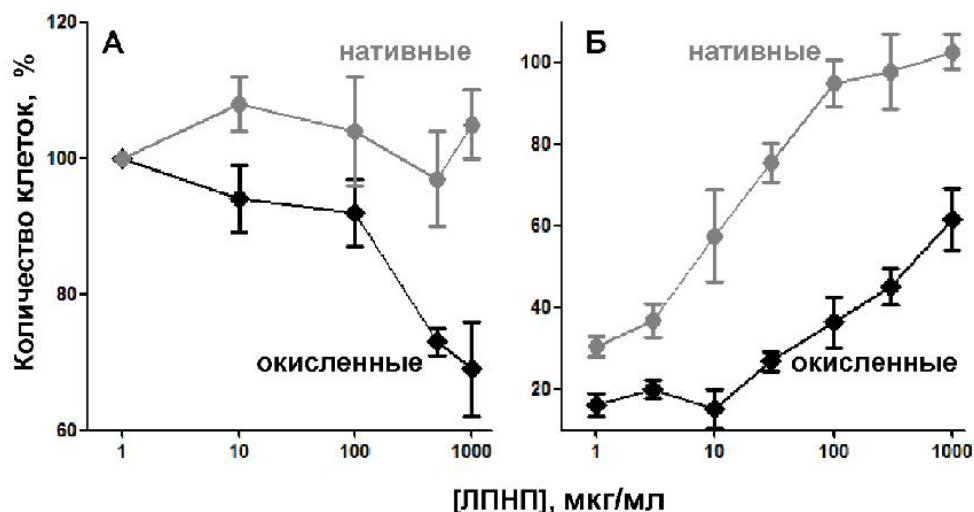


Рисунок 14 – Влияние нативных (1) и окисленных (2) ЛПНП на количество живых клеток в культуре в условиях без депривации (А) и в условиях депривации (Б). Данные представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение [22]

Обнаружено, что нативные ЛПНП повышают жизнеспособность клеток. Этот эффект называют "сывороткоподобным" или "нутритивным". Окисленные ЛПНП показывают подобный же эффект, но в существенно больших концентрациях, чем нативные ЛПНП. Поскольку мы применяли ЛПНП, окисленные методом автоокисления, т.е. частичное окисление ЛПНП, то проявляется, по-видимому, их двойное действие - как нутритивное, характерное для нативных ЛПНП, так и токсическое, характерное для окисленных ЛПНП [22].

Полученные результаты свидетельствуют о том, что МСК-ЖТ могут являться мишенями для повреждающего действия окисленных ЛПНП. Учитывая, что МСК имеют перицитарный фенотип и многие свойства перицитов, полученные данные могут отражать повреждающее действие окисленных ЛПНП на перициты сосудистой стенки. С другой стороны, если рассматривать МСК-ЖТ в качестве "инструмента" для клеточной терапии сердечно-сосудистых заболеваний, то действие окисленных ЛПНП на эти клетки может способствовать снижению терапевтического потенциала МСК-ЖТ у больных ишемической болезнью и другими сердечно-сосудистыми заболеваниями с гиперлипидемией. Окисленные ЛПНП, содержание которых в плазме крови больных, страдающих гиперлипидемией, повышено, могут снижать содержание МСК в тканях, а также влиять на перициты в стенках сосудов, тем самым ослабляя их участие в процессах регенерации/репарации [22].

Резюме

В этой части работы мы изучали влияние метаболических нарушений (гипергликемии и гиперлипидемии *in vitro*) на мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, участвующие в росте и обновлении кровеносных сосудов.

Мы установили, что высокая концентрация глюкозы (25мМ) не оказывает влияния на пролиферацию и жизнеспособность МСК. При анализе влияния продолжительной инкубации в условиях повышенной концентрации глюкозы в среде роста на миграцию МСК, активированную PDGF-BB, мы обнаружили некоторую тенденцию к подавлению миграционной активности этих клеток, тогда как в работах других авторов было показано, что высокая концентрация глюкозы может стимулировать миграцию гладкомышечных клеток стенки кровеносных сосудов по градиенту PDGF-BB и это, вероятно, опосредовано повышением активности протеинкиназы C в данных клетках [159].

Мы обнаружили, что инкубация в течение 10-12 дней в среде, содержащей 25 мМ глюкозы, подавляет способность продуктов секреции МСК стимулировать ангиогенез. При этом наблюдаемое подавление формирования капилляров под действием кондиционированной среды МСК, культивируемых в условиях гипергликемии, не могло быть обусловлено влиянием повышенной концентрацией глюкозы на сами эндотелиальные клетки, поскольку конечная концентрация глюкозы при разбавлении концентрированной гипергликемической среды и добавлении ее к эндотелиальным клеткам составила 5,125 мМ [3].

Полученные данные свидетельствуют о том, что основным механизмом, подавления ангиогенных свойств МСК в условиях высокой концентрации глюкозы, является изменение экспрессии комплекса генов - активаторов и ингибиторов ангиогенеза. По данным количественной ПЦР длительная инкубация при 25 мМ глюкозы вызывала изменения экспрессии около 20% исследованных генов, которые вовлечены в регуляцию процессов ангиогенеза. Ранее было показано, что высокая концентрация глюкозы влияет на экспрессию факторов, регулирующих ангиогенез, включая лептин, bFGF и ангиопоэтин в эндотелиальных и гладкомышечных клетках [191, 271, 378]. Это хорошо согласуется с нашими данными о том, что уровень мРНК лептина, bFGF и ангиопоэтина повышен в МСК, культивируемых в условиях повышенной концентрации глюкозы. Высокая концентрация глюкозы может влиять на экспрессию генов посредством активации различных путей внутриклеточной сигнализации, включая мобилизацию внутриклеточного Ca^{2+} [271] и повышение продукции супероксид аниона NADPH-оксидазами. Так, в микрососудистом эндотелии почек повышение входа глюкозы в клетку вызывало повышение экспрессии ангиопоэтина посредством образования метилглиоксала [3]. Такое увеличение экспрессии ангиопоэтина-2 повышало чувствительность микрососудистых эндотелиальных клеток к провоспалительному действию TNF- α [200, 229]. Одновременное повышение

экспрессии TNF- α и ангиопоэтина-2, ангиопоэтиноподобного фактора-3 и ангиопоэтиноподобного фактора 4 в МСК, культивируемых в среде с высоким содержанием глюкозы, может, стимулировать апоптоз ЭК и объяснять подавление формирования капилляров. Более того, глюкоза может влиять на продукцию и активацию секретируемых факторов. Например, высокая концентрация глюкозы влияет на экспрессию мРНК тромбоспондина [3]. Кроме того, мы показали, что высокая концентрация глюкозы подавляет экспрессию MMP9 мРНК и стимулирует экспрессию TIMP3. Поскольку ангиогенные факторы роста, такие как TGF β и HGF, секретируются в неактивной форме и требуют протеолитической активации, снижение внеклеточного протеолиза за счет повышенной секреции PAI-1 в условиях повышенной концентрации глюкозы может подавлять ангиогенную активность продуктов секреции МСК-ЖТ [3].

Длительная инкубация МСК в условиях, моделирующих гипергликемию, вызвала одновременное снижение экспрессии металлопротеазы 9 и повышение экспрессии тканевого ингибитора металлопротеазы 3, что также может способствовать снижению ангиогенных свойств кондиционированной среды МСК ЖТ. Таким образом, повышенная концентрация глюкозы оказывает комплексное влияние на регуляцию экспрессии генов в клетках сосудистой стенки, может обуславливать изменение секреторного профиля этих клеток [3].

Поскольку подавление ангиогенной активности МСК-ЖТ может быть обусловлено изменением продукции ими факторов, регулирующих ангиогенез, перспективной может быть разработка подходов к использованию генетической модификации аутологичных МСК, повышающей их ангиогенные свойства, для терапии ишемических заболеваний [50]. Кроме того, в настоящее время разрабатываются различные подходы для стимуляции "терапевтических свойств" клеток с помощью предтрансплантационного прекондиционирования [385]. В ряде работ, включая и наши собственные исследования, было показано, что гипоксия стимулирует экспрессию и секрецию многих факторов роста, что

приводит к повышению способности МСК стимулировать регенерацию тканей. Помимо гипоксического preconditionирования, было также предложено обрабатывать МСК перед трансплантацией различными факторами роста, включая PDGF-BB и TGF-бета [162, 194].

Дополнительным фактором, который может влиять на функции МСК у больных ИБС могут быть нарушения липидного обмена. В нашей работе впервые продемонстрировано влияние дислипидемии *in vitro*, а именно, окисленных липопротеидов низкой плотности здоровых доноров на жизнеспособность мезенхимных прогениторных клеток. Мы обнаружили, что окисленные ЛПНП в условиях без депривации МСК-ЖТ, то есть, в условиях, приближенных к физиологическим, дозозависимо проявляют токсический эффект, уменьшают количество живых клеток, тогда как нативные ЛПНП не изменяют их числа. В условиях депривации, то есть, в условиях, моделирующих "голод" окисленные ЛПНП подобно нативным ЛПНП демонстрируют "нутритивный" эффект, повышая количество живых МСК.

В отдельных экспериментальных исследованиях показано, что окисленные ЛПНП в концентрации от 1 до 10 мкг/мл оказывают токсическое влияние на циркулирующие прогениторные клетки *in vitro*. При этом апоптоз ЦПК (5-10%) индуцировался в концентрации окисленных ЛПНП 25 мкг/мл и выше. Воздействие окисленных ЛПНП в концентрации 100 мкг/мл способствовало на 50% снижению культивируемых ЦПК [384]. Однако, более низкие концентрации окисленных ЛПНП (5 мкг/мл) напротив, стимулируют формирование тубулярных структур культивируемыми ЦПК. Полагают, что данный эффект опосредован активацией eNOS [379, 393].

В одной из экспериментальных работ показано, что инкубация ЦПК в присутствии 25 мкг/мл и более окисленных ЛПНП в течение 48 часов стимулирует апоптоз, уменьшает способность клеток к миграции и адгезии на фибронектин, способствует дозо-зависимому нарушению тубулогенеза ЦПК *in vitro* [237]. Этой же группой исследователей, было продемонстрировано, что

культивирование ЦПК в присутствии 50 мкг/мл окисленных ЛПНП в течение 48 часов увеличивает до 100% как уровень белка LOX-1, так и количество мРНК рецептора ЛПНП LOX-1. Авторы сделали вывод, что нарушение функциональных характеристик ЦПК обусловлено прямым действием окисленных ЛПНП посредством LOX-1 рецептора [237].

Однако, в клиническом исследовании Watt et al. с участием 33 больных со стабильной ИБС была продемонстрирована прямая корреляционная взаимосвязь окисленных ЛПНП плазмы с повышенным количеством ЦПК ($CD34^+/KDR^+$ $r=0,46$, $p=0,02$). Полагают, что это может отражать компенсаторную реакцию в ответ на постоянно присутствующую эндотелиальную дисфункцию у больных стабильной ИБС и увеличение ЦПК может временно улучшить функцию эндотелия [384].

Не исключено, что окисленные ЛПНП, содержание которых в плазме крови больных ИБС и сопутствующей гиперлипидемией повышено, могут снижать содержание МСК в тканях, а также в стенках сосудов, тем самым ослабляя их регенеративный потенциал.

Дальнейшие исследования, направленные на изучение функциональных характеристик МСК при действии дислипидемии и других обменных нарушений (гиперинсулинемии, гипергомоцистеинемии, гиперурикемии и др.) позволят расширить наши представления о влиянии традиционных факторов риска сердечно-сосудистых заболеваний с позиции регенеративных процессов у больных ИБС и диабетом.

ГЛАВА 4

РЕГЕНЕРАТИВНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК СОСУДОВ У БОЛЬНЫХ ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА И СОПУТСТВУЮЩИМ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2 ТИПА

На предыдущих этапах данного исследования мы обнаружили, что гипергликемия *in vitro* уменьшает ангиогенные свойства МСК-ЖТ, что в определенной степени обусловлено изменением экспрессионного профиля генов ангиогенных и антиангиогенных факторов роста.

Принимая во внимание тот факт, что диабет это не только нарушение углеводного обмена, но и заболевание, которое на сегодняшний день является эквивалентом сердечно-сосудистой патологии, мы поставили перед собой задачу оценить возможности репарации сосудов у данной категории пациентов, поскольку именно ангиопатия лежит в основе всех сердечно-сосудистых осложнений СД2. Сведения о том, как изменяется клеточное звено системы регенерации (функциональные характеристики прогениторных клеток) на фоне метаболических факторов риска и хронических заболеваний, таких как ИБС и сахарный диабет, ограничены [345] и требуют дополнительных исследований.

Учитывая, что регенеративный потенциал сосудов во многом определяется прогениторными клетками, во второй части нашей работы мы исследовали функциональные характеристики мезенхимальных клеток жировой ткани, которые в настоящее время являются перспективными для аутологичной клеточной терапии заболеваний ишемической этиологии, а больные СД2 и сердечной недостаточностью являются потенциальными кандидатами для подобного лечения.

4.1. Особенности функциональных характеристик мезенхимальных стромальных клеток у больных ишемической болезнью сердца и сопутствующим сахарным диабетом 2 типа

4.1.1. Клинико-демографическая характеристика больных ишемической болезнью сердца и сопутствующим сахарным диабетом 2 типа

Клинико-демографическая характеристика групп пациентов для данной части работы представлена в таблице 4.

4.1.2. Функциональная активность мезенхимальных стромальных клеток у больных ишемической болезнью сердца и сопутствующим сахарным диабетом 2 типа

Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (МСК) жировой ткани (ЖТ) являются малодифференцированными прогениторными клетками, по своему фенотипу и дифференцировочным способностям сходными с МСК костного мозга.

Адекватная функциональная активность прогениторных клеток необходима для нормального роста и функционирования кровеносных сосудов. Однако, наличие хронической патологии, метаболические нарушения, включая гипергликемию, могут отрицательно влиять на "терапевтические" свойства этого типа клеток [192, 196, 219, 340].

4.1.2.1. Иммунофенотип мезенхимальных стромальных клеток у больных ишемической болезнью сердца и сопутствующим сахарным диабетом 2 типа

Для всех экспериментов были использованы МСК ЖТ 2-3 пассажа, изолированные у больных ИБС и СД2.

Методом проточной цитофлюориметрии было показано, что все анализируемые образцы клеток экспрессировали маркеры CD73 (>85%) и CD

105 (>95%), а также CD 14 (<10%), CD19 (<10%), CD34 (<5%), CD 45 (<1%), CD79 (<10%). Кроме этого, анализируемые клетки экспрессировали маркер перицитов NG2 (>95%) и PDGFRB (>80%). Таким образом, было показано, что стромальные клетки жировой ткани, согласно критериям Международного общества по клеточной терапии, соответствуют мезенхимным стромальным клеткам. [16].

4.1.2.2. Пролиферативная активность мезенхимальных стромальных клеток у больных ишемической болезнью сердца и сопутствующим сахарным диабетом 2 типа

При оценке пролиферативной активности МК-ЖТ было показано, что клетки, изолированные от больных ИБС и ИБС, в сочетании с СД2 в сравнении с клетками, изолированными от относительно здоровых добровольцев (контроль) пролиферируют значительно больше (рисунок 15А).

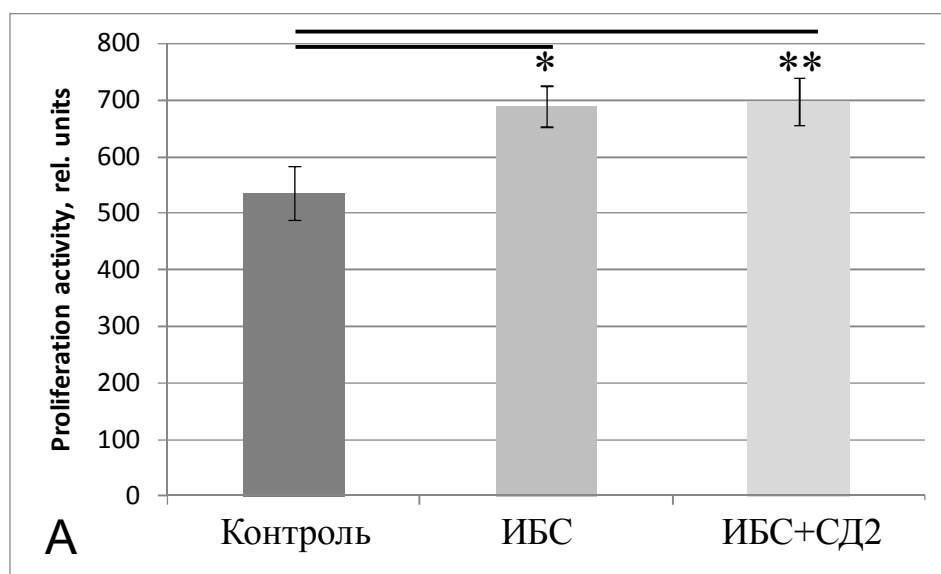


Рисунок 15А – Пролиферативная активность МСК ЖТ [130].

Данные представлены как $M \pm SEM$, * $p=0,048$; ** $p=0,046$

Известно, что пролиферативная активность клеток тесно связана с длиной теломер и теломеразной активностью. В нашем исследовании было обнаружено, что относительная длина теломер у больных ИБС и ИБС, в

сочетании с СД2 значительно меньше, чем у лиц контрольной группы (рисунок 15B).

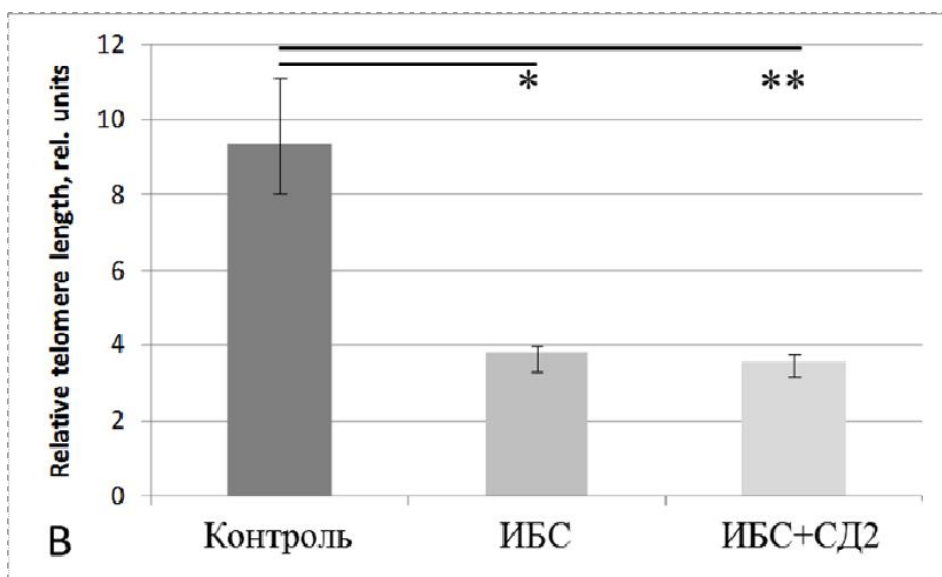


Рисунок 15B – Относительная длина теломер МСК-ЖТ (данные представлены как медиана и 25% и 75% перцентили, * $p < 0,0001$, ** $p = 0,0004$) [130]

При оценке теломеразной активности оказалось, что активность теломеразы МСК ЖТ во всех исследуемых образцах была в 5 раз ниже, чем в клетках линии HeLa, при этом между группами больных статистически значимых различий обнаружено не было, что вероятно объясняется высокой вариабельностью между клеточными образцами. Взаимосвязи между активностью теломеразы и длиной теломер во всех исследуемых группах также обнаружено не было.

4.1.2.3 Ангиогенная активность мезенхимальных стромальных клеток у больных ишемической болезнью сердца и сопутствующим сахарным диабетом 2 типа

МСК-ЖТ продуцируют множество факторов роста, включая VEGF, bFGF, PDGF-BB, HGF и TGF β , которые стимулируют рост и созревание кровеносных сосудов [19, 134]. Благодаря этому МСК из жировой ткани являются перспективными кандидатами для разработки методов аутологичной клеточной

терапии при тяжелой ишемии тканей, включая ишемию конечностей у больных сахарным диабетом [136].

При оценке ангиогенной активности суммарных продуктов секреции МСК-ЖТ на модели формирования капилляроподобных структур эндотелиальными клетками (EA.hy926) на Матригеле, мы обнаружили, что кондиционированная среда МСК-ЖТ больных обеих групп, как больных ИБС ($p=0,03$), так и больных ИБС, в сочетании с СД2 ($p=0,017$) в сравнении с контрольной группой, в значительно меньшей степени стимулирует формирование трубочек (рисунок 16).

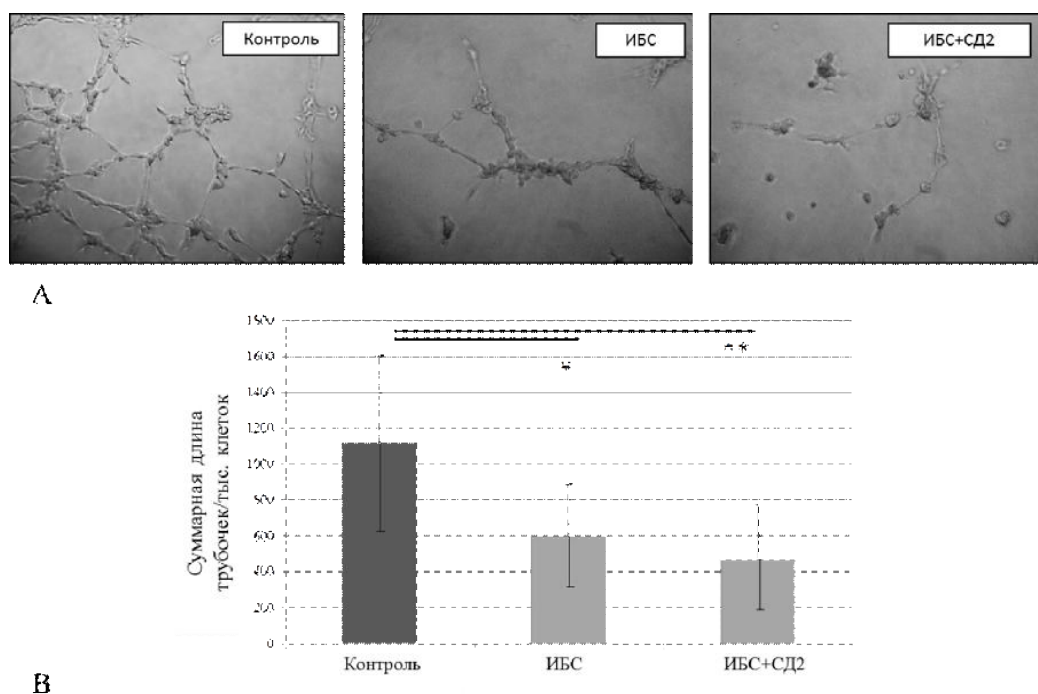


Рисунок 16 – Ангиогенная активность суммарных продуктов секреции МСК-ЖТ больных ИБС и диабетом 2 типа *in vitro* [130]. А. Репрезентативные микрофотографии образования тубулярных структур эндотелиальными клетками линии EA.hy926 на Матригеле в присутствии кондиционированной среды МСК-ЖТ лиц контрольной группы, больных ИБС и ИБС, сочетанной с СД2. В. Суммарная длина тубулярных структур для МСК-ЖТ, изолированных от лиц контрольной группы, больных ИБС и ИБС, сочетанной с диабетом 2 типа

Чтобы выяснить, какие ангиогенные факторы ответственны за снижение ангиогенной активности суммарных продуктов секреции МСК-ЖТ, методом real-time ПЦР мы провели анализ экспрессии целого ряда генов, вовлеченных в процесс ангиогенеза.

Оказалось, что экспрессия таких ключевых ангиогенных факторов роста как, VEGF, HGF, PlGF была повышена у больных ИБС и ИБС, в сочетании с диабетом в сравнении с контрольной группой (рисунок 17 А, В, С).

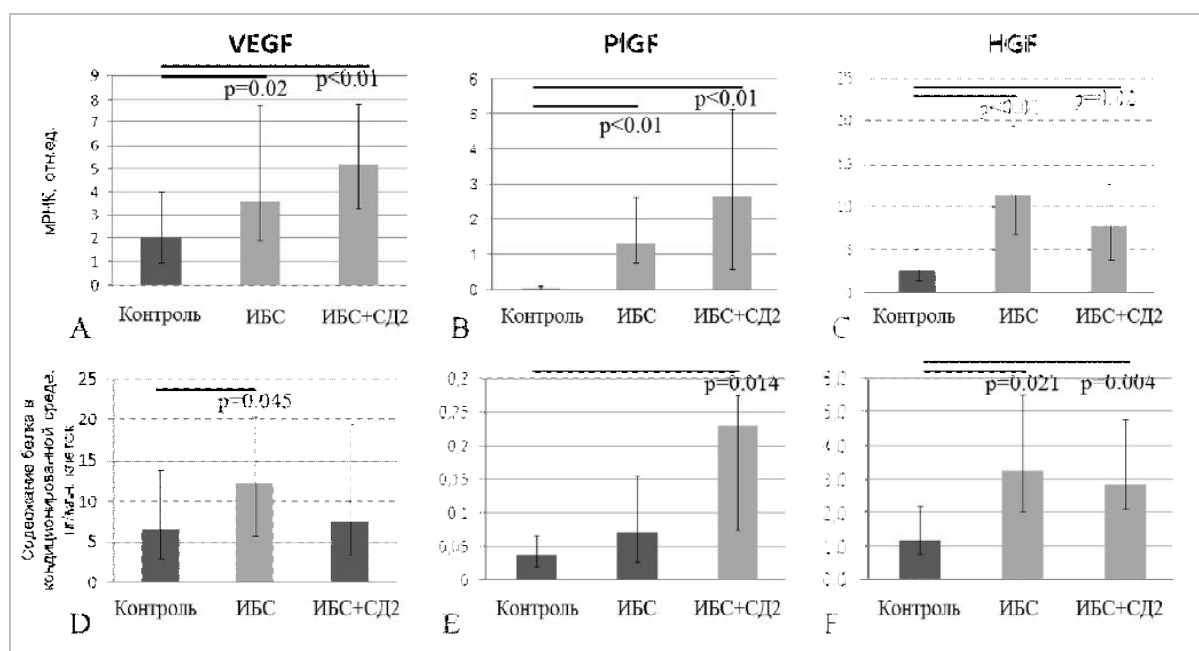


Рисунок 17 – Продукция проангиогенных факторов роста МСК-ЖТ, изолированных у больных ИБС и диабетом 2 типа [130]. (А-С) Экспрессия гена VEGF (А), PlGF (В) и HGF (С) в МСК ЖТ в исследованных группах, (мРНК, отн.ед.). (D-F). Концентрация VEGF (D), PlGF (E) и HGF (F) в кондиционированной среде МСК ЖТ в исследованных группах, нг/млн.клеток (данные представлены как медиана и перцентили (25%-75%))

В то же время, экспрессия основного фактора роста фибробластов (bFGF), ангиопоэтина-1 и ангиогенина в исследуемых группах не различалась.

Учитывая, что количество секретируемых факторов роста является одним из определяющих факторов паракринной активности МСК-ЖТ, мы оценили

накопление проангиогенных факторов роста в кондиционированной среде МСК-ЖТ, изолированных от больных исследуемых групп.

Анализ полученных результатов обнаружил, что МСК-ЖТ больных ИБС и больных ИБС в сочетании с СД2 в сравнении с МСК-ЖТ контрольной группой секретировали статистически значимо больше VEGF, HGF и PIGF (рисунок 17 D, E, F, таблица 6).

Таблица 6 – Количественное содержание ангиогенных факторов в кондиционированной среде МСК-ЖТ больных ИБС и диабетом 2 типа (нг/млн.клеток), ELISA

Фактор роста	Контроль n=19	ИБС n=32	ИБС+СД2 n=28	p-value
VEGF	6,55 (2,9-13,8)	12,3 (5,6-20,3)	7,52 (3,3-19,3)	*p=0,045
HGF	1,19 (0,76-2,2)	3,25 (2,0-5,5)	2,83 (2,12-4,75)	*p=0,021 **p=0,004
PIGF	0,04 (0,02-0,07)	0,07 (0,03-0,16)	0,24 (0,08-0,28)	**p=0,014
Angiogenin	1,62 (0,9-2,9)	1,8 (0,52-2,47)	0,74 (0,56-2,6)	NS
Angiopoetin	0,47 (0,15-0,9)	0,83 (0,28-1,7)	0,39 (0,18-0,67)	NS
PAI-1	40,06 (15,5-72,2)	224,17 (110,2-322,8)	142,22 (45,0-268,5)	*p=0,0013 **p=0,0053
THBS-1	169,06 (59,7-585,1)	151,99 (57,3-382,1)	254,4 (85,1-421,8)	NS

Примечание: *p-value для групп ИБС vs контроль; **p-value для групп ИБС+СД2 vs контроль; NS- статистически не значимо.

Что касается других анализируемых факторов, то количество ангиогенина, ангиопоэтина-1 в кондиционированной среде МСК-ЖТ исследуемых групп статистически значимо не различалось (таблица 6).

В поисках объяснения полученных противоречивых результатов, а именно, с одной стороны - снижение ангиогенной активности in vitro суммарных продуктов секреции МСК-ЖТ больных ИБС и ИБС, в сочетании с СД2, с другой - статистически значимо большее накопление основных

ангиогенных факторов в кондиционированной среде МСК-ЖТ исследуемых групп больных, чем в контроле (таблица 6), мы исходили из того, что процессы ангиогенеза и регенерации тканей в целом осуществляются благодаря балансу проангиогенных и антиангиогенных факторов.

Для этого мы оценили количественное содержание в кондиционированной среде МСК-ЖТ больных ИБС и диабетом таких антиангиогенных факторов, как эндостатин (ENDS) и тромбоспандин-1 (THBS-1). Было обнаружено, что количество мРНК тромбоспандина-1 в МСК-ЖТ больных ИБС и ИБС в сочетании с диабетом статистически значимо превосходило количество мРНК этого фактора в МСК ЖТ контрольной группы (рисунок 18).

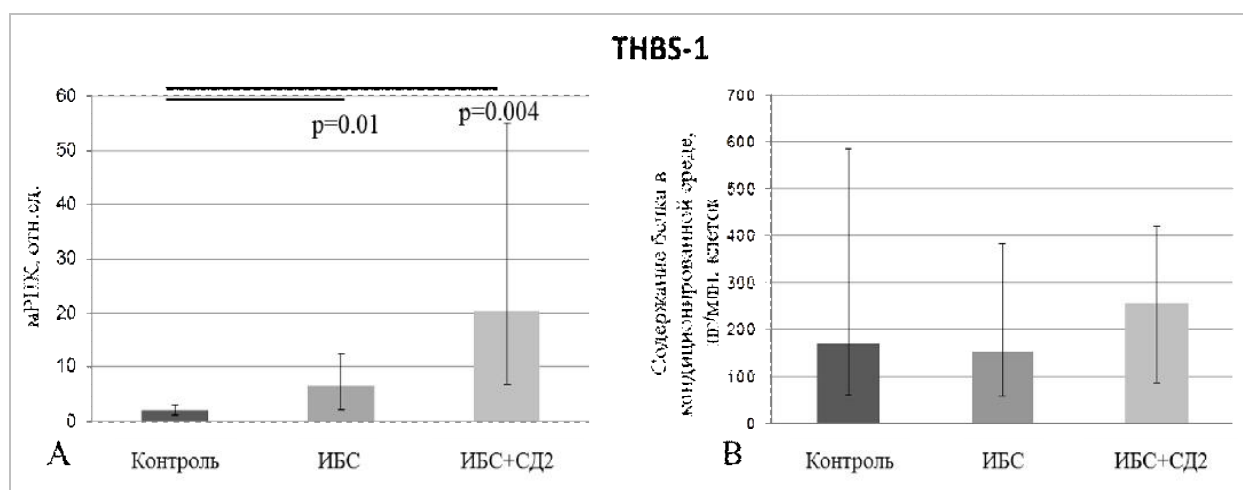


Рисунок 18 – Продукция тромбоспандина-1(THBS-1) в МСК-ЖТ больных исследуемых групп [130]. А. Экспрессия гена тромбоспандина-1 в МСК-ЖТ больных ИБС, ИБС, в сочетании с диабетом 2 типа и контрольной группы. В. Концентрация тромбоспандина-1 в кондиционированной среде МСК-ЖТ больных исследуемых групп (данные представлены как медиана и перцентили (25%-75%))

Однако, мы не обнаружили статистически значимых различий по уровню тромбоспандина в кондиционированных средах МСК-ЖТ исследуемых групп, (таблица 6, рисунок 18). В то же время, корреляционный анализ позволил

выявить обратную взаимосвязь между уровнем мРНК тромбоспандина-1 и ангиогенной активностью МСК-ЖТ по результатам оценки формирования тубулярных структур (для больных ИБС $r=-0,59$, $p=0,045$ и для больных ИБС в сочетании с диабетом 2 типа $r=-0,7$, $p=0,008$, соответственно).

При оценке мРНК эндостатина и секрети этого белка МСК-ЖТ статистически значимых различий в исследуемых группах получено не было.

4.1.2.4. Роль ингибитора активатора плазминогена-1 в регуляции ангиогенной активности мезенхимальных стромальных клеток у больных ишемической болезнью сердца и сопутствующим сахарным диабетом 2 типа

Известно, что помимо ангиогенных факторов роста, для адекватного ангиогенеза важным этапом в процессе регенерации тканей является ремоделирование внеклеточного матрикса (ВКМ). Ремоделирование ВКМ является координированным процессом направленной миграции клеток, их инкорпорации в формирующиеся сосуды и регулируется многими факторами, среди которых наибольшее значение имеют урокиназа (uPA) и ее рецептор (uPAR), ингибитор активатора плазминогена-1 (PAI-1) и матриксные металлопротеиназы (MMP).

При оценке экспрессии генов uPA, uPAR и PAI-1 в МСК-ЖТ, мы обнаружили, что количество мРНК PAI-1 МСК-ЖТ больных ИБС и ИБС в сочетании с диабетом значительно больше, чем в МСК-ЖТ контрольной группы, (рисунок 19). Полученные результаты хорошо согласуются с результатами ELISA, которые также продемонстрировали статистически значимо большее количество белка PAI-1 в кондиционированной среде МСК-ЖТ больных обеих групп в сравнении с контрольной группой.

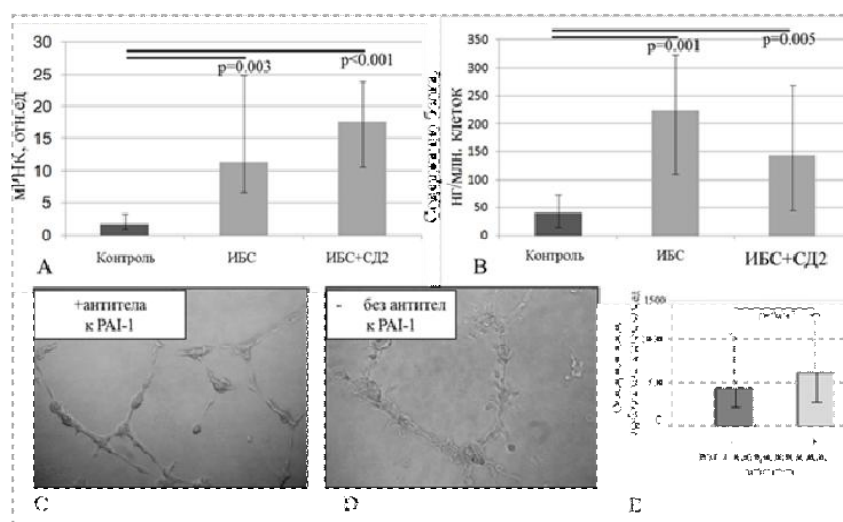


Рисунок 19 – Влияние PAI-1 на ангиогенную активность МСК-ЖТ больных ИБС и диабетом, [130]. А. Экспрессия гена PAI-1 в МСК-ЖТ. В. Содержание белка в кондиционированной среде в исследуемых группах (данные представлены как медиана, 25% и 75 перцентили): С.-D. Репрезентативные микрофотографии капилляроподобных структур, формируемых эндотелиальными клетками линии EA.hy926 на Матригеле в присутствии кондиционированной среды МСК-ЖТ больных ИБС с (С) или без (D) PAI-1 нейтрализующих антител (5 мкг/мл). Е. Суммарная длина капилляроподобных структур в отсутствии и присутствии PAI-1 нейтрализующих антител (5 мкг/мл) в кондиционированной среде МСК-ЖТ

Для того, чтобы выявить влияние PAI-1 на ангиогенную активность суммарных продуктов секреции МСК-ЖТ *in vitro*, мы добавили в кондиционированную среду МСК-ЖТ исследуемых групп специфические нейтрализующие антитела к PAI-1 и оценили способность суммарных продуктов секреции стимулировать формирование капилляроподобных структур. Было обнаружено, что блокирование PAI частично, но статистически значимо способствовало восстановлению ангиогенной активности суммарных продуктов секреции МСК-ЖТ больных ИБС и СД2 (рисунок 19Е.).

Резюме

В настоящее время стало ясно, что механизмы роста, физиологического обновления и восстановления сосудов после повреждения различными факторами опосредованы не только зрелыми эндотелиальными клетками, но и стволовыми/ прогениторными клетками, в частности мезенхимальными стволовыми клетками.

МСК, включая стромальные клетки жировой ткани, в настоящий момент являются привлекательным источником стволовых и прогениторных клеток для клеточной терапии и тканевой инженерии. Регенеративный потенциал этих клеток активно изучается в различных экспериментальных моделях и клинических исследованиях. Однако, данные о влиянии таких чрезвычайно распространенных хронических патологий как ССЗ, метаболический синдром, сахарный диабет на прогениторные клетки все еще крайне ограничены и противоречивы [133, 135, 136, 137, 142, 143].

В нашей работе мы изучали влияние ИБС и диабета 2 типа на функциональные характеристики МСК-ЖТ, полученных от больных с данными патологиями. По мнению многих исследователей, МСК-ЖТ являются более перспективным материалом для клеточной терапии в сравнении, например, с МСК костного мозга. Это обусловлено относительной простотой и малой травматичностью получения МСК из жировой ткани в виду ее доступности и возможности получения одномоментно этой ткани в достаточно большом количестве без специальной подготовки пациента. По своим регенеративным свойствам МСК-ЖТ практически не отличаются от МСК костного мозга.

Для аутологичной клеточной терапии стволовые/прогениторные клетки получают от самих пациентов, поэтому имеющиеся у них факторы риска (возраст, курение, артериальная гипертензия, дислипидемия, ожирение, различные типы нарушений углеводного обмена) могут оказывать влияние на количество и функциональные характеристики этих клеток [146, 158, 165, 181].

Это необходимо учитывать при разработке протоколов клеточной терапии, прежде всего, протоколов предтрансплантационной подготовки клеток.

Согласно отдельным клиническим исследованиям, у больных с сердечно-сосудистой патологией, включая СД2, не было отмечено снижения количества МСК, однако авторы отмечали нарушение регенеративного потенциала этого типа клеток. Так, например, Harris L.J. et al. (2010) показали, что количество МСК-ЖТ, полученных от 50 больных с различной сердечно-сосудистой патологией, не зависит от возраста и коморбидности, такой как ожирение и диабет. [167]. Схожие результаты были получены в работе Madonna R. et al. (2014), в которой клетки получали от 42 больных с различной степенью сердечно-сосудистого риска. Авторы обнаружили, что МСК-ЖТ больных СД2 характеризовались низкой пролиферативной активностью и сниженной реакцией на проангиогенные стимулы, прежде всего на гипоксию [240]. У больных с ожирением наблюдается снижение дифференцировочного потенциала МСК-ЖТ и подавление их способности стимулировать рост кровеносных сосудов. В одном из исследований было обнаружено, что МСК, полученные из миокарда больных диабетом характеризовались снижением пролиферативной активности, уменьшением фосфорилирования гистона H3 по остатку серина 10 (H3S10P), снижением дифференцировочного потенциала и преждевременным клеточным старением в сравнении с МСК, полученными из миокарда больных без СД2.

В данной работе мы показали, что МСК-ЖТ больных ИБС и ИБС в сочетании с СД2 не отличаются по морфологии, иммунофенотипу, сохраняют адипогенный и остеогенный дифференцировочный потенциал, демонстрируют высокую пролиферативную активность, но имеют более короткие теломеры, чем МСК-ЖТ пациентов контрольной группы (без ИБС и СД2). Укорочение теломер часто рассматривают как маркер репликативного старения клеток в процессе экспансии *in vitro* [72, 300, 311, 314, 328], но в нашем исследовании условия и длительность культивирования были одинаковыми для всех

анализируемых образцов МСК-ЖТ. Поэтому различия в длине теломер могут быть обусловлены индивидуальными особенностями пациентов, а также, истощением депо прогениторных клеток на фоне длительной хронической патологии (ИБС и СД2).

Изучение ангиогенного потенциала МСК показало, что ангиогенная активность МСК-ЖТ, оцененная по способности продуктов их секреции стимулировать ангиогенез *in vitro*, существенно снижена у больных ИБС и ИБС с СД2 [14, 16, 19] в сравнении с больными без сердечно-сосудистой патологии и СД2, независимо от таких факторов, как возраст и пол.

Сегодня большинство исследователей признают, что благоприятные эффекты МСК-ЖТ обусловлены в основном их уникальной паракринной активностью, обусловленной способностью секретировать широкий спектр биологически активных веществ, а также высвобождать внеклеточные везикулы, в частности, экзосомы, переносящие в другие клетки как белковые факторы, липиды, так и нуклеиновые кислоты [57, 153, 194, 308].

Однако, мы не обнаружили ожидаемого снижения секреции ангиогенных факторов МСК-ЖТ, полученными от больных ИБС. Напротив, секреция ключевых ангиогенных факторов, таких как VEGF, HGF и PlGF была повышена в сравнении с их секрецией клетками, полученными от пациентов без ИБС.

Ангиогенез представляет собой сложный многоэтапный процесс и осуществляется благодаря координированной работе ангиогенных и антиангиогенных факторов, поэтому причиной снижения ангиогенной активности суммарных продуктов секреции МСК-ЖТ больных ИБС может быть увеличение секреции антиангиогенных факторов. Мы показали, что экспрессия гена тромбоспондина-1, являющегося ингибитором ангиогенеза (прямое влияние на миграцию, пролиферацию, выживаемость и апоптоз) и функциональным антагонистом VEGF [217, 218, 273], значительно повышена у больных исследуемых групп, в сравнении с контрольной группой, хотя нам не

удалось подтвердить этот факт на уровне содержания белка в исследуемых образцах кондиционированной среды МСК-ЖТ из-за значительного разброса показателей в контрольной группе, хотя средние значения были выше у больных ИБС, сочетанной с СД2.

Мы также обнаружили значительное повышение как экспрессии, так и секреции ингибитора активатора плазминогена -1 типа - PAI-1 в МСК-ЖТ как у больных ИБС, так и у ИБС в сочетании с диабетом. PAI-1 является одним из основных регуляторов активности фибринолитической системы и имеет ключевое значение для миграции и адгезии клеток. Высокий уровень PAI-1 в крови ассоциируется с высоким риском ИБС, диабета и ожирения.

Роль PAI-1 в процессе ангиогенеза неоднозначна, поскольку в определенных условиях PAI-1 как стимулирует (в опухолях), так и угнетает рост и формирование сосудов. Имеются отдельные сведения, согласно которым уровень циркулирующего PAI-1 коррелирует с такими факторами как гипоксия, глюкоза, инсулин, триацилглицерол, воспалительные цитокины. Так, например, есть сведения, что МСК-ЖТ больных СД2 секретируют повышенные количества PAI-1 и меньшее количество тканевого активатора плазминогена и D-димера, что приводит к микротромбозам при использовании этих клеток для клеточной терапии критической ишемии нижней конечности.

С другой стороны, подавление активности PAI-1 с помощью низкомолекулярного ингибитора приводит к значительному ускорению восстановления кровотока в ишемизированной конечности мыши. PAI-1 регулирует активность урокиназы (uPA), которая является важнейшим регулятором внеклеточного протеолиза, необходимого для направленной Экспрессия урокиназы в ишемизированных мышцах конечности или в миокарде с помощью введения плазмиды с ее геном эффективно индуцирует функционально значимый ангиогенез. Это позволило нам предположить, что повышенная продукция PAI-1 МСК-ЖТ больных ИБС и СД2 оказывает антиангиогенный эффект через ингибирование uPA и внеклеточного

протеолиза и противодействует повышенной продукции ангиогенных факторов. Это подтверждено нами при использовании нейтрализации PAI-1 в кондиционированной среде МСК-ЖТ с помощью антител, что позволило частично восстановить ангиогенную активность кондиционированной среды [130].

Наши данные подтверждаются результатами, полученными другими авторами, которые показали, что в условиях ишемии происходит естественное ингибирование PAI-1 и увеличение активности ангиогенных факторов VEGF-A и FGF-2, что приводит к стимуляции ангиогенеза и улучшению перфузии и восстановлению тканей. Таким образом, в клетках больных ИБС и ИБС с СД2 происходит изменение экспрессионного и секреторного профиля, которое, вероятно, нарушает баланс ангиогенных и антиангиогенных факторов, что в конечном итоге приводит к снижению ангиогенных эффектов паракринной активности этих клеток [130].

Важным фактом, обнаруженным в нашей работе является то, что снижение ангиогенной активности МСК-ЖТ обусловлено именно влиянием диабета *per se*. Это хорошо согласуется с данными экспериментальных исследований, продемонстрировавших снижение ангиогенного потенциала МСК-ЖТ мышей с стрептозотоцин-индуцированным диабетом, а также более низкую эффективность этих клеток в заживлении ран. Показано, что гиперинсулинемия и NOX4 индуцированный оксидативный стресс при диабете являются ведущими причинами снижения ангиогенного потенциала МСК-ЖТ db/db мышей при использовании этих клеток для лечения экспериментальной ишемии задней конечности [113, 240, 304].

По нашим данным, важным фактором, отвечающим за снижение способности суммарных продуктов секреции этих клеток стимулировать ангиогенез *in vitro*, является гипергликемия, так как культивирование МСК-ЖТ в условиях, моделирующих гипергликемию приводило к снижению способности продуктов секреции стимулировать ангиогенез [3]. Механизм

этого эффекта вероятно связан с изменением экспрессии комплекса факторов, регулирующих ангиогенез. Однако, у больных с сочетанной патологией, такой как ИБС с сопутствующим СД2, вклад каждого заболевания в функциональные характеристики МСК-ЖТ определить достаточно сложно.

С учетом полученных нами результатов о подавлении ангиогенных свойств МСК-ЖТ у больных ИБС и СД2 можно было бы сделать вывод о том, для данной группы пациентов предпочтительным источником клеток для клеточной терапии будет использование аллогенных МСК молодых здоровых доноров или использование методов предтрансплантационной подготовки клеток, повышающих их ангиогенный потенциал, например, культивирование МСК-ЖТ в условиях физиологической гипоксии (2-5% кислорода), что увеличивает экспрессию и секрецию ангиогенных факторов и снижает антиангиогенных [15, 134, 342].

Необходимо подчеркнуть важность дальнейшего исследования секретомы МСК-ЖТ, включая изучение секреции внеклеточных везикул, что поможет прояснить механизмы снижения ангиогенных свойств этих клеток при патологиях и будет способствовать разработке более эффективных методов клеточной терапии, способствуя выбору наиболее перспективных мишеней для коррекции ангиогенных свойств МСК перед их трансплантацией. Известно, что МСК-ЖТ могут быть легко модифицированы генными конструкциями, содержащими гены ангиогенных факторов роста. По результатам нашего исследования PAI-1 может быть потенциальной мишенью для модификации с целью коррекции ангиогенной активности МСК-ЖТ больных ИБС, сочетанной с диабетом. Другой подход включает кратковременное гипоксическое preconditionирование МСК-ЖТ, которое вызывает координированные изменения секреции про- и антиангиогенных факторов этими клетками [15, 57].

ГЛАВА 5

КЛИНИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ (БИОХИМИЧЕСКИЕ) ФАКТОРЫ, АССОЦИИРОВАННЫЕ С НЕБЛАГОПРИЯТНЫМ ТЕЧЕНИЕМ ИШЕМИЧЕСКОЙ ХРОНИЧЕСКОЙ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ С СОПУТСТВУЮЩИМ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2 ТИПА

5.1. Клинико-функциональные характеристики больных с ишемической хронической сердечной недостаточностью и сопутствующим сахарным диабетом 2 типа

В проспективное исследование включено 112 пациентов, среди которых группу сравнения составили 25 относительно здоровых добровольцев (19 мужчин и 6 женщин в возрасте от 42 лет до 71 года (средний возраст $56,7 \pm 8,7$ лет) без ИБС и тяжелых хронических заболеваний; 55 больных постинфарктной ХСН II-III ФК по NYHA, из которых у 24 больных ХСН сочеталась с СД2 (46 мужчин и 9 женщин в возрасте от 40 до 73 лет (средний возраст $59,8 \pm 8,5$ лет); 32 больных СД2 (11 мужчин и 21 женщина) в возрасте от 49 до 74 лет (средний возраст $61,2 \pm 7,5$ лет).

По результатам теста 6-минутной ходьбы, согласно классификации Нью-Йоркской ассоциации кардиологов (NYHA), больные постинфарктной сердечной недостаточностью по функциональному классу ХСН были разделены на 2 группы. Таким образом, в 1-ю группу вошли 35 пациентов с ФК II, во 2-ю группу - 20 пациентов с ФК III.

Клинико-демографическая характеристика обследованных групп представлена в таблице 7.

Таблица 7 – Клинико-демографическая характеристика обследованных групп

Показатели	Группа сравнения (1)	ХСН (2)	ХСН+СД2 (3)	СД 2 (4)	P ₁₋₂	P ₁₋₃	P ₁₋₄	P ₂₋₃	P ₂₋₄	P ₃₋₄
Всего, n=112	25	31	24	32						
Возраст, годы	56,7±8,7	60,1±9,2	59,5±7,8	61,2±7,5	0,11	0,18	0,06	0,81	0,77	0,58
Пол, м/ж	19/6	26/5	20/4	11/21	0,34	0,39	0,001	0,61	0,0001	0,0003
ИМТ, кг/м ² , Ме (25% и 75%)	29,0 (24,2:32,0)	28,7 (24,9:32,3)	33,5 (31,2:35,3)	30,6 (28,0:34,8)	0,75	0,001	0,024	0,0007	0,025	0,13
Артериальная гипертензия, n (%)	13 (65)	20 (66,7)	19 (76)	16 (64)	0,25	0,044	0,54	0,19	0,18	0,024
Стенокардия напряжения, n (%)	-	14 (46,7)	10 (40)	-	-	-	-	0,48	-	-
Анамнез ИБС, лет	-	5,7±4,1	9,0±5,3	-	-	-	-	0,031	-	-
Длительность ХСН, лет	-	3,0±2,4	3,5±3,0	-	-	-	-	0,56	-	-
Длительность СД 2 типа, лет	-	-	5,9±5,1	6,8±6,7	-	-	-	0,84	-	-
Инфаркт миокарда, n (%)	-	31 (100)	24 (100)	-	-	-	-	-	-	-
Вмешательства по реваскуляризации КА, n (%)	-	11 (35,5)	5 (20,8)	-	-	-	-	0,19	-	-
ФК NYHA II/ III, n (%)	-	24 (77,4)/7 (22,6)	11(45,8)/13 (54,2)	-	-	-	-	0,016	-	-
Тест 6-минутной ходьбы, м	-	385,1±68,3	245,2±65,5	-				<0,0001		

Примечание: Данные представлены как (M±SD)

Медикаментозная терапия, принимаемая больными постинфарктной ХСН, в подавляющем большинстве случаев была оптимальной, соответствующей современным рекомендациям Рекомендациями ВНОК и ОССН по диагностике и лечению ХСН [33].

Больные СД2 принимали пероральную сахароснижающую терапию, соответствующую алгоритмам специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом [Дедов И.И., Шестакова М.В. 2015]. Терапия включала бигуаниды (метформин), производные сульфонилмочевины второй и третьей генерации (глибенкламид, гликлазид, глимепирид), ингибиторы α -глюкозидаз (акарбоза), инсулин.

Результаты сравнительного анализа биохимических показателей представлены в таблице 8.

Таблица 8 – Результаты сравнительного анализа биохимических показателей в исследуемых группах

Показатель	Контроль (1)	ХСН (2)	ХСН+СД2 (3)	СД 2 (4)	P ₁₋₂	P ₁₋₃	P ₁₋₄	P ₂₋₃	P ₂₋₄	P ₃₋₄
ИРИ, мкЕд/мл	13,7 $\pm$ 10,5	13,4 $\pm$ 5,9	22,5 $\pm$ 19,5	17,5 $\pm$ 7,9	0,47	0,06	0,05	0,06	0,03	0,82
С-пептид, нг/мл	2,8 $\pm$ 1,1	3,4 $\pm$ 0,9	5,0 $\pm$ 2,0	4,1 $\pm$ 1,4	0,05	<0,001	0,001	0,001	0,025	0,17
Глюкоза плазмы крови натощак, ммоль/л	5,2 $\pm$ 0,5	5,5 $\pm$ 0,8	10,4 $\pm$ 4,0	7,6 $\pm$ 2,8	0,21	<0,00001	<0,001	<0,00001	<0,001	0,003
HbA _{1c} , %	5,5 $\pm$ 0,3	5,9 $\pm$ 0,5	7,9 $\pm$ 1,6	7,0 $\pm$ 1,2	0,001	<0,00001	<0,00001	<0,0001	<0,001	0,019
НОМА-IR	3,2 $\pm$ 2,6	3,3 $\pm$ 1,8	-	-	0,38	-	-	-	-	-
ОХС, ммоль/л	5,8 $\pm$ 1,1	4,6 $\pm$ 1,3	5,0 $\pm$ 1,3	5,1 $\pm$ 1,3	<0,001	0,07	0,027	0,13	0,022	0,93
ХС ЛПНП, ммоль/л	3,7 $\pm$ 0,9	2,8 $\pm$ 1,3	2,8 $\pm$ 0,8	3,3 $\pm$ 1,2	0,002	0,001	0,05	0,43	0,046	0,23
ХС ЛПВП, ммоль/л	1,3 $\pm$ 0,3	1,1 $\pm$ 0,2	0,9 $\pm$ 0,3	1,3 $\pm$ 0,3	0,19	0,001	0,41	0,007	0,014	<0,0001
ТГ, ммоль/л	1,7 $\pm$ 1,1	1,3 $\pm$ 0,5	2,4 $\pm$ 1,6	1,4 $\pm$ 0,6	0,19	0,09	0,48	0,001	0,56	0,006
hsCRP, мг/л	0,19 $\pm$ 0,2	0,36 $\pm$ 0,4	0,51 $\pm$ 0,5	0,39 $\pm$ 0,4	0,27	0,004	0,05	0,02	0,34	0,15
Мочевая кислота, ммоль/л	338,1 $\pm$ 60,7	341,3 $\pm$ 76,7	404,6 $\pm$ 103,1	315,9 $\pm$ 75,2	0,75	0,035	0,45	0,021	0,30	0,002

Примечание: Данные представлены как (M $\pm$ SD); ИРИ - иммунореактивный инсулин; HbA_{1c}, %- гликированный гемоглобин; НОМА-IR- homeostasis model assessment of insulin resistance index; ОХС, ммоль/л- общий холестерин, ХС ЛПНП, ммоль/л- холестерин липопротеидов низкой плотности, ХС ЛПВП, ммоль/л- холестерин липопротеидов высокой плотности, ТГ, ммоль/л- триглицериды, hsCRP - high sensitive c-реактивный белок, мг/л.

Результаты сравнительного анализа показателей дуплексного сканирования брахиоцефальных артерий обследованных групп представлены в таблице 9.

Таблица 9 – Результаты сравнительного анализа показателей дуплексного сканирования брахиоцефальных артерий в исследуемых группах

Показатель	Группа сравнения (1)	ХСН (2)	ХСН+СД2 (3)	СД2 (4)	p 1-2	p 1-3	p 1-4	p 2-3	p 2-4	p 3-4
ПЗВД, %	6,5±2,3	5,5±2,6	5,1±2,7	4,5±2,3	0,18	0,11	0,009	0,16	0,64	0,50
ТКИМ правой ОСА, мм	0,74±0,15	0,80±0,22	1,0±0,19	0,85±0,19	0,31	0,009	0,08	0,07	0,52	0,12
ТКИМ левой ОСА, мм	0,77±0,21	0,82±0,18	0,94±0,19	0,92±0,17	0,43	0,09	0,032	0,14	0,11	0,97
Стеноз правой ОСА, %	23,3±6,6	29,3±8,8	26,8±8,7	27,3±8,5	0,12	0,57	0,27	0,47	0,59	0,89
Стеноз левой ОСА, %	19,6±4,2	29,9±10,9	25,5±10,1	26,1±6,9	0,010	0,33	0,021	0,28	0,34	0,72

Сравнительная характеристика показателей структурно-функционального состояния ЛЖ в исследуемых группах больных представлена в таблице 10.

По результатам Эхо-КГ у всех больных ХСН наблюдалось как снижение систолической, так и нарушение диастолической функции левого желудочка. Отсутствие различий между больными ХСН и ХСН, сочетанной с СД2 по структурным показателям ЛЖ свидетельствует о сопоставимой степени структурной перестройки ЛЖ у постинфарктных больных с систолической ХСН.

Отмечено, что у больных ХСН, сочетанной с СД2 в сравнении с больными ХСН без диабета обнаружены более выраженные признаки ДД при сопоставимой степени снижения систолической функции ЛЖ, что может быть связано как с различием в скорости активного расслабления ЛЖ, так и различием в податливости ЛЖ.

Таблица 10 – Результаты сравнительного анализа показателей структурно-функционального состояния ЛЖ в исследуемых группах в начале исследования

Показатели ЭХО-КГ	Группа сравнения (1)	ХСН (2)	ХСН+СД2 (3)	СД 2 (4)	P _{1,2}	P _{1,3}	P _{1,4}	P _{2,3}	P _{2,4}	P _{3,4}
ФВ, %	62,1±5,6	35,9±3,7	34,9±5,5	59,7±5,8	<0,0001	<0,0001	0,15	0,79	<0,0001	<0,0001
ЛП, мм	38,0±3,5	43,4±3,9	47,8±4,8	41,0±6,1	0,0001	<0,0001	0,11	0,004	0,08	<0,001
ЛП, V, max	46,6±10,9	63,9±23,0	78,3±20,8	57,1±21,5	0,002	<0,0001	0,039	0,05	0,46	0,004
КДР, мм	49,3±3,8	59,2±7,0	61,4±5,6	48,7±4,9	<0,0001	<0,00001	0,51	0,20	<0,0001	<0,0001
КСР, мм	31,4±4,7	43,4±9,08	47,1±5,2	30,7±5,4	<0,0001	<0,0001	0,36	0,35	<0,0001	0,12
КДО, мл	91,2±18,9	143,9±42,1	159,06±33,8	90,2±21,3	<0,0001	<0,0001	0,84	0,20	<0,0001	<0,0001
КСО, мл	35,3±9,2	91,4±28,2	102,9±28,4	35,8±10,7	<0,0001	<0,0001	0,28	0,15	<0,0001	<0,0001
МЖП, мм	9,8±1,5	9,9±1,8	9,8±1,2	10,6±1,4	0,68	0,75	0,032	0,91	0,05	0,05
ЗСЛЖ, мм	9,7±1,2	9,8±0,9	9,8±1,3	10,8±1,3	0,54	0,79	0,014	0,93	0,031	0,017
Соотношение E/A	0,94±0,26	1,07±1,04	1,21±1,02	0,73±0,34	0,1065	0,888	0,0825	0,42	0,84	0,24
Соотношение E/e'	8,0±2,8	10,2±5,5	13,7±4,1	9,7±3,1	0,14	0,0001	0,044	0,006	0,68	0,0002

Примечание: Данные представлены как (M±SD); ФВ, % - фракция выброса; ЛП, мм - левое предсердие; ЛП, V, max - максимальный объем левого предсердия; КДР, мм - конечно-диастолический размер; КСР, мм – конечно-систолический размер; КДО, мл - конечно-диастолический объем; КСО, мл – конечно-систолический объем; МЖП, мм - межжелудочковая перегородка; ЗСЛЖ, мм – задняя стенка левого желудочка; Соотношение E/A - отношение максимальных скоростей потока через митральный клапан; Соотношение E/e' - соотношение максимальной скорости раннего наполнения ЛЖ к максимальной скорости движения фиброзного кольца митрального клапана в фазу быстрого наполнения ЛЖ.

Поскольку эти две группы больных ХСН оказались сопоставимы по всем показателям, отражающим скорость активного расслабления ЛЖ и различались по показателям, отражающим податливость/давление наполнения ЛЖ, различие между группами по степени диастолической дисфункции связано именно с различным состоянием пассивных свойств миокарда ЛЖ (менее податливым ЛЖ в группе ХСН, сочетанной СД2). Кроме этого, у больных ХСН, сочетанной с СД2 в сравнении с больными ХСН без СД2 обнаружен больший размер и объем левого предсердия, что также свидетельствует о более выраженной ДД

ЛЖ у больных хронической сердечной недостаточностью и сопутствующим диабетом.

Сравнительный анализ степени диастолической дисфункции у больных ХСН обнаружил более выраженную ДД, а также большую встречаемость мерцательной аритмии в группе больных ХСН и сопутствующим СД2 (таблица 11).

Таблица 11 – Сравнительный анализ степени диастолической дисфункции у больных ХСН

Степень диастолической дисфункции ЛЖ	ХСН, n=30	ХСН+СД2, n=25	p-value
Ia, n (%)	8 (26,7)	0 (0)	0,007
Ib, n (%)	17 (56,7)	7(28)	0,057
II, n (%)	1(3,3)	3 (12)	0,189
III, n (%)	4 (12,5)	4 (16)	0,695
IV, n (%)	0 (0)	1 (4)	0,251
Мерцательная аритмия, n (%)	0 (0)	4 (16)	0,018
Выраженная ДД (II-IV ст., мерцательная аритмия), n (%)	5 (16,7)	12 (48)	0,007

Результаты сравнительного анализа ЭХО-КГ показателей у больных ХСН в зависимости от ФК NYHA представлены в таблице 12. У больных ХСН ФК II и ФК III без диабета показатели Эхо-КГ (ФВ ЛЖ, КДР, КСР, размеры ЛП, МЖП, ЗСЛЖ, ИММ ЛЖ, параметры ДД) не отличались.

В группе больных ХСН, сочетанной с СД2 ФК III в сравнении с больными ФК II обнаружены статистически значимые различия по таким показателям как КСО, ИММ ЛЖ и соотношение E/e' , что свидетельствует о более выраженной структурно-функциональной перестройке миокарда и выраженной диастолической дисфункции ЛЖ.

Таблица 12 – Результаты сравнительного анализа структурно-функционального состояния ЛЖ у больных хронической сердечной недостаточностью в зависимости от функционального класса NYHA

Показатели ЭХО-КГ	ХСН, n=30		p Mann-Whitney U Test	ХСН+СД2, n=25		p Mann-Whitney U Test
	II ФК, n=23	III ФК, n=7		II ФК, n=12	III ФК, n=13	
ФВ, %	37,8±4,0	34,6±6,0	0,285	37,6±2,8	32,9±6,3	0,125
ЛП, мм	43,2±3,5	45,8±4,7	0,199	47,7±6,6	47,8±3,3	0,915
ЛП, V, max	63,2±22,5	67,7±15,2	0,599	77,1±25,7	79,2±16,7	0,710
КДР, мм	60,4±6,5	60,3±9,6	0,953	59,4±4,2	62,9±6,3	0,312
КСР, мм	44,8±8,3	44,3±12,5	0,815	45,0±4,6	48,9±5,4	0,151
КДО, мл	151,3±43,0	163,2±58,2	0,770	142,3±26,6	172,1±34,3	0,049
КСО, мл	95,0±30,3	110,0±45,4	0,599	86,7±17,3	113,8±29,9	0,025
МЖП, мм	9,7±1,4	9,8±2,7	0,493	9,4±0,8	10,0±1,4	0,169
ЗСЛЖ, мм	9,9±1,1	10,0±2,8	0,695	9,9±0,7	9,8±1,2	0,910
ИММ ЛЖ, мм	120,7±23,6	128,4±29,4	0,628	108,1±13,4	128,9±21,5	0,035
Соотношение E/A	0,97±0,9	1,4±1,5	0,321	0,91±1,2	1,50±0,8	0,109
Соотношение E/e'	9,2±3,9	15,4±9,1	0,067	10,6±2,8	15,4±3,8	0,014

Примечание: Данные представлены как (M±SD).

Таким образом, сравнительные результаты клинико-инструментального обследования свидетельствуют, что больные ХСН, сочетанной с СД2 в сравнении с больными ХСН без СД2 характеризуются более высоким функциональным классом сердечной недостаточности по NYHA, меньшей толерантностью к физической нагрузке, более выраженным ремоделированием миокарда ЛЖ и более выраженным нарушением диастолической функции ЛЖ.

В группе больных СД2 без ХСН по данным ЭХО-КГ у 24 человек из 32 также выявлена ДД (из них у 11 больных - Ia степень, у 13 больных - Ib). Однако, у больных СД2 без ХСН в сравнении с больными ХСН, сочетающейся с СД2, чаще встречалась умеренная ДД (Ia и Ib степени) и не было выявлено более тяжелой ДД (II-IV степень или мерцательная аритмия), которая была характерна для больных ХСН, сочетающейся с СД2. Таким образом,

одновременное присутствие хронической систолической сердечной недостаточности и диабета ассоциируется с более тяжелой ДД ЛЖ у этой категории больных.

5.2. Циркулирующие концентрации натрийуретических пептидов и эндотелина-1 у больных с ишемической хронической сердечной недостаточностью и сопутствующим сахарным диабетом 2 типа

За последние двадцать лет накоплено большое количество убедительных данных о том, что физиологические эффекты натрийуретических пептидов (НУП) на деятельность сердечно-сосудистой, мочевыделительной и нервной системы реализуются через рецептор А типа.

Основным стимулом для высвобождения НУП является повышение напряжения миокарда как результат увеличения конечно-диастолического давления в левом желудочке. Их эффекты приводят к увеличению скорости клубочковой фильтрации, натрийурезу, блокаде РААС; подавлению спонтанной и индуцированной ангиотензином II жажды; торможению высвобождения аргинина и вазопрессина; ослаблению вазоконстрикторного действия эндотелина-1, а также симпатической иннервации сосудов. Вследствие этого достигается снижение давления в полостях сердца и увеличение его ударного объема, уменьшение тонуса сосудов, общего периферического сопротивления и артериального давления, обладают антимитогенной активностью через цГМФ-зависимый механизм [61, 106].

Синтез данных пептидов регулируется многими факторами, включая, глюкокортикоиды, тиреоидные гормоны и вазоактивными пептидами — эндотелином I и ангиотензином II независимо от гемодинамических эффектов данных факторов [106, 163].

В клинической практике определены граничные значения НУП, которые ассоциируется с тяжестью сердечной недостаточности и неблагоприятным прогнозом в отношении смертности от сердечно-сосудистых осложнений.

Несмотря на то, что НУП признаны надежными биомаркерами сердечной недостаточности, тем не менее, у больных ХСН, сочетающейся с диабетом или ожирением все еще не известны оптимальные диагностические значения MR-proANP и NT-proBNP и их интерпретация, хотя имеются отдельные сведения о том, что гипергликемия, гиперлипидемия и висцеральное ожирение обратно коррелируют с уровнями натрийуретических пептидов. Помимо этого, не определена необходимая кратность оценки данных маркеров и терапевтическая тактика в отношении ведения больных данной группы с повышенными показателями пептидов [138, 254].

В настоящее время считается, что хроническая сердечная недостаточность это состояние сниженной эффективности всей системы натрийуретических пептидов. Потенциальными механизмами снижения благоприятных эффектов НУП при сердечной недостаточности могут являться такие как, уменьшение синтеза и биодоступности НУП и экспрессии их рецепторов, увеличение активности неприлизина, вызывающего деградацию НУП, увеличение рецептор-опосредованного клиренса НУП, десенситизация рецепторов НУП. Важно отметить, что при переходе от умеренной к тяжелой ХСН, наблюдается повышение активности контр-гормонов НУП, среди которых наибольший интерес представляет эндотелин-1. Согласно некоторым исследованиям, ЭТ-1 является не только эндогенным стимулом для синтеза НУП, но и в определенных условиях способствует подавлению активности НУП. Кроме этого, в настоящее время по-прежнему остается невыясненным вопрос о причинах неэффективности антагонистов эндотелиновых рецепторов у больных ХСН. В этой связи изучение клинической значимости НУП в сопоставлении с ЭТ-1 у больных ХСН, в том числе, сочетающейся с СД2 представляется актуальным.

Результаты сравнительного анализа MR-ANP, NT-proBNP и эндотелина-1 в исследуемых группах представлены в таблице 13.

Таблица 13 – Результаты сравнительного анализа MR-proANP, NT-proBNP и эндотелина-1 в исследуемых группах

Показатель	Группа сравнения, n=25 (1)	ХСН, n=30 (2)	ХСН+СД2, n=25 (3)	СД2, n=32 (4)	p 1-2	p 1-3	p 1-4	p 2-3	p 2-4	p 3-4
MR- proANP, пг/мл	56,2 [46,2;72,1]	122 [94,4;193,2]	165,7 [119,6;296,4]	93,9 [42,5;118,2]	<0,0001	<0,0001	0,2938	0,1439	0,0204	0,0014
NT- proBNP, пг/мл	39,1 [21,9;48,5]	365,3 [203,7;732,0]	757,4 [348,6;1892,0]	87,4 [31,9;172,4]	<0,0001	<0,0001	0,0300	0,0032	<0,0001	<0,0001
Эндотелин- 1, пг/мл	432,1 [358,0;543,4]	497,3 [422,9;628,8]	793,4 [566,8;1142,4]	558,8 [443,0;712,7]	0,1430	0,0001	0,0131	0,0005	0,2279	0,0094

По полученным результатам, наибольшие значения циркулирующих НУП зарегистрированы в группе больных ХСН, в сочетании с диабетом. У больных сердечной недостаточностью без СД2 в сравнении с больными сердечной недостаточностью, сочетанной с СД2 по уровню циркулирующего MR-proANP статистически значимых различий обнаружено не было; уровень циркулирующего NT-proBNP у больных ХСН без СД2 был статистически значимо ниже, чем у больных ХСН в сочетании с диабетом (365,3 пг/мл против 757,4 пг/мл, соответственно, $p=0,0032$). Уровень циркулирующего эндотелина-1 у больных ХСН без СД2 в сравнении с больными ХСН, сочетанной с СД2 также был статистически значимо ниже (487,3 пг/мл против 793,4 пг/мл, $p=0,0005$).

У больных СД2 без ХСН в отличие от больных группы сравнения и больных ХСН без СД2 уровень циркулирующего ЭТ-1 был выше, но в сравнении с больными ХСН+СД2 концентрация пептида была ниже и достигала статической значимости.

Результаты сравнительного анализа MR-ANP, NT-proBNP и эндотелина-1 у больных ХСН в зависимости от ФК NYHA представлены в таблице 14.

По результатам сравнительного анализа циркулирующих НУП в зависимости от ФК ХСН в группе больных ХСН без СД2 статистически

значимых различий обнаружено не было. В группе больных ХСН II ФК, сочетанной с диабетом в сравнении с больными III ФК уровень циркулирующего NT-proBNP оказался ожидаемо ниже (444,5 пг/мл против 1064,0 пг/мл, $p=0,0393$). Было обнаружено, что у больных ХСН III ФК без СД2 в сравнении с больными ХСН III ФК, сочетанной с СД2 уровень циркулирующего NT-proBNP был статистически значимо ниже (338,1 пг/мл против 1064,0 пг/мл, $p=0,0346$).

Таблица 14 – Результаты сравнительного анализа MR-proANP, NT-proBNP и эндотелина-1 у больных ХСН II-III ФК NYHA

ФК NYHA	MR-proANP, пг/мл		p-value	NT-proBNP, пг/мл		p-value	Эндотелин-1, пг/мл		p-value
	ХСН, n=30	ХСН+СД2, n=25		ХСН, n=30	ХСН+СД2, n=25		ХСН, n=30	ХСН+СД2, n=25	
II ФК	107,8 [86,5; 152,6]	119,6 [97,7; 296,4]	0,747	278,9 [189,7; 575,8]	444,5 [348,6; 1721,0]	0,389	471,4 [412,6; 618,1]	662,5 [547,1; 967,9]	0,040
III ФК	208,4 [102,6; 520,2]	199,1 [137,8; 360,2]	0,821	338,1 [199,2; 687,7]	1064,0 [606,0; 2879,0]	0,035	725,9 [543,0; 862,5]	814,9 [660,6; 1203,2]	0,219
p-value	0,073	0,087	-	0,339	0,039	-	0,046	0,357	-

В целом, более высокое давление наполнения ЛЖ у больных ХСН, сочетающейся с диабетом может быть основной причиной повышения натрийуретических пептидов в крови.

Уровень циркулирующего эндотелина-1 у больных в группе ХСН II ФК без диабета в сравнении с больными III ФК был статистически значимо ниже (471,4 пг/мл против 725,9 пг/мл, $p=0,0463$).

В группе больных ХСН II ФК, сочетанной с диабетом в сравнении с больными III ФК статистически значимых различий не обнаружено. Однако, у больных ХСН II ФК без СД2 в сравнении с больными ХСН II ФК в сочетании с СД2 уровень эндотелина-1 был статистически значимо ниже (471,4 пг/мл против 662,5 пг/мл, $p=0,0407$).

В поисках объяснения повышенного уровня циркулирующего эндотелина-1 у больных с сердечной недостаточностью, мы обнаружили, что его уровень в плазме коррелирует с тяжестью ДД ЛЖ как у больных с ХСН без диабета, так и больных с ХСН в сочетании с диабетом. Напомним, что у больных ХСН, сочетающейся с диабетом, в сравнении с больными ХСН без диабета чаще диагностировалась более выраженная ДД (таблица 11) и более высокие значения циркулирующего эндотелина-1 (таблица 13).

При применении ROC-анализа показателей чувствительности и специфичности диагностики ДД ЛЖ по значению эндотелина-1 выявлена диагностическая значимость данного фактора. ROC-Area $\pm$ S.E. составила 0,76 $\pm$ 0,05 (95%ДИ 0,64-0,87, p=0,0014), (рисунок 20). Показано, что значение циркулирующего эндотелина-1 у больных постинфарктной систолической сердечной недостаточностью более 503,7 пг/мл с чувствительностью 84,6% и специфичностью 61,6% ассоциируется с ДД ЛЖ.

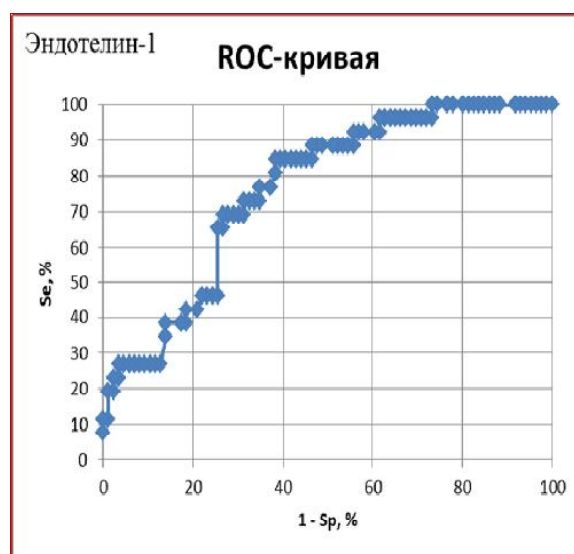


Рисунок 20 – Характеристическая кривая (ROC-кривая) чувствительности и специфичности значений циркулирующего эндотелина-1 в диагностике диастолической дисфункции ЛЖ у больных с ХСН

На основании анализа показателей диастолической функции ЛЖ у каждого больного ХСН был определен тип наполнения ЛЖ

В объединенной группе больных ХСН у 33 больных (60%) был выявлен тип наполнения ЛЖ с замедленным расслаблением (незначительная ДД или степень I), у 8 больных (14,5%) - псевдонормальный тип (умеренная ДД или степень II), у 10 больных (18,2%) - рестриктивный тип (тяжелая ДД, или степень III); ещё у 4 больных (7,3%) признаки ДД регистрировались на фоне мерцательной аритмии.

Результаты сравнительного анализа циркулирующего эндотелина-1 у больных ХСН в зависимости от степени диастолической дисфункции ЛЖ представлены в таблице 15.

Таблица 15 – Результаты сравнительного анализа циркулирующего эндотелина-1 у больных ХСН в зависимости от степени диастолической дисфункции ЛЖ

Эндотелин-1, пг/мл					
Незначительная ДД ЛЖ n=31 (1)	Умеренная ДД ЛЖ n=12 (2)	Тяжелая ДД ЛЖ n=12 (3)	p ₁₋₂	p ₁₋₃	p ₂₋₃
527,4 [422,9: 689,7]	811,5 [574,6: 1072,9]	1016,4 [660,6: 1203,2]	0,014	0,046	0,429

Сравнительный анализ показал, что у больных ХСН и незначительной степенью ДД ЛЖ уровень эндотелина-1 был статистически значимо ниже, чем у больных ХСН и умеренной и тяжелой степенью ДД ЛЖ (527,4 пг/мл против 811,5 пг/мл, соответственно, $p=0,014$ и 527,4 пг/мл против 1016,4 пг/мл, соответственно, $p=0,046$).

При применении ROC-анализа показателей чувствительности и специфичности для диагностики ДД ЛЖ по значению соотношения E/e' выявлена диагностическая значимость данного параметра. ROC-Area $\pm$ S.E. составила $0,70\pm0,05$ (95%ДИ 0,60-0,80, $p=0,0222$) (рисунок 21). Показано, что значение соотношения E/e' у больных систолической постинфарктной сердечной недостаточностью более 11,2 с чувствительностью 84,1% и

специфичностью 53,1% ассоциируется с ДД ЛЖ. Полученные данные были ожидаемы и согласуются с ранее проведенными исследованиями.



Рисунок 21 – Характеристическая кривая (ROC-кривая) чувствительности и специфичности значений соотношения E/e' в диагностике диастолической дисфункции ЛЖ у больных с ХСН

При применении ROC-кривой чувствительности и специфичности значений соотношения E/A не выявлено статистической значимости этого параметра для диагностики ДД ЛЖ у больных постинфарктной ХСН (ROC-Area $\pm$ S.E. составила $0,50\pm0,05$ (95%ДИ 0,50-0,62, $p=0,4687$; чувствительность - 97,8%, специфичность - 23,6%).

Корреляционная связь натрийуретических пептидов и эндотелина-1 с ЭХО-КГ параметрами в объединенной группе больных ХСН представлена в таблице 16. В целом, MR-proANP, NT-proBNP и эндотелин-1 сопоставимо коррелируют с морфо-функциональными Эхо-КГ параметрами ЛЖ.

Особенно обращает внимание средняя прямая связь НУП и эндотелина-1 с показателями ДД ЛЖ, в частности, с соотношением E/e' , что подтверждает вклад диастолической дисфункции ЛЖ в тяжесть систолической сердечной недостаточности.

В нашем исследовании подтверждена связь между наличием СД2 и ДД ЛЖ, которая также продемонстрирована другими исследователями [61,164, 211, 302].

Согласно данным литературы гипергликемия, ожирение, ИР и гиперлипидемия при СД2 вызывает ряд морфологических изменений в миокарде. К ним относятся гипертрофия ЛЖ, интерстициальный и периваскулярный фиброз с преимущественным увеличением в миокарде коллагена I и III типов. В трансмуральных биоптатах ЛЖ больных СД2 документировано отложение липидов в виде триглицеридов и холестерина [52, 73, 81, 190].

Таким образом, присутствие СД2 у больных систолической ХСН ассоциируется с диастолической сердечной недостаточностью, которая, вероятно, является отражением эндотелиальной дисфункции на уровне микроциркуляторного русла миокарда. В нашем исследовании повышение циркулирующего эндотелина-1 у больных ХСН, сочетающейся с СД2 и более выраженными нарушениями диастолической функции ЛЖ в сравнении с больными ХСН без СД2 и менее выраженной ДД ЛЖ может служить молекулярным маркером эндотелиальной дисфункции как коррелята ДД ЛЖ.

Результаты корреляционного анализа, демонстрирующие связь MR-proANP, NT-proBNP и эндотелина-1 с показателями структурно-функционального состояния ЛЖ в объединенной группе больных ХСН представлены в таблице 16.

Таблица 16 – Корреляционная связь MR-proANP, NT-proBNP и эндотелина-1 с показателями структурно-функционального состояния ЛЖ в объединенной группе больных ХСН

Показатели	MR-proANP, пг/мл		NT-proBNP, пг/мл		Эндотелин-1, пг/мл	
	Spearman, R	p	Spearman, R	p	Spearman, R	p
ФВ ЛЖ%	-0,45	0,002	-0,36	0,014	-0,35	0,019
ЛП, мм	0,38	0,012	0,29	0,053	0,28	0,071
Объем ЛП, мл	0,37	0,014	0,34	0,025	0,28	0,083
КДР, мм	0,26	0,102	0,23	0,137	0,27	0,084
КСР, мм	0,33	0,029	0,25	0,104	0,35	0,021
КСО, мл	0,40	0,009	0,37	0,014	0,39	0,011
КДО, мл	0,24	0,120	0,26	0,084	0,33	0,029
ИММ ЛЖ	0,29	0,048	0,26	0,072	0,26	0,078
Е/А	0,19	0,225	0,13	0,388	0,21	0,186
Е/е'	0,58	<0,001	0,51	0,002	0,55	<0,001
ВИВР, мс	-0,29	0,060	-0,23	0,143	-0,27	0,079

Помимо этого, в объединенной группе больных ХСН обнаружены прямые связи средней силы между циркулирующим MR-proANP, NT-proBNP и эндотелином-1 ($r=0,43$, $p=0,0009$ и $r=0,44$, $p=0,0007$, соответственно). Эти взаимосвязи могут объяснять нивелирование неблагоприятных эффектов эндотелина-1 при увеличении его уровня в крови. Известно, что НУП является функциональными антагонистами для ЭТ-1. В условиях *in vitro* ЭТ-1 активирует пролиферативную активность многих типов клеток, включая эндотелиальные клетки, фибробласты сердца и легких, гладкомышечных клеток сосудов, в то время как НУП ингибируют пролиферативные процессы указанных клеточных популяций. В условиях *in vivo* в миокарде новорожденных белых крыс через 24 часа после однократного введения ЭТ-1 было выявлено достоверное увеличение показателей синтеза ДНК. Стимулирующее влияние ЭТ-1 на ДНК-синтетические процессы в миокарде воспроизводилось при использовании различных режимов введения пептида в широком диапазоне доз. Помимо этого, обнаружено, что ANP противостоит

стимулирующему влиянию ЭТ-1 на пролиферацию и синтез ДНК в культуре гладкомышечных клеток сосудов и кардиомиоцитов [Wu J.M. et al,1993].

Таким образом, принцип реципрокности активности в системе натрийуретические пептиды - эндотелин-1 позволяет на определенных этапах сердечной недостаточности противостоять нейрогуморальным и клеточным сдвигам, предупреждая или отдалая развитие фиброза миокарда.

При применении ROC-анализа показателей чувствительности и специфичности диагностики ХСН по значению MR-proANP выявлена диагностическая значимость данного параметра. ROC-Area $\pm$ S.E. составила 0,84 $\pm$ 0,04 (95%ДИ 0,76-0,92, $p < 0,00001$), (рисунок 22А). Таким образом, уровень MR-proANP более 80,5 пг/мл ассоциируется с ХСН (чувствительность- 88,9%, специфичность- 64,7%).

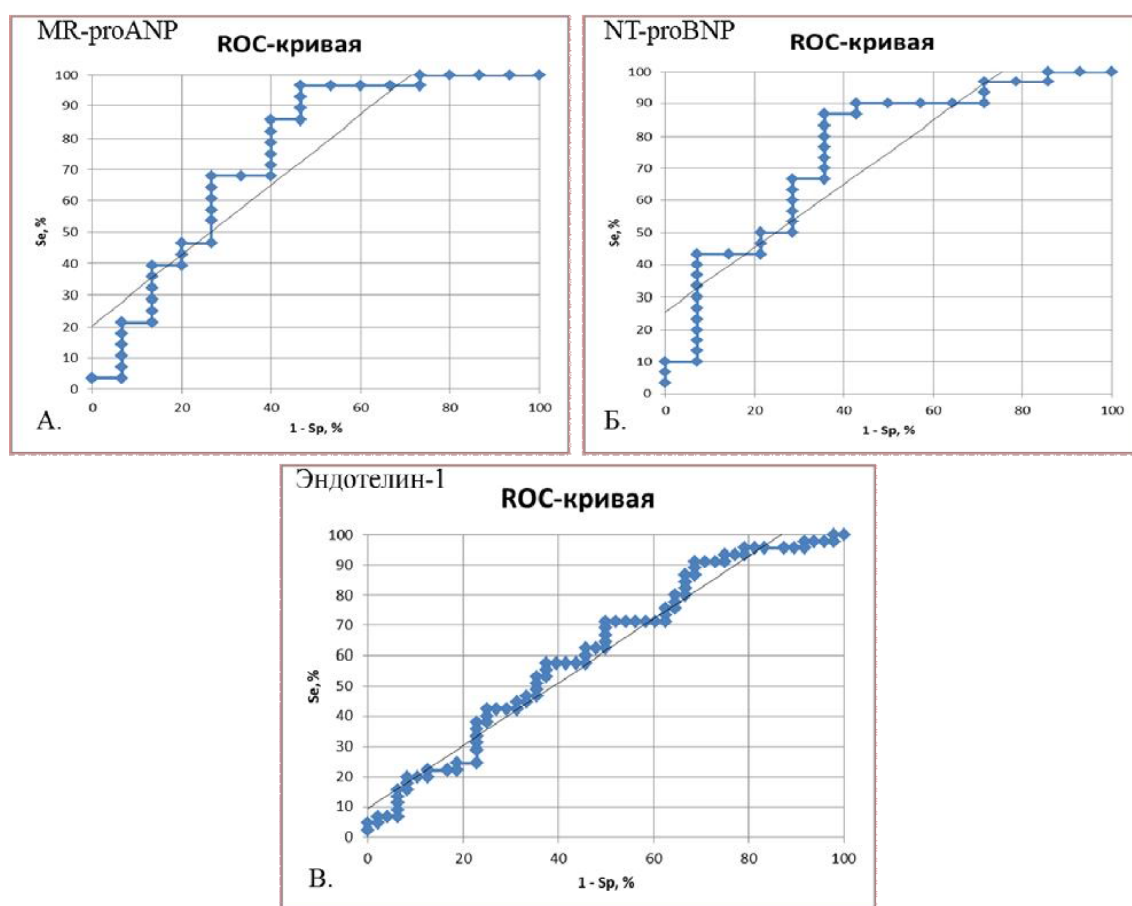


Рисунок 22 – Характеристическая кривая (ROC-кривая) чувствительности и специфичности значений MR-proANP (А.), NT-proBNP (Б.) и эндотелина-1(В.) в диагностике ХСН

При применении ROC-анализа показателей чувствительности и специфичности диагностики ХСН по значениям NT-proBNP выявлена диагностическая значимость данного маркера. ROC-Area $\pm$ S.E. составила 0,93 $\pm$ 0,03 (95%ДИ 0,87-0,98, $p<0,00001$). Таким образом, уровень NT-proBNP более 114,7 пг/мл ассоциируется с систолической хронической сердечной недостаточностью (чувствительность- 77,8%, специфичность- 98,2%), что согласуется с ранее опубликованными исследованиями, (рисунок 22Б).

При применении ROC-анализа показателей чувствительности и специфичности диагностики ХСН по значениям эндотелина-1 диагностической значимости данного параметра обнаружено не было (ROC-Area $\pm$ S.E. составила 0,61 $\pm$ 0,05 (95%ДИ 0,50-0,72, $p=0,0864$), (чувствительность- 75,8%, специфичность- 77,8%), (рисунок 22В).

Таким образом, у больных ХСН без СД2 зависимости уровня циркулирующих концентраций MR-proANP и NT-proBNP от ФК NYHA выявлено не было; уровень циркулирующего эндотелина-1 ниже у больных II ФК, чем у больных III ФК, демонстрируя большую чувствительность к тяжести ХСН.

У больных ХСН и СД2 уровень циркулирующего MR-proANP не зависит от ФК NYHA; уровень циркулирующего NT-proBNP у больных II ФК ниже, чем у больных III ФК NYHA. Повышенный уровень циркулирующего эндотелина-1 у больных ХСН, сочетанной с диабетом не зависит от ФК NYHA, но ассоциируется с диастолической дисфункцией ЛЖ.

Повышенный уровень циркулирующего эндотелина-1 у больных с систолической сердечной недостаточностью ассоциируется с тяжестью диастолической дисфункции ЛЖ.

Полученные нами результаты исследования подтверждают, что фракция выброса ЛЖ и уровень циркулирующих натрийуретических пептидов (по данным ROC-анализа ФВ ЛЖ и NT-proBNP в большей степени, чем MR-proANP) как у больных ХСН без СД2, так и больных ХСН, сочетающейся с

СД2 являются надежными диагностическими маркерами хронической систолической сердечной недостаточности.

5.3. Циркулирующие концентрации натрийуретических пептидов и эндотелина-1 и частота сердечно-сосудистых осложнений у больных с ишемической хронической сердечной недостаточностью и сопутствующим сахарным диабетом 2 типа

Несмотря на то, что в многочисленных популяционных исследованиях определена роль предсердного и мозгового натрийуретических пептидов (НУП) как биологических маркеров, ассоциированных с неблагоприятным прогнозом и смертностью от сердечно-сосудистых причин у больных с ишемической дисфункцией ЛЖ и ХСН [Cleland JG, 2014], тем не менее, у определенной категории больных, в частности, больных ХСН, в сочетании с метаболическими нарушениями, включая сахарный диабет, клиническое и прогностическое значение НУП неоднозначно и нуждается в проверке [Бондарь, 2011]. Аналогичная проблема состоит и в оценке роли эндотелина-1, который является одним из мощнейших гуморальных стимулов, активирующим секрецию сердечных НУП. Отметим, что у группы больных ХСН на фоне диабета или избыточного веса подобные исследования не проводились, но крайне важны как для понимания механизмов отягощения ИБС и сердечной недостаточности, так и возможно, частичного объяснения малой эффективности ингибиторов эндотелина-1 у таких пациентов.

Задачей исследования, представленного в данном разделе, являлось изучение роли НУП (MR-proANP и NT-proBNP) и эндотелина-1 в стратификации характера течения и тяжести ХСН у больных с ишемической (постинфарктной) дисфункцией миокарда ЛЖ в процессе проспективного наблюдения.

С целью выявления возможности ассоциации исследованных факторов с характером течения ИБС, объединенная группа больных ХСН (ХСН без СД2 и ХСН+СД2) была разделена по итогам проспективного наблюдения на две

группы: группа А - пациенты с благоприятным течением заболевания и группа Б - пациенты с неблагоприятным течением. При этом в течение проспективного наблюдения оценивалось состояние гемодинамических показателей, динамика фракции выброса левого желудочка, частота госпитализаций по поводу ИБС и сердечной недостаточности, частота госпитализаций по поводу декомпенсации диабета и случаи сердечно-сосудистой смерти.

Больных наблюдали 3,7 [2,4:3,9] года в научно-консультативном отделе ФГБУ "НМИЦ кардиологии" Министерства здравоохранения Российской Федерации от начала и до конца исследования или до момента летального исхода. Все больные находились на многокомпонентной стандартной терапии по поводу ИБС и ХСН; больные сахарным диабетом получали соответствующую антидиабетическую терапию.

Исходы проспективного наблюдения

По результатам проспективного наблюдения в группе сравнения (без ИБС, ХСН и СД2) не было зарегистрировано ни одного случая смерти или возникновения сердечно-сосудистого заболевания.

Из общего количества больных с ХСН 12 пациентов были утеряны для наблюдения. Таким образом, структура исходов была проанализирована у 43 пациентов с ишемической ХСН: в группу "А" включено 25 пациентов (18 человек (72,0%) из группы ХСН без СД2 и 7 человек (28%) из группы ХСН с сопутствующим СД2; в группу "Б" включено 18 пациентов (6 больных из группы ХСН без СД2 (33,3%) и 12 человек (66,7%) из группы ХСН с сопутствующим СД2).

В группе больных с ишемической ХСН без СД2 было зарегистрировано 6 нефатальных сердечно-сосудистых событий: 2 случая декомпенсации ИБС (8,7%) и 4 случая декомпенсации ХСН (17,4%).

В группе больных с ХСН и сопутствующим СД2 было 12 событий, среди которых: 4 случая смерти от сердечно-сосудистых причин (20%); 2 случая декомпенсации ИБС (10%); 2 случая декомпенсации ХСН (10%); 4 случая декомпенсации СД2 (20%).

В группе больных с СД2 без ХСН за период наблюдения было зарегистрировано два ССС: у одного больного (3,1%) тромбоз глубоких вен нижних конечностей, у одного больного (3,1%) диагностирована стабильная стенокардия; 2 случая (6,3%) декомпенсации СД2, потребовавшей инсулинотерапии.

Анализ показал, что сопутствующий СД2 у больных ХСН ассоциирован с неблагоприятным течением ИБС и более высокой сердечно-сосудистой смертностью (χ^2 Пирсона =0,008), что согласуется с другими исследованиями, продемонстрировавшими более высокую общую смертность и более высокую сердечно-сосудистую смертность больных с ХСН и сопутствующим СД2 (М. Dauriz et al., 2017).

При оценке вклада сопутствующего СД2 у больных с ХСН в риск развития фатальных событий, оказалось, что присутствие СД2 у больных ХСН в сравнении с больными ХСН без СД2 типа статистически значимо ассоциируется со смертельным исходом: 35,6% нефатальных ССС (декомпенсация ХСН, декомпенсация ИБС) и 8,9% летальных случаев (4 смерти, из которой 2 случая внезапной смерти на фоне декомпенсации ХСН и 2 случая смерти в результате декомпенсации ХСН), соответственно, в группе больных ХСН+СД2, против 55,6% нефатальных ССС и 0% летальных случаев, соответственно, в группе больных ХСН, (двусторонний критерий Фишера=0,032).

В структуре нефатальных ССС в группе Б стали: в 55,6% случаев повторные госпитализации, из них у 6 больных по поводу декомпенсации ХСН, у 4 больных по поводу прогрессирования ИБС с развитием острого коронарного синдрома, потребовавшего реваскуляризации; у 4 больных (22,2%) причиной госпитализации была декомпенсация диабета. Анализ показал, что в группе Б в сравнении с группой А было больше больных с более тяжелым функциональным классом NYHA. Распределение больных в соответствии с ФК ХСН в группах А и Б представлено на рисунке 23.

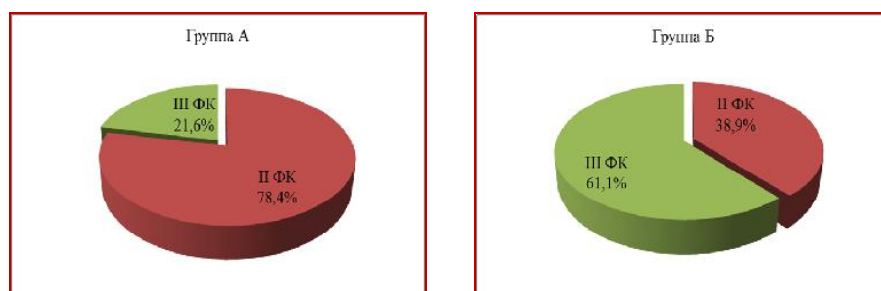


Рисунок 23 – Распределение больных по функциональным классам ХСН в группах с благоприятным (А) и неблагоприятным (Б) характером течения ИБС

Результаты сравнительного анализа клинических и анамнестических показателей в группах с разным клиническим течением ИБС представлены в таблице 17.

Таблица 17 – Результаты сравнительного анализа качественных клинических и анамнестических показателей в группах с разным клиническим течением ИБС/ХСН

Показатель	Благоприятное течение, n= 25	Неблагоприятное течение, n=18	p - value
Пол м/ж, n (%)	22/3(88/12)	13/5 (72,2/27,8)	0,052
Возраст, годы (M±SD)	59,4±7,4	60,7±10,6	0,358
Длительность ИБС, лет (M±SD)	6,8±4,3	8,5±6,0	0,430
Длительность ХСН, лет (M±SD)	3,1±2,6	3,4±3,0	0,831
Длительность СД2, лет (M±SD)	3,2±2,5	8,7±5,6	0,001
СД2, n (%)	12 (32,4)	12(66,6)	0,035
ХСН II/III ФК NYHA, n (%)	17 (68)/8 (32)	7 (38,9)/11 (61,1)	0,006
6-минутный тест ходьбы, м (M±SD)	353,2±87,6	282,5±97,4	0,052
Аневризма ЛЖ, n(%)	7 (28)	3(16,7)	0,578
Пациенты, перенесшие АКШ, n(%)	4 (16)	1(5,6)	0,658
Пациенты, перенесшие стентирование, n(%)	7 (28)	2 (11,1)	0,702
Нарушения ритма сердца, n(%)	13 (52)	8 (44,4)	0,563
АГ, n(%)	24 (96)	18 (100)	0,005
Перенесенный мозговой инсульт	2 (8)	3(16,7)	0,317
ИМТ, кг/м ² , (M±SD)	30,7±4,6	30,9±5,7	0,927
Ожирение, n(%)	11 (44)	11 (61,1)	
Курение, n(%)	17 (68)	8 (5,6)	0,243
Отягощенный семейный анамнез, n(%)	18 (72)	11 (61)	0,520

Примечание: АКШ - аортокоронарное шунтирование; АГ - артериальная гипертония.

Результаты сравнительного анализа показателей дуплексного сканирования брахиоцефальных артерий у больных с разным клиническим течением ИБС были сопоставимы, представлены в таблице 18.

Таблица 18 – Результаты сравнительного анализа показателей дуплексного сканирования брахиоцефальных артерий у больных с разным клиническим течением ИБС/ХСН

Показатель	Благоприятное течение, n=25	Неблагоприятное течение, n=18	p -value
ПЗВД, %	5,5±2,5	5,2±2,9	0,554
ТКИМ правой ОСА, мм	0,86±0,25	0,87±0,19	0,788
ТКИМ левой ОСА, мм	0,90±0,21	0,81±0,15	0,426
Стеноз правой ОСА, %	27,3±8,7	30,5±8,9	0,543
Стеноз левой ОСА, %	29,3±11,8	27,2±8,6	0,829

Терапия, принимаемая пациентами групп А и Б была сопоставима по назначению ингибиторов АПФ, сартанов, статинов, антагонистов кальция, антиаритмических препаратов, антиагрегантов. Больные ХСН, сочетающейся с СД2 получали соответствующую антидиабетическую терапию.

Результаты сравнительного анализа биохимических показателей в группах с благоприятным и неблагоприятным течением по большинству параметров были сопоставимы, отличаясь лишь более высоким уровнем гликированного гемоглобина в группе Б, что объясняется преобладанием больных с ХСН и сопутствующим СД2 и неудовлетворительной гликемией (таблица 19).

Таблица 19 – Результаты сравнительного анализа биохимических показателей в группах разным клиническим течением ИБС/ХСН

Показатели	Благоприятное течение, n=25	Неблагоприятное течение, n=18	p-value
ИРИ, мкЕд/мл	14,8±7,2	21,0±20,7	0,694
С-пептид, нг/мл	3,7±1,3	4,6±2,1	0,163
Глюкоза плазмы натощак, ммоль/л	6,9±3,0	8,9±4,4	0,059
HbA1c, %	6,4±1,1	7,7±1,9	0,005
ОХС, ммоль/л	4,7±1,4	4,8±1,1	0,396
ХС ЛПНП, ммоль/л	2,8±1,2	2,9±0,9	0,279
ХС ЛПВП, ммоль/л	1,04±0,19	1,05±0,31	0,568
ТГ, ммоль/л	1,7±1,4	1,9±1,1	0,334
hsCRP, мг/л	0,4±0,5	0,5±0,5	0,099
Мочевая кислота, ммоль/л	365,6±87,5	372,3±106,2	0,943

Результаты динамики показателей структурно-функционального состояния ЛЖ в зависимости от характера течения ИБС представлены в таблице 20.

Исходно больные в группе неблагоприятного течения ИБС в сравнении с больными группы благоприятного течения отличались по инотропной функции ЛЖ и показателям диастолической дисфункции ЛЖ, что выражалось в более низкой ФВ ЛЖ и более худших показателях, отражающих податливость/давление наполнения ЛЖ (соотношение E/A, соотношение E/e', время изоволюметрического расслабления).

В группе больных с СД2 без ХСН за период наблюдения было зарегистрировано два ССС: у одного больного (3,1%) тромбоз глубоких вен нижних конечностей, у одного больного (3,1%) диагностирована стабильная стенокардия; 2 случая (6,3%) декомпенсации СД2, потребовавшей инсулинотерапии. Все больные диабетом продолжали получать антидиабетическую и антигипертензивную терапию.

Таблица 20 – Динамика показателей структурно-функционального состояния ЛЖ в зависимости от характера течения ИБС/ХСН

Показатели ЭХО-КГ (исходно)	Благоприятное течение, n=25	Неблагоприятное течение, n=18	p Mann-Whitney U Test	через 48 мес. – благоприятное течение (Δ,%)	через 48 мес. – неблагоприятное течение (Δ,%)
ФВ, %	37,8 [35,4-40,1]	34,9 [29,9-38,7]	0,011	7,9 [-1,7-16,2]	2,9 [-3,9-26,2]
ЛП, мм	45 [41-48]	45 [43-49,5]	0,21	-1,7 [-4,3-2,1]	-2 [6,4-4,7]
ЛП, V, max	61 [53-90]	64 [58,5-83,5]	0,69	6,5 [-11,3-16,4]	24,3 [12,8-38,9]
КДР, мм	59 [53-67]	60,5 [59,5-66,5]	0,33	3,3 [0-7,5]	4,3 [-1,4-7,5]
КСР, мм	43 [36-52]	48,5 [43-52]	0,17	3,5 [-5,5-9,8]	4,7 [0-16,9]
КДО, мл	147 [114-188]	166 [126-186]	0,35	16,8 [-0,7-22,5]	10,9 [-13,8-35,9]
КСО, мл	91 [73-115]	114 [76-131]	0,14	6,9 [-3,2-32,8]	-0,5 [-11,8-45,9]
Соотношение Е/А	0,8 [0,6-0,9]	0,9 [0,7-2,9]	0,047	-11,4 [-26,7-10,8]	-13,0 [-31,6-87,8]
Соотношение Е/е'	8,9 [7,4-12,9]	14,0 [11,6-17,6]	0,001	10,4 [-10,5-20,6]	-13,8 [-37-61,5]
ВИВР, мс	106 [95-120]	77,5 [61,0-106]	0,016	0 [-16,7-6,6]	-5,6 [-20,0-17,5]

Примечание: Данные представлены как медиана, 25% и 75% кватили.

В группе с благоприятным течением ИБС структурно-функциональные показатели миокарда ЛЖ по результатам проспективного наблюдения оставались стабильными, без статистически значимой отрицательной динамики.

В группе с неблагоприятным течением ИБС по результатам проспективного наблюдения отмечалась тенденция к ухудшению показателей диастолической функции ЛЖ.

Количественный анализ циркулирующих натрийуретических пептидов и эндотелина-1 показал, что в группе больных с благоприятным течением ИБС уровень исследованных гормонов был статистически меньше в сравнении с больными с неблагоприятным течением ИБС (таблица 21).

Таблица 21 – Результаты сравнительного анализа уровня MR-proANP, NT-proBNP и эндотелина-1 в зависимости от характера течения ИБС/ХСН

Показатель	Благоприятное течение, n=25	Неблагоприятное течение, n=18	p Mann-Whitney U Test
MR-proANP, пг/мл	119,6 [94,4:174,5]	230,0 [106,1:459,1]	0,022
NT-proBNP, пг/мл	394,5 [203,7: 753,4]	735,0 [540:1900]	0,008
Эндотелин-1, пг/мл	527,4 [412,6:646,1]	754,5 [628,8:862,5]	0,006

При применении ROC-анализа показателей чувствительности и специфичности прогнозирования неблагоприятных сердечно-сосудистых событий по фракции выброса, уровню натрийуретических пептидов и эндотелина-1 (рисунок 24) выявлена преимущественная прогностическая значимость биохимических показателей (эндотелина-1, MR-proANP, NT-proBNP).

Площадь под кривой (ROC-Area $\pm$ S.E.) для эндотелина-1 составила 0,73 $\pm$ 0,06 (95%ДИ 0,60-0,86, p=0,0175). Уровень эндотелина-1 более 619,3 пг/мл позволил с наибольшей вероятностью (чувствительность- 70,3%, специфичность- 77,8% прогнозировать неблагоприятные сердечно-сосудистые события у больных ИБС и постинфарктной ХСН.

Площадь под кривой (ROC-Area $\pm$ S.E.) для ФВ ЛЖ составила 0,69 $\pm$ 0,07(95%ДИ 0,55-0,83, p=0,0406), чувствительность- 70,3%, специфичность- 66,7%.

Площадь под кривой (ROC-Area $\pm$ S.E.) для циркулирующего MR-proANP составила 0,74 $\pm$ 0,07 (95%ДИ 0,60-0,89, p=0,0203), чувствительность- 96,4%, специфичность- 53,3% и позволяет рекомендовать уровень гормона $\geq$ 242,2 пг/мл в качестве показателя, ассоциирующегося с неблагоприятным прогнозом у больных ИБС.

Площадь под кривой (ROC-Area $\pm$ S.E.) для циркулирующего NT-proBNP 0,72 $\pm$ 0,06 (95%ДИ 0,60-0,86, $p=0,0208$), чувствительность- 64,7%, специфичность- 72,2% и позволяет рекомендовать уровень гормона более 498,6 пг/мл в качестве биохимического маркера неблагоприятного прогноза.

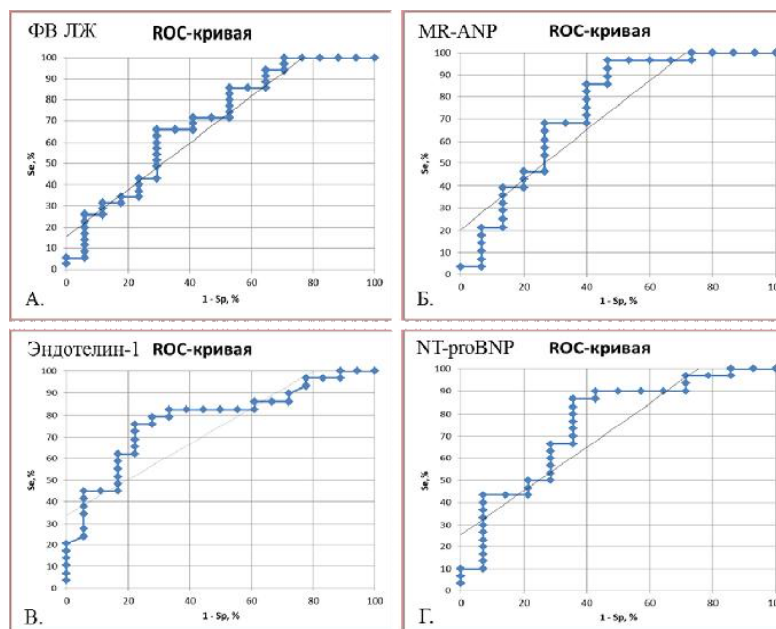


Рисунок 24 – Характеристическая кривая (ROC-кривая) чувствительности и специфичности значений ФВ ЛЖ (А), MR-proANP (Б), эндотелина-1(В) и NT-proBNP (Г) в неблагоприятном прогнозе течения ИБС

При оценке вероятности развития неблагоприятных сердечно-сосудистых событий (прогрессирование ХСН, повторный ИМ, летальность) все больные ХСН в зависимости от порогового уровня эндотелина-1 были разделены на две группы: 1-я группа (28 человек) - пациенты с уровнем гормона в сыворотке крови $\leq 619,3$ пг/мл, 2-я группа (27 человек) - пациенты с уровнем гормона в сыворотке крови $> 619,3$ пг/мл. Оказалось, что неблагоприятные сердечно-сосудистые события в течение проспективного наблюдения развились в 1-й группе у 19 (67,86%) пациентов, во 2-й группе - у 24 (88,89%) больных, ($p=0,0209$).

При оценке вероятности развития неблагоприятных сердечно-сосудистых событий (прогрессирование ХСН, повторный ИМ, летальность) все больные

ХСН в зависимости от значений ФВ ЛЖ были разделены на две группы: 1-я группа (24 человек) - пациенты с фракцией выброса $\geq 36,0\%$, 2-я группа (31 человек) - пациенты с фракцией выброса $< 36,0\%$. Оказалось, что вероятность развития неблагоприятных сердечно-сосудистых событий в течение проспективного наблюдения в 1-й группе была у 18 (75,0%) пациентов, во 2-й группе - у 25 (80,65%) больных, но не достигала уровня статистической значимости ($p=0,0819$).

При оценке вероятности развития неблагоприятных сердечно-сосудистых событий (прогрессирование ХСН, повторный ИМ, летальность) в зависимости от порогового уровня MR-proANP больные ХСН были разделены на две группы: 1-я группа (39 человек) - пациенты с уровнем пептида в сыворотке крови $\leq 242,2$ пг/мл, 2-я группа (16 человек) - пациенты с уровнем пептида в сыворотке крови $> 242,2$ пг/мл. Оказалось, что неблагоприятные сердечно-сосудистые события в течение проспективного наблюдения развились в 1-й группе у 32 (82,05%) пациентов, во 2-й группе - у 11 (68,75%) больных, ($p=0,0249$).

При оценке вероятности развития неблагоприятных сердечно-сосудистых событий (прогрессирование ХСН, повторный ИМ, летальность) все больные ХСН в зависимости от уровня NT-proBNP были разделены на две группы: 1-я группа (27 человек) - пациенты с уровнем пептида в сыворотке крови $\leq 498,6$ пг/мл, 2-я группа (28 человек) - пациенты с уровнем пептида в сыворотке крови $> 498,6$ пг/мл. Оказалось, что неблагоприятные сердечно-сосудистые события в течение проспективного наблюдения развились в 1-й группе у 20 (74,07%) пациентов, во 2-й группе - у 23 (82,14%) больных, ($p=0,0265$).

Кривые Каплана-Майера вероятности развития неблагоприятных сердечно-сосудистых событий в течение проспективного наблюдения в зависимости от величины фракции выброса и уровня циркулирующего MR-proANP, NT-proBNP и Эндотелина-1 представлены на рисунке 25.

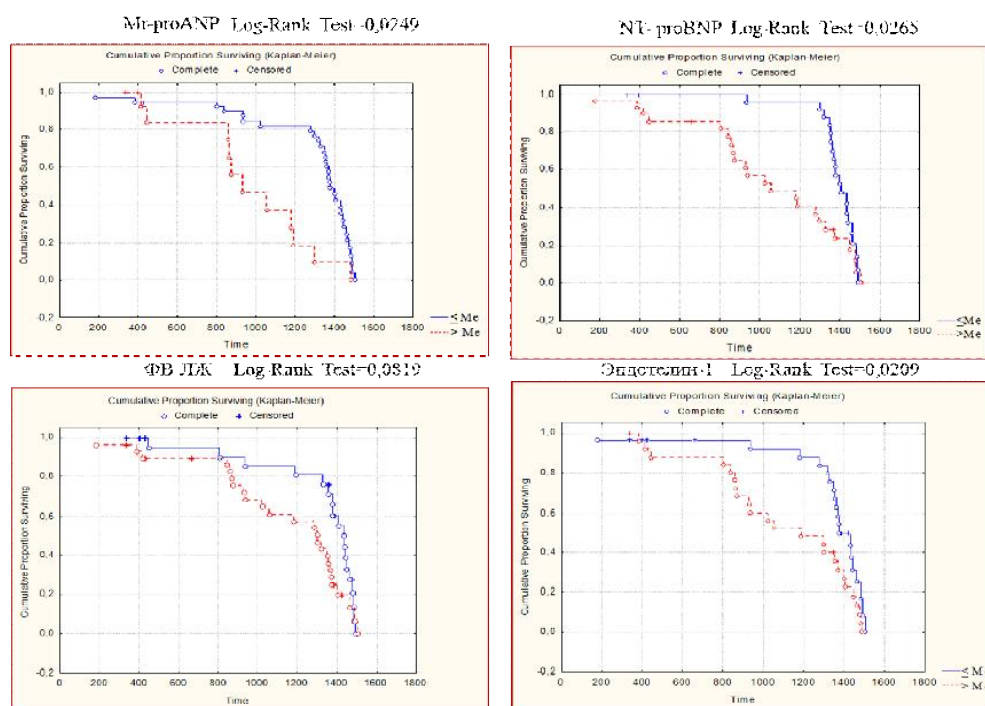


Рисунок 25 – Кривые Каплана-Майера вероятности развития неблагоприятных сердечно-сосудистых событий в течение проспективного наблюдения в зависимости от величины фракции выброса и уровня циркулирующего MR-proANP, NT-proBNP и эндотелина-1

Характеристические кривые (ROC-кривые) чувствительности и специфичности уровня мочевого кислоты и С-реактивного белка в неблагоприятном прогнозе представлены на рисунке 26.

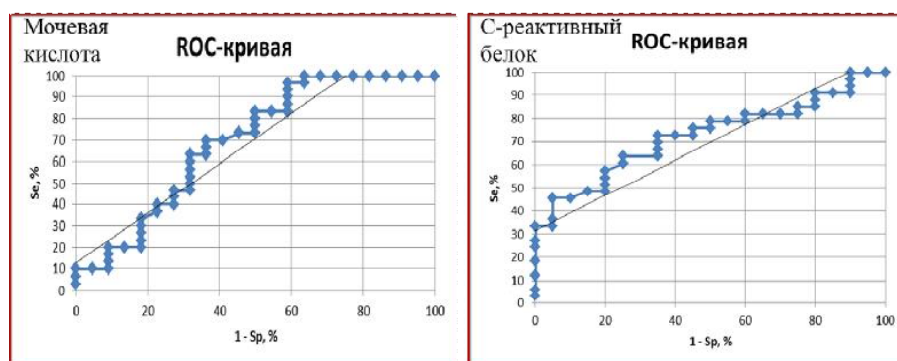


Рисунок 26 – Характеристическая кривая (ROC-кривая) чувствительности и специфичности значений мочевого кислоты и С-реактивного белка в неблагоприятном прогнозе течения ИБС

Площадь под кривой (ROC-Area $\pm$ S.E.) для мочевой кислоты составила 0,69 $\pm$ 0,07(95%ДИ 0,55-0,83, $p=0,0394$), чувствительность- 96,7%, специфичность- 40,9%; для С-реактивного белка 0,73 $\pm$ 0,07(95%ДИ 0,59-0,86, $p=0,0180$), чувствительность- 45,5%, специфичность- 95,0%. Таким образом, в проведенном исследовании результаты ROC-анализа не позволяют рекомендовать указанные биохимические показатели в качестве предикторов неблагоприятного прогноза у больных ИБС и сердечной недостаточностью сочетанной с СД2, хотя во многих популяционных исследованиях эти показатели ассоциировались с высокой смертностью от сердечно-сосудистых причин.

Резюме

Особенности клинического статуса больных с ХСН, включенных в данное исследование обусловлены как выраженностью гемодинамических нарушений, так и во многом наличием сопутствующей патологии, в частности, сахарного диабета и нарушения жирового обмена.

Как и следовало ожидать, мы обнаружили, что больные с ХСН в сочетании с СД2 в отличие от больных с ХСН без СД2, имели более низкую толерантность к физической нагрузке, более высокий функциональный класс сердечной недостаточности по классификации NYHA и ожирение различной степени. Метаболический профиль больных с ХСН и сопутствующим СД2 в сравнении с больными с ХСН без СД2 отличался статистически значимым снижением ХС ЛПВП, увеличением триглицеридов, С-реактивного белка и мочевой кислоты, что традиционно рассматривается как неблагоприятный фон для течения сердечной недостаточности и ИБС в целом.

Результаты сравнительного анализа показателей структурно-функционального состояния ЛЖ показали, что у больных с ХСН в сочетании с СД2 размер левого предсердия статистически значимо превышал таковой у больных с ХСН без диабета. Кроме этого у больных с ХСН в сочетании с СД2 значение соотношения пиковых скоростей периода раннего и позднего наполнения ЛЖ E/A и значение соотношения максимальной скорости раннего

наполнения ЛЖ к максимальной скорости движения фиброзного кольца митрального клапана в фазу быстрого наполнения ЛЖ E/e' были выше, чем у больных ХСН без диабета, что отражает большую выраженность диастолической дисфункции ЛЖ у больных сердечной недостаточностью на фоне диабета. Сравнительный анализ степени диастолической дисфункции ЛЖ у больных ХСН в сочетании с СД2 и больных ХСН без СД2 обнаружил более выраженную ДД ЛЖ (II-IV ст., в том числе, мерцательная аритмия) в группе больных ХСН, сочетающейся с СД2.

Важной ЭХО-КГ отличительной особенностью у больных ХСН, сочетанной с СД2 оказалось и то, что у больных III ФК в сравнении с больными II ФК наблюдали статистически значимо больший конечно-диастолический объем, индекс массы миокарда ЛЖ и значение соотношения E/e' , что отражает большую выраженность ремоделирования миокарда и большую выраженность ДД ЛЖ у больных с более тяжелой систолической сердечной недостаточностью. Полученные нами результаты были ожидаемы и свидетельствуют, что наличие сопутствующего СД2 у больных с ишемической ХСН ассоциируется с большей выраженностью ДД ЛЖ.

Выраженность ДД ЛЖ и гемодинамических нарушений в целом определяется типом ремоделирования и степенью нейрогуморальных сдвигов у больных ХСН на фоне коморбидной патологии, однако механизмы этих процессов в настоящее время окончательно не выяснены. Одна из задач нашего исследования состояла в сравнительном изучении натрийуретических гормонов и эндотелиновой системы у больных ХСН, сочетанной с диабетом.

Мы обнаружили, что уровень циркулирующего MR-proANP между больными ХСН и ХСН, сочетанной с диабетом не отличался. Однако, уровень циркулирующего NT-proBNP и эндотелина-1 у больных с ХСН, сочетанной с СД2 был выше (в 2 и 1,6 раза, соответственно), чем в группе больных с ХСН без СД2.

При оценке циркулирующих гормонов у больных с ХСН в зависимости от функционального класса NYHA оказалось, что уровень циркулирующего

MR-proANP в группе больных с ХСН без СД2 и ХСН в сочетании с СД2 не зависел от тяжести сердечной недостаточности.

Уровень циркулирующего NT-proBNP в группе больных ХСН II ФК и III ФК без сопутствующего СД2 не отличался. Внутри группы больных ХСН в сочетании с СД2 и подгруппой больных II ФК в сравнении с больными III ФК уровень NT-proBNP был статистически значимо ниже. При этом уровень циркулирующего NT-proBNP в подгруппе больных III ФК между группами больных ХСН в сочетании с СД2 в сравнении с больными ХСН без СД2 был статистически значимо выше в 3 раза.

Уровень циркулирующего эндотелина-1 в группе больных ХСН II ФК без СД2 был статистически меньше, чем у больных III ФК. В группе больных ХСН, сочетанной с СД2 уровень циркулирующего эндотелина-1 не зависел от тяжести сердечной недостаточности. Кроме этого мы обнаружили, что у больных в группе ХСН в сочетании с СД2 и подгруппе больных II ФК уровень циркулирующего эндотелина-1 был выше, чем в группе больных ХСН без сопутствующего диабета и подгруппе больных II ФК.

Таким образом, в нашем исследовании показано, что ХСН в сочетании с СД2 в отличие от ХСН без сопутствующего СД2, характеризуется более выраженными гемодинамическими нарушениями по данным ЭХО-КГ и более выраженными нейрогуморальными изменениями, характеризующимися увеличением в крови натрийуретических пептидов с увеличением тяжести систолической сердечной недостаточности и увеличением циркулирующего эндотелина-1 с увеличением выраженности диастолических нарушений ЛЖ.

Показана диагностическая значимость циркулирующих натрийуретических гормонов: уровень MR-proANP более 80,5 пг/мл и уровень NT-proBNP более 114,7 пг/мл ассоциируются с систолической сердечной недостаточностью. Тем не менее, оценка глобальной систолической функции методом ЭХО-КГ, в сравнении с оценкой циркулирующих натрийуретических пептидов по данным ROC-анализа показала большую диагностическую значимость. Вероятно, что уровень циркулирующих натрийуретических

гормонов зависит не только от тяжести сердечной недостаточности, но и от целого ряда других факторов, в том числе от сопутствующего нарушения жирового обмена [61,164, 302].

В результате проведенного нами исследования и согласно данным ROC-анализа установлено, что уровень циркулирующего эндотелина-1 более 503,7 пг/мл ассоциируется с диастолической дисфункцией ЛЖ и является более значимым биохимическим диагностическим тестом для диагностики ДД ЛЖ в сравнении с такими традиционными ЭХО-КГ показателями диастолической функции как соотношение E/e' и E/A .

Установлены важные прогностические параметры течения сердечной недостаточности и ишемической болезни сердца в целом. У больных с ХСН и неблагоприятным течением заболевания экспрессия мозгового натрийуретического пептида была значительно выше в сравнении с больными, у которых наблюдался благоприятный характер течения ИБС.

В ходе нашего исследования, так же как и в исследованиях других авторов, подтвердилась прогностическая значимость нейрогормонов MR-proANP, NT-proBNP и эндотелина-1 как независимых предикторов неблагоприятного течения сердечной недостаточности. Установлено, что повышенная экспрессия MR-proANP, NT-proBNP и эндотелина-1 у больных с ишемической дисфункцией ЛЖ и ХСН, сочетанной с СД2 являются предикторами неблагоприятного течения ХСН.

Результаты нашего исследования позволяют определить MR-proANP, NT-proBNP и эндотелина-1 как важные патофизиологические детерминанты, которые играют важную роль в патогенезе ХСН и оказывают существенное влияние на прогноз заболевания. Однако, наличие сопутствующего сахарного диабета у больных ХСН ассоциируется с несостоятельностью системы натрийуретических пептидов и хронической гиперэндотелинемией, которая сама по себе может усугублять сосудистые нарушения у больных ишемической ХСН.

ГЛАВА 6

МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ У БОЛЬНЫХ ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА КАК ФАКТОРЫ ОТЯГОЩЕННОГО ТЕЧЕНИЯ ИШЕМИЧЕСКОЙ ХРОНИЧЕСКОЙ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

6.1. Анализ композиционного состава тела и его клиническое значение у больных с ишемической хронической сердечной недостаточностью, ассоциированной с ожирением и сахарным диабетом 2 типа

В связи с увеличением общей продолжительности жизни и старением населения, увеличилось число пациентов, в том числе больных ИБС и сердечной недостаточностью, у которых два и более, сопутствующих заболеваний. Таким образом, сформировалась отдельная группа больных с коморбидной/мультиморбидной патологией. Несмотря на высокую распространенность и неблагоприятные прогностические последствия коморбидности [2, 3], научной обоснованности к разработке рекомендаций по лечению этих пациентов все еще не хватает.

Среди наиболее распространенных сопутствующих патологий у больных с сердечной недостаточностью является длительное ожирение.

Традиционно считается, что ожирение отягощает течение ХСН, поскольку избыток жировой массы в первую очередь увеличивает гемодинамическую нагрузку на сердце, вызывает мощные нейрогуморальные нарушения и как следствие - приводит к ремоделированию миокарда ЛЖ, а также развитию и прогрессированию ДСН. Помимо этого, хроническое нарушение насосной функции сердца неминуемо приводит к формированию хронической тканевой гипоксии, что может сопровождаться не только снижением эффективности липолиза, но и другим метаболическим нарушениям у больных ожирением.

По единичным сведениям показано, что у больных с ожирением, по мере его прогрессирования, выявлена активация энергетического обмена в виде возрастания удельных значений энерготрат покоя за счет повышения эффективности утилизации жиров мышечной тканью. Кроме этого, имеются данные о том, что для больных ожирением с клинически манифестной диастолической сердечной недостаточностью характерно более выраженное развитие скелетной мускулатуры по сравнению с больными без таковой и одновременно большая интенсивность окисления белков. По мнению авторов это означает, что потребности больных с ДСН в поступлении белков с пищей выше, и они нуждаются в увеличении квоты белка в рационе питания в среднем на 8-10%. Было выявлено, что, несмотря на развитие избытка мышечной массы у больных с ДСН, ее энергетические характеристики существенно ограничены, что выражается в снижении удельных энерготрат покоя и скорости окисления жиров на единицу мышечной массы, по сравнению с больными без ДСН. На этом основании авторы предположили, что сердечная недостаточность способствует прогрессированию ожирения вследствие развития нарушений энергетического обмена и метаболизма жиров [52].

Другой важной проблемой является вопрос о диагностической ценности натрийуретических пептидов и целесообразности их оценки у больных с ХСН и сопутствующим ожирением, поскольку до настоящего момента не определены оптимальные пороговые значения циркулирующих уровней гормонов у такой категории больных, что затрудняет, а в ряде случаев, даже искажает диагностику сердечной недостаточности и требует дополнительных исследований [360].

В последнее время появились отдельные сведения о том, что НУП обладают паракринной активностью и их физиологические эффекты намного шире, чем считалось ранее. Так, например, в жировой ткани в достаточном количестве экспрессируются рецепторы к предсердному и мозговому натрийуретическим пептидам, что в определенных условиях вызывает липолиз,

изменение секреции адипоцитокинов и их соотношение, а также стимулирует "browning" адипоцитов белой жировой ткани. Именно с усилением активности "бурых" адипоцитов ("бурой жировой ткани") связывают благоприятные метаболические эффекты НУП, поскольку бурой жировой ткани свойственны повышенная чувствительность к инсулину и толерантность к глюкозе, что препятствует увеличению массы тела, тем самым уменьшая риск развития диабета [164].

Сегодня появились единичные работы, в которых низкий уровень НУП в крови ассоциируются с диабетом и ожирением, что не согласуется с данными большинства эпидемиологических проспективных исследований, подтверждающих взаимосвязь между высоким уровнем НУП, тяжестью сердечной недостаточности и серьезным прогнозом как у больных без СД2, так и больных СД2 [211]. Таким образом, низкое содержание циркулирующих НУП может быть не только следствием, но и причиной ожирения и диабета [242]. Все это говорит о том, что в крупных исследованиях уделялось недостаточное внимание сопутствующим метаболическим нарушениям у больных ХСН и диктует необходимость более тщательного анализа данных и оценки НУП у такой категории больных в сопоставлении с результатами оценки композиционного состава тела. Все вышеизложенное представляется актуальной научной и клинической проблемой, поскольку затрагивает обособленную группу больных с систолической сердечной недостаточностью и диастолической дисфункцией миокарда ЛЖ в сочетании с ожирением и диабетом.

Отдельно следует подчеркнуть, что пациенты, различающиеся по композиционному составу тела, нуждаются не только в различных методиках диетотерапии [372], но и в целом требуют разработки стандартов комплексного лечения таких пациентов. Клинических сведений в этой области у данной когорты больных пока недостаточно.

Всем участникам исследования был выполнен композиционный анализ состава тела методом биоимпедансометрии. Результаты сравнительного анализа биоимпедансометрии в исследуемых группах представлены в таблице 22.

Таблица 22 – Результаты сравнительного анализа показателей биоимпедансометрии в исследуемых группах

Показатели	Группа сравнения, n=25 (1)	ХСН, n=30 (2)	ХСН+СД2, n=25 (3)	СД2, n=32 (4)	p Mann-Whitney U Test					
					1-2	1-3	1-4	2-3	2-4	3-4
ИМТ, кг/м ² Me (25% и 75%)	29,0 (24,2:32,0)	28,7 (24,9:32,3)	33,5 (31,2:35,3)	30,6 (28,0:34,8)	0,75	0,001	0,024	0,007	0,025	0,131
ИТБ, см	0,85±0,09	0,91±0,09	1,05±0,05	0,91±0,07	0,046	0,001	0,060	<0,001	0,879	<0,001
ЖМ, кг	26,03±8,7	24,45±14,9	33,25±9,49	34,01±10,66	0,340	0,176	0,058	0,005	0,003	0,839
ТМ, кг	54,3±8,4	55,5±10,3	69,8±11,9	53,4±11,8	0,592	0,003	0,698	<0,001	0,316	<0,001
АКМ, кг	29,8±6,7	31,5±7,5	38,6±12,5	31,2±8,8	0,538	0,011	0,965	0,021	0,489	0,028
СММ, кг	24,7±6,0	25,4±7,2	33,1±6,9	22,9±7,5	0,619	0,006	0,438	0,002	0,133	0,001
ОВО, л	39,8±6,2	40,6±7,6	51,1±8,7	39,1±8,6	0,605	0,003	0,682	<0,001	0,316	<0,001
ВКЖ, л	16,2±2,6	16,1±2,7	19,9±3,6	16,0±2,9	0,873	0,011	0,730	0,002	0,597	0,002
ИКЖ, л	23,6±3,9	24,5±5,1	31,3±5,2	23,1±6,2	0,438	<0,001	0,812	<0,001	0,249	<0,001

По полученным результатам было обнаружено, что в целом наибольшие значения антропометрических показателей (ИМТ, ИТБ), а также параметров компонентного состава тела имели больные диабетом (как в группе ХСН в сочетании с СД2, так и в группе СД2 без сердечной недостаточности).

Следует отметить, что в группе больных ХСН и сопутствующим СД2 в сравнении с больными группы ХСН без диабета, количество жировой массы (кг) статистически значимо было больше.

Исследование водного баланса показало, что в группе больных ХСН и сопутствующим СД2 в сравнении с больными ХСН без СД2 наблюдалось увеличение объемов ОВО, внеклеточной и внутриклеточной жидкости, что

характеризует общую гипергидратацию, застойные явления по большому кругу кровообращения и в целом, тяжесть сердечной недостаточности у больных ХСН и сопутствующим диабетом.

Показатели водных секторов у больных ХСН и сопутствующим СД2 подтверждают данные клинического обследования о преобладании в этой группе больных с III ФК NYHA и признаками более выраженной гипергидратации в сравнении с больными ХСН без СД2, в которой было больше больных со II ФК NYHA.

При оценке показателей биоимпедансометрии у больных с благоприятным и неблагоприятным течением, статистически значимых различий обнаружено не было.

В дальнейшем мы провели анализ циркулирующих НУП и эндотелина-1 у больных с постинфарктной ХСН в зависимости от выраженности нарушений жирового обмена. Для этого каждую из групп ХСН и ХСН, в сочетании с СД2 разделили на 2 подгруппы в зависимости от значений медианы ИМТ и сопоставили с концентрацией циркулирующих MR-ANP, NT-proBNP и эндотелина-1. Результаты сравнительного анализа циркулирующих MR-proANP, NT-proBNP и эндотелина-1 у больных ХСН в зависимости от ИМТ представлены в таблице 23.

Оказалось, что в группе больных ХСН без СД2 и подгруппе с ИМТ при значении $Me < 28,7 \text{ кг/м}^2$ (что соответствует нормальной и избыточной массе тела) в сравнении с подгруппой ИМТ при значении $Me \geq 28,7 \text{ кг/м}^2$ (что соответствует избыточному весу и ожирению) уровни циркулирующих MR-proANP и NT-proBNP статистически значимо были выше (корреляционная взаимосвязь ИМТ и уровнем MR-proANP и NT-proBNP составила $r = -0,40$, $p = 0,0283$ и $r = -0,35$, $p = 0,0610$, соответственно; корреляционная взаимосвязь между количеством жировой массы и уровнем MR-proANP и NT-proBNP составила $r = -0,47$, $p = 0,0309$ и $r = -0,46$, $p = 0,0354$, соответственно).

Таблица 23 – Результаты сравнительного анализа циркулирующих MR-proANP, NT-proBNP и эндотелина-1 у больных ХСН в зависимости от ИМТ

Показатели	ХСН, n=30		p Mann-Whitney U Test	ХСН+СД2, n=25		p Mann-Whitney U Test
	Me<28,7 кг/м ² n=14	Me≥ 28,7 кг/м ² n=16		Me< 33,5 кг/м ² n=10	Me≥ 33,5 кг/м ² n=15	
MR-proANP, пг/мл	234,4±163,2	109,9±47,6	0,005	259,5±205,6	230,8±119,7	0,956
NT-proBNP, пг/мл	728,7±702,5	438,7±526,5	0,019	1813,0±2027,6	1164,8±885,4	0,934
Эндотелин-1, пг/мл	570,0±195,1	541,1±168,9	0,724	741,6±256,3	995,8±740,4	0,697

В группе больных ХСН, при ее сочетании СД2 и подгруппах с ИМТ при значениях Me<33,5 кг/м² (что соответствует ожирению 1 степени) и Me≥33,5 кг/м², (что соответствует ожирению 1-2 степени), статистически значимых различий обнаружено не было, что, по-видимому, объясняется внутригрупповым преобладанием больных с ожирением, хотя в целом, уровни НУП были ниже в подгруппе с более выраженным ожирением. Статистически значимой корреляционной взаимосвязи ИМТ, жировой массы и циркулирующими концентрациями MR-proANP и NT-proBNP обнаружено не было (для ИМТ r=-0,30, p=0,1453 и r=-0,20, p=0,3248, соответственно; для жировой массы r=-0,46, p=0,1309 и r=-0,23, p=0,1832, соответственно).

Уровень циркулирующего эндотелина-1 в обеих группах больных ХСН не зависел как от индекса массы тела, так и от показателей композиционного состава тела.

Корреляционная связь показателей импедансометрии, циркулирующих MR-proANP, NT-proBNP, показателей структурно-функционального состояния ЛЖ и метаболического профиля у больных с ХСН без СД2 представлена в таблице 24.

Таблица 24 – Корреляционная связь показателей импедансометрии, циркулирующих MR-proANP, NT-proBNP, показателей структурно-функционального состояния ЛЖ и метаболического профиля у больных ХСН без СД2

Показатели	Spearman R	p
ИМТ, кг/м ² & MR-proANP, пг/мл	-0,40	0,028
ИМТ кг/м ² & NT-proBNP, пг/мл	-0,35	0,061
ЖМ, кг & MR-proANP, пг/мл	-0,47	0,030
ЖМ, кг & NT-proBNP, пг/мл	-0,46	0,035
ЖМ, кг & Инсулин, мкЕд/мл	0,68	0,008
ЖМ, кг & ЗСЛЖ, мм	0,50	0,028
АКМ, кг & ЗСЛЖ, мм	0,54	0,017
ОВО, л & MR-proANP, пг/мл	-0,45	0,040
ОВО, л & ЗСЛЖ, мм	0,54	0,015
Мочевая кислота, ммоль/л & MR-proANP, пг/мл	0,36	0,048
Мочевая кислота ммоль/л & NT-proBNP, пг/мл	0,37	0,047
ОХС, ммоль/л & E/e'	0,38	0,045
ХС ЛПВП, ммоль/л & МЖП, мм	-0,42	0,048
HbA1c, % & ФВ ЛЖ, %	-0,51	0,004
HbA1c, % & E/A	-0,39	0,045

В группе больных с ХСН без СД2, но в том числе, с ожирением обнаружены обратные слабые связи ИМТ, жировой массы и уровнем натрийуретических пептидов, что необходимо учитывать при лабораторной диагностике сердечной недостаточности у больных с ожирением; прямая сильная связь ЖМ и уровнем инсулина, что, по-видимому, может отражать вклад избытка жировой массы в развитие инсулиновой резистентности; прямая средняя связь ЖМ и общей воды в организме с толщиной задней стенки ЛЖ, что косвенно может свидетельствовать о гипертрофии и ремоделирования ЛЖ в результате перегрузки объемом при ожирении.

У больных с ХСН без СД2 обнаружена обратная средняя связь гликозилированного гемоглобина и фракции выброса ЛЖ и показателем ДД, что может отражать вклад гликозилирования белков межклеточного матрикса в развитие жесткости миокарда ЛЖ и последующей его дисфункции.

Помимо этого, обнаружены прямые слабые связи между уровнем мочевой кислоты и циркулирующей концентрацией натрийуретических пептидов, что вероятно, носит компенсаторный характер, нивелируя неблагоприятные эффекты мочевой кислоты, являющейся независимым предиктором неблагоприятного прогноза у больных сердечной недостаточностью.

Корреляционная связь показателей импедансометрии, циркулирующих MR-proANP, NT-proBNP, показателей структурно-функционального состояния ЛЖ и метаболического профиля у больных с ХСН в сочетании с СД2 представлена в таблице 25.

Таблица 25 – Корреляционная связь показателей импедансометрии, циркулирующих MR-proANP, NT-proBNP, показателей структурно-функционального состояния ЛЖ и метаболического профиля у больных с ХСН в сочетании с СД2

Показатели	Spearman R	p
ИМТ, кг/м ² & MR-proANP, пг/мл	-0,30	0,145
АКМ, кг & NT-proBNP, пг/мл	-0,61	0,033
ЖМ, кг & MR-proANP, пг/мл	-0,46	0,130
ИМТ, кг/м ² & МЖП, мм	0, 53	0,037
ИМТ, кг/м ² & ЗСЛЖ, мм	0,58	0,019
ОВО, л & МЖП, мм	0,79	0,059
ОХС, ммоль/л & ИММ ЛЖ	0,52	0,025
ОХС, ммоль/л & КДР, мм	0,72	0,002
ОХС, ммоль/л & КСР, мм	0,78	0,006
ОХС, ммоль/л & КДО, мл	0,53	0,043
ОХС, ммоль/л & КСО, мл	0,55	0,041
ОХС, ммоль/л & E/e'	0,38	0,045
ХС ЛПВП, ммоль/л & E/A	0,74	0,003
Триглицериды, ммоль/л & КСР, мм	0,68	0,004
Триглицериды, ммоль/л & КДР, мм	0,70	0,003
Триглицериды, ммоль/л & КСО, мл	0,49	0,075
Триглицериды, ммоль/л & КДО, мл	0,64	0,009
Мочевая кислота, ммоль/л & КСО, мл	0,65	0,015
ХС ЛПВП, ммоль/л & E/A	0,74	0,003
ХС ЛПВП, ммоль/л & ЗСЛЖ, мм	-0,48	0,064

У больных с ХСН в сочетании с СД2 и ожирением были обнаружены обратные слабые связи между ИМТ и АКМ и уровнем натрийуретических пептидов. Мы обнаружили умеренную прямую взаимосвязь ИМТ, общей воды организма и толщиной задней стенки ЛЖ и толщиной МЖП, что подтверждает вклад ожирения и перегрузки объемом в ремоделирование миокарда ЛЖ. Отдельно следует отметить прямые связи между показателями липидного обмена и морфо-функциональными характеристиками ЛЖ, что подтверждает вклад метаболических нарушений в развитие/прогрессирование сердечной недостаточности. Все это диктует необходимость более тщательного ведения таких пациентов, включая разработку индивидуальных диетических рекомендаций для каждого пациента с учетом композиционного состава его тела.

В объединенной группе больных с ХСН корреляционный анализ показал статистически значимые прямые связи слабой и средней силы MR-ANP и NT-proBNP с уровнем мочевой кислоты и СРБ (для MR-ANP $r=0,35$, $p=0,0134$ и $r=0,29$, $p=0,0447$, соответственно; для NT-proBNP $r=0,48$, $p=0,0003$ и $r=0,43$, $p=0,0016$, соответственно); статистически значимые прямые взаимосвязи слабой силы NT-proBNP с уровнем глюкозы плазмы натощак и гликированного гемоглобина ($r=0,37$, $p=0,0068$, и $r=0,33$, $p=0,0144$, соответственно); статистически значимые прямые взаимосвязи слабой силы эндотелина-1 с уровнем гликированного гемоглобина и С-пептида ($r=0,28$, $p=0,0409$, и $r=0,40$, $p=0,0044$, соответственно).

Полученные результаты корреляционного анализа позволяют говорить о наличии тесной связи натрийуретических пептидов, как корреляторов тяжести сердечной недостаточности с показателями углеводного обмена, обмена мочевой кислоты и СРБ, которые, согласно данным литературы, также являются самостоятельными независимыми предикторами неблагоприятного прогноза у больных ХСН и требуют более агрессивного ведения пациентов с нарушением углеводного и жирового обмена.

6.2. Циркулирующие адипоцитокины у больных с ишемической хронической сердечной недостаточностью и сопутствующим ожирением и сахарным диабетом 2 типа

Висцеральная жировая ткань в физиологических условиях является основным источником адипоцитокinov - активных пептидов с широким спектром биологических эффектов. Избыточное накопление висцеральной жировой ткани или эктопический жир (депозиты жировой ткани в области перикарда, печени, скелетной мускулатуры) у больных ожирением ассоциируются с инсулиновой резистентностью, толерантностью к глюкозе и высоким риском диабета 2 типа. Среди наиболее хорошо охарактеризованных адипоцитокinov с благоприятными эффектами на сердце и сосуды является адипонектин, который оказывает кардиопротективное действие, препятствует ремоделированию миокарда при перегрузке давлением и ишемическом повреждении. Предполагается, что механизмы действия адипонектина реализуются посредством активации АМФ-киназы, увеличения экспрессии VEGF, каталазы, супероксиддисмутазы (защита от оксидативного стресса, уменьшение апоптоза). В сосудах адипонектин проявляет противовоспалительные и антиатерогенные свойства как за счет подавления экспрессии воспалительных цитокинов и молекул адгезии в эндотелиальных клетках, так и подавления пролиферации гладкомышечных клеток и "даунрегуляции" скавенжер рецепторов [398, 399, 400].

По имеющимся клиническим сведениям у больных с ожирением циркулирующий адипонектин снижен, однако влияние нескольких сопутствующих патологий, в том числе, сердечной недостаточности и сахарного диабета изучено недостаточно и представляется актуальным, поскольку до сих пор не ясны механизмы взаимного отягощения этих заболеваний, а значит, не ясны причины недостаточной эффективности стандартной терапии у этой категории больных.

Учитывая нарушение жирового обмена у больных с постинфарктной ХСН, мы провели анализ циркулирующих адипоцитокинов: лептина, общего адипонектина, высокомолекулярного адипонектина и провоспалительных адипоцитокинов (резистина и IL-6) у всех больных, включенных в исследование.

Сравнительный анализ циркулирующих адипоцитокинов в обследованных группах представлен в таблице 26.

Таблица 26 – Сравнительный анализ циркулирующих адипоцитокинов в обследованных группах

Показатель	Группа сравнения, n=25 (1)	ХСН, n=30 (2)	ХСН+СД2, n=25 (3)	СД2, n=32 (4)	p1-2	p1-3	p1-4	p2-3	p2-4	p3-4
Лептин, пг/мл	22,1 [9,4 – 51,5]	23,3 [9,7 – 122,6]	75,3 [41,0 – 166,9]	30,5 [12,3 – 54,5]	0,406	0,002	0,121	0,068	0,690	0,078
Адипонектин Общий, нг/мл	29,6 [14,7 – 48,7]	61,4 [41,9 – 83,3]	47,2 [26,0 – 56,6]	22,1 [16,5 – 25,9]	0,005	0,082	0,401	0,110	0,001	0,012
ВМ Адипонектин, нг/мл	2881,3 [1717,3 – 3462,7]	1968,5 [1309,1 – 3146,7]	1897,4 [1384,9 – 2703,8]	1780,8 [675,5 – 2882,8]	0,268	0,185	0,068	0,631	0,243	0,526
Резистин, нг/мл	7,2 [5,3 – 10,1]	6,7 [4,8 – 9,3]	7,3 [5,0 – 9,9]	8,0 [7,5 – 10,1]	0,428	0,903	0,418	0,546	0,070	0,286
IL-6, пг/мл	0,72 [0,24 – 3,49]	2,90 [1,32 – 5,03]	2,93 [2,22 – 5,32]	1,44 [0,74 – 4,83]	0,109	0,031	0,219	0,664	0,331	0,073

Как следует из таблицы 26, наибольшие значения циркулирующего лептина обнаружены в группе больных ХСН и сопутствующим СД2 и больных СД2 без ХСН.

При анализе вариабельности значений лептина, мы обнаружили, что его уровень в крови коррелирует с индексом массы тела во всех обследованных группах, (рисунок 27).

Поэтому каждую группу больных разделили на подгруппы в зависимости от Ме ИМТ: в группе сравнения Ме ИМТ=29,0 кг/м², в группе ХСН Ме ИМТ=28,7 кг/м², в группе ХСН в сочетании с СД2 Ме ИМТ=33,5 кг/м², в группе больных диабетом Ме ИМТ=30,6 кг/м².

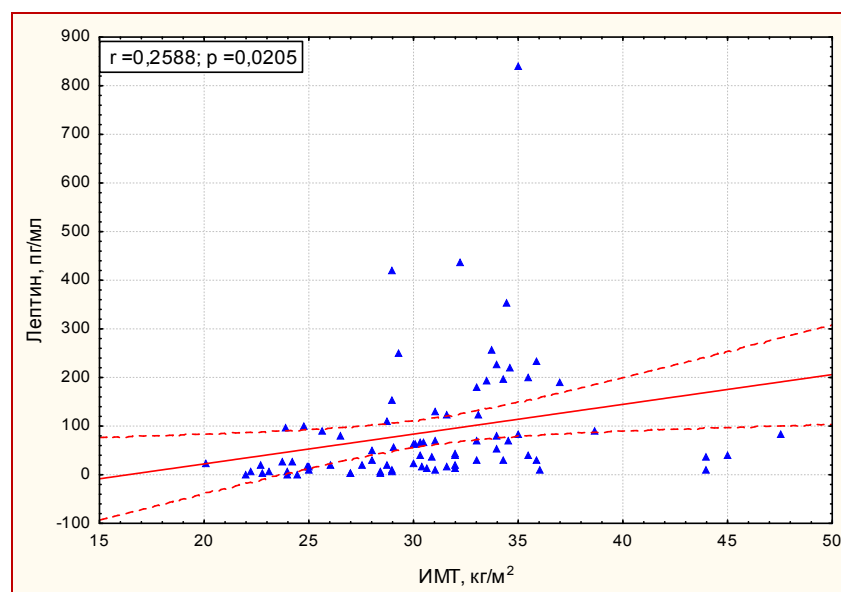


Рисунок 27 – Корреляционная связь лептина и индекса массы тела в целом по выборке

Уровень циркулирующего лептина в зависимости от медианы ИМТ в сравниваемых группах представлен на рисунке 28.

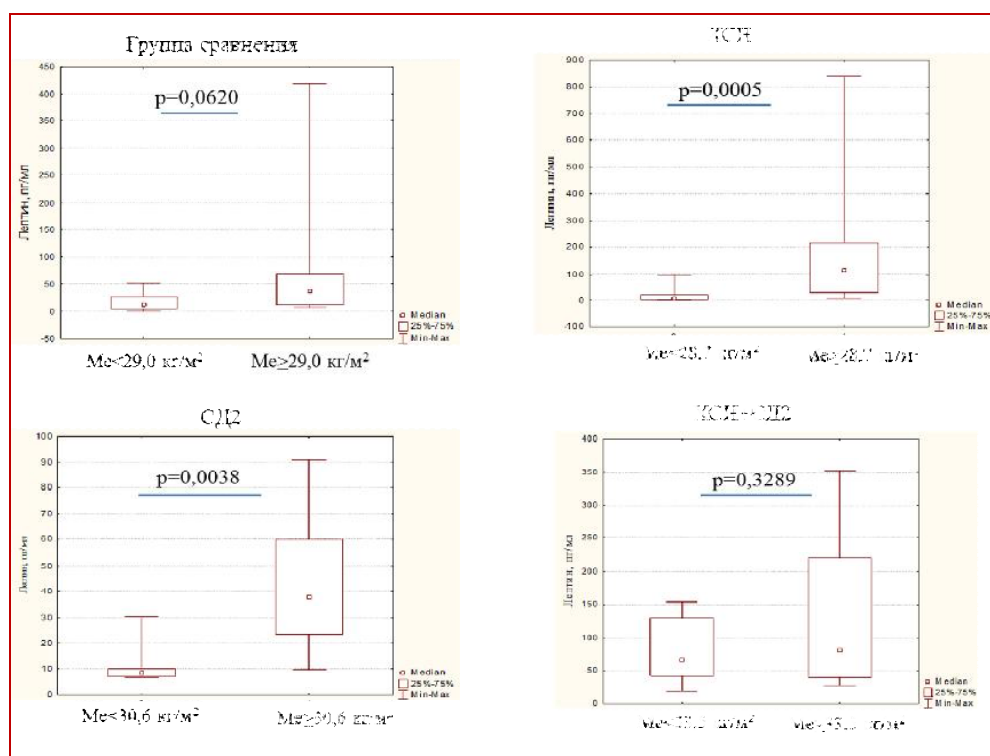


Рисунок 28 – Циркулирующий лептин в зависимости от медианы ИМТ в сравниваемых группах

Статистически значимые различия были обнаружены в группе больных ХСН без СД2 ($p=0,0005$) и группе больных СД2 без ХСН ($p=0,0038$); в группе сравнения наблюдали тенденцию к большему уровню лептина при значении $Me\ IMT \geq 29,0\text{ кг/м}^2$, чем при значении $Me\ IMT < 29,0\text{ кг/м}^2$ ($p=0,0620$). В группе больных с ХСН, в сочетании с СД2 статистически значимых различий не выявлено, что вероятно, обусловлено преобладанием в этой группе больных ожирением различной степени выраженности и меньшей вариабельностью ИМТ.

В обеих группах больных ХСН (ХСН и ХСН в сочетании с СД2), а также в объединенной группе больных ХСН уровень циркулирующего лептина не зависел от функционального класса сердечной недостаточности.

Уровень общего адипонектина у больных ХСН обеих групп II и III ФК статистически значимо не отличался, (рисунок 29).

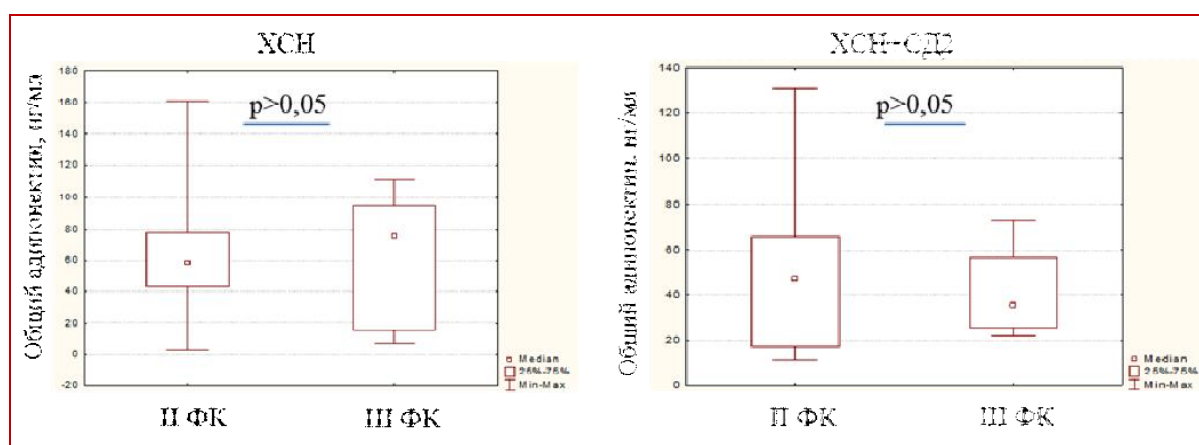


Рисунок 29 – Циркулирующий общий адипонектин
у больных с ХСН II и III ФК NYHA

Высокомолекулярная фракция адипонектина напротив, в целом была выше в группе сравнения, чем у больных ХСН, ХСН в сочетании с СД2 и СД2 без ХСН. У больных с ХСН и ХСН в сочетании с СД2 в зависимости от тяжести сердечной недостаточности уровень циркулирующего ВМ адипонектина был

выше у больных III ФК, чем у больных ХСН II ФК, однако различия не были статистически значимыми ($p=0,1586$ и $p=0,1910$, соответственно (рисунок 30)).

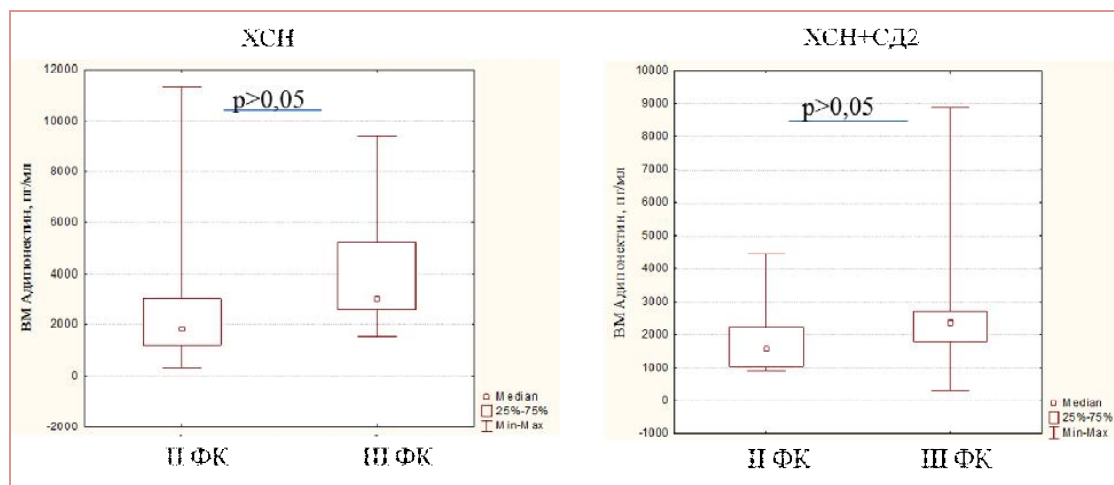


Рисунок 30 – Циркулирующий ВМ адипонектин у больных ХСН II и III ФК NYHA

При анализе общего и ВМ адипонектина мы также обнаружили взаимосвязь с ИМТ (рисунок 31).

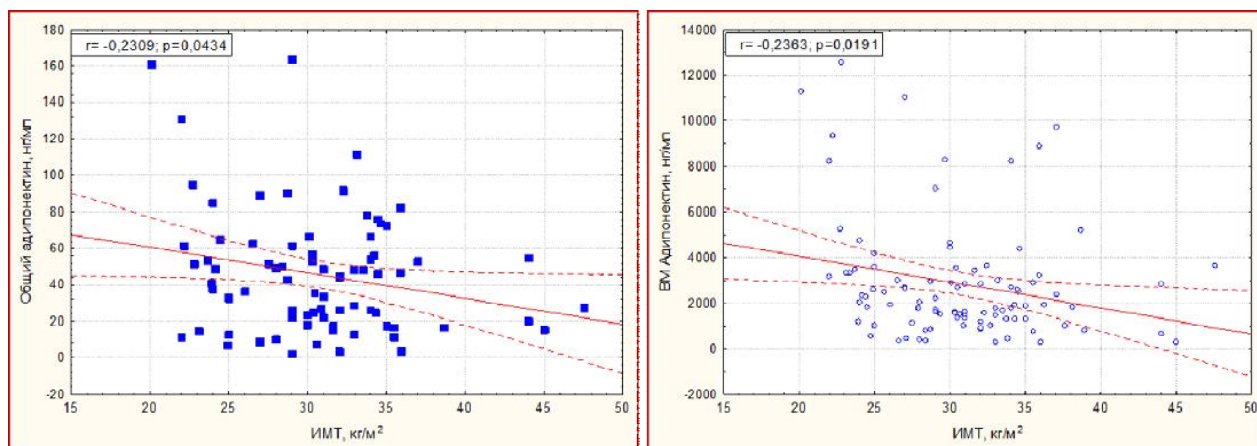


Рисунок 31 – Корреляционная связь общего и ВМ адипонектина и индекса массы тела в целом по выборке

При анализе общего адипонектина было обнаружено, что его циркулирующая концентрация у больных ХСН выше (и в большей степени у

больных ХСН без диабета) в сравнении с больными диабетом без сердечной недостаточности и группой сравнения, (рисунок 32).

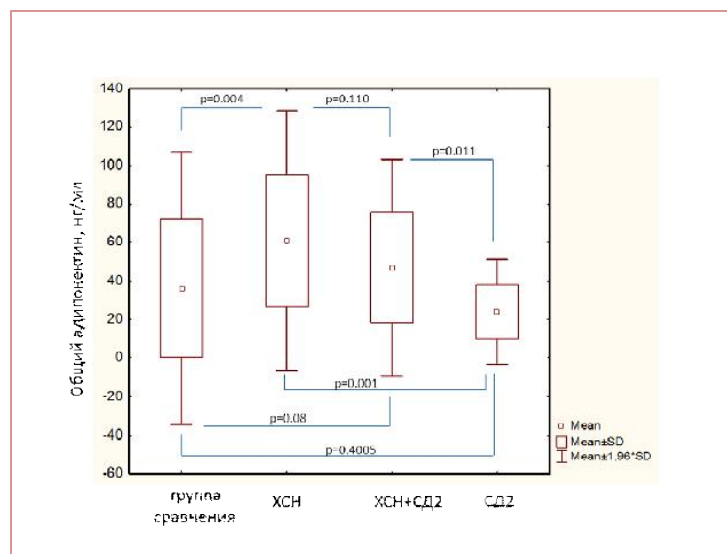


Рисунок 32 – Циркулирующий общий адипонектин в обследованных группах

При проведении ROC-анализа, оказалось, что циркулирующая концентрация общего адипонектина менее 33,3 пг/мл (чувствительность- 70,1%, специфичность- 76,1%) ассоциируется с ХСН (ROC-Area±S.E. составила $0,75 \pm 0,05$ (95%ДИ 0,64-0,87, $p=0,0023$)).

При сопоставлении общего адипонектина и ИМТ статистически значимых различий обнаружено не было, хотя в целом у всех обследованных групп наблюдалась тенденция к его снижению у лиц с избыточной массой тела и ожирением.

При оценке взаимосвязи циркулирующей концентрации ВМ адипонектина и ИМТ было обнаружено, что его содержание коррелирует с нарушением жирового обмена во всех обследованных группах (таблица 27).

Таблица 27 – Сравнительный анализ циркулирующего общего и ВМ адипонектина в обследованных группах в зависимости от медианы ИМТ

Показатели	Группа сравнения n=25		p Mann-Whitney U Test	ХСН n=30		p Mann-Whitney U Test	ХСН+СД2 n=25		p Mann-Whitney U Test	СД2 n=32		p Mann-Whitney U Test
	<29 кг/м ²	>29 кг/м ²		< 28,7 кг/м ²	> 28,7 кг/м ²		< 33,5 кг/м ²	> 33,5 кг/м ²		< 30,6 кг/м ²	> 30,6 кг/м ²	
Общий адипонектин, пг/мл	38,0±46,6	34,2±18,8	0,477	63,5±41,6	58,7±29,1	0,722	50,9±37,3	44,5±23,3	0,964	30,0±28,2	23,0±12,1	0,538
ВМ адипонектин, пг/мл	3915,8±3171,7	2580,5±1752,3	0,112	4393,5±3774,1	1920,1±982,3	0,021	2902,0±2722,0	2739,1±2499,9	0,159	2724,6±2310,3	1918,2±2297,1	0,164

ROC-анализ не позволил выявить ассоциации между уровнем ВМ адипонектина и сердечной недостаточностью (ROC-Area±S.E. для ВМ адипонектина составила 0,50±0,05 (95%ДИ 0,50-0,62, p=0,4899)).

Уровень циркулирующего резистина в исследуемых группах статистически значимо не отличался; циркулирующий IL-6 в целом у больных диабетом, был выше, чем в группе сравнения и больных сердечной недостаточностью без диабета (различия не достигали статистической значимости).

Корреляционный анализ взаимосвязи циркулирующих адипоцитокинов, натриуретических пептидов и структурно-функциональных показателей ЛЖ у больных ХСН представлен в таблице 28.

У больных с ХСН без СД2 была обнаружена прямая слабая связь циркулирующего лептина с уровнем инсулина, что может отражать состояние инсулинорезистентности при гиперлептинемии у больных с ХСН, особенно в сочетании с ожирением. Показана прямая связь между уровнем циркулирующего лептина и ИМТ и жировой массой тела; прямая корреляционная зависимость между уровнем циркулирующего ВМ адипонектина и циркулирующим MR-proANP; обратная слабая связь ВМ адипонектина и толщиной задней стенки ЛЖ; обнаружена обратная слабая связь между количественным содержанием циркулирующего ВМ адипонектина

и ИМТ и жировой массой тела. Обнаружена прямая слабая связь общего адипонектина и ВМ адипонектина с уровнем ХС ЛПВП; обратная связь средней силы между уровнем общего адипонектина и концентрацией мочевой кислоты. Показана прямая слабая связь между уровнем циркулирующего резистина и циркулирующими MR-proANP и NT-proBNP; обнаружена прямая слабая связь между содержанием резистина и размерами левого предсердия и толщиной межжелудочковой перегородки, что может отражать вклад резистина в развитие гипертрофии миокарда.

Таблица 28 – Корреляционная связь циркулирующих адипоцитокинов, MR-ANP, NT-proBNP, структурно-функциональных показателей ЛЖ и показателей метаболического профиля у больных с ХСН без СД2

Показатели	Spearman R	p
Лептин пг/мл & MR-proANP, пг/мл	-0,35	0,060
Лептин пг/мл & NT-proBNP, пг/мл	-0,34	0,070
Лептин пг/мл & Инсулин, мкЕд/мл	0,44	0,016
Лептин пг/мл & ИМТ, кг/м ²	0,60	0,004
Лептин пг/мл & ЖМ, кг	0,56	0,011
ВМ Адипонектин нг/мл & MR-proANP, пг/мл	0,43	0,021
ВМ Адипонектин нг/мл & ЗСЛЖ, мм	-0,45	0,019
ВМ Адипонектин нг/мл & ИМТ, кг/м ²	-0,43	0,024
ВМ Адипонектин нг/мл & ЖМ, кг	-0,46	0,040
ВМ Адипонектин нг/мл & ХС ЛПВП, ммоль/л	0,46	0,024
Общий адипонектин нг/мл & ХС ЛПВП, ммоль/л	0,44	0,031
Общий адипонектин нг/мл & мочевая кислота, ммоль/л	-0,60	0,009
Резистин нг/мл & MR-proANP, пг/мл	0,44	0,016
Резистин нг/мл & NT-proBNP, пг/мл	0,32	0,094
Резистин нг/мл & ЛП, мм	0,42	0,029
Резистин нг/мл & МЖП, мм	0,39	0,047
Резистин нг/мл & 6-минутная ходьба, м	-0,43	0,041
Триглицериды, ммоль/л & мочевая кислота, ммоль/л	0,48	0,008
ХС ЛПНП, ммоль/л & мочевая кислота, ммоль/л	0,45	0,011

В группе больных с ХСН в сочетании с СД2 обнаружена прямая слабая корреляционная связь ВМ адипонектина и MR-proANP; показана корреляция средней силы между циркулирующим уровнем ВМ адипонектина и размером левого предсердия; обнаружена средняя корреляционная связь между концентрацией ВМ адипонектина и уровнем триглицеридов плазмы; обнаружены обратные слабые связи между уровнем общего адипонектина и количеством общего холестерина и триглицеридов. Показана прямая слабая корреляционная связь между циркулирующим IL-6 и циркулирующим MR-proANP; обратная слабая корреляция IL-6 и фракцией выброса ЛЖ; обнаружена прямая слабая связь между уровнем циркулирующего резистина и натрийуретическими пептидами MR-proANP и NT-proBNP; выявлена прямая сильная корреляционная связь между уровнем резистина и мочевой кислоты; прямая слабая связь между уровнем резистина и КСО и обратная связь с фракцией выброса ЛЖ, (таблица 29).

Таблица 29 – Корреляционная связь циркулирующих адипоцитокинов, MR-ANP, NT-proBNP, структурно-функциональных показателей ЛЖ и показателей метаболического профиля у больных с ХСН и сопутствующим СД2

Показатели	Spearman R	p
Лептин, пг/мл & NT-proBNP, пг/мл	-0,46	0,061
ВМ Адипонектин, нг/мл & MR-proANP, пг/мл	0,45	0,044
ВМ Адипонектин, нг/мл & Эндотелин-1, пг/мл	0,47	0,036
ВМ Адипонектин, нг/мл & Инсулин, мкЕд/мл	-0,43	0,074
ВМ Адипонектин, нг/мл & Объем ЛП, мм	0,64	0,007
ВМ Адипонектин, нг/мл & триглицериды, ммоль/л	-0,64	0,004
Общий адипонектин, нг/мл & ОХС, ммоль/л	-0,47	0,054
Общий адипонектин, нг/мл & триглицериды, ммоль/л	-0,61	0,009
IL-6 нг/мл & MR-proANP, пг/мл	0,50	0,034
IL-6 нг/мл & ФВ ЛЖ, %	-0,57	0,013
Резистин нг/мл & MR-proANP, пг/мл	0,52	0,031
Резистин, нг/мл & NT-proBNP, пг/мл	0,52	0,032
Резистин, нг/мл & мочевая кислота ммоль/л	0,73	0,002
Резистин, нг/мл & КСО, мл	0,53	0,043
Резистин, нг/мл & ФВ ЛЖ, %	-0,49	0,046
Резистин, нг/мл & 6-минутная ходьба, м	-0,51	0,048
ХС ЛПНП ммоль/л & мочевая кислота, ммоль/л	0,40	0,079

В объединенной группе больных с ХСН выявлены статистически значимые слабые прямые корреляционные связи циркулирующих лептина и инсулина ($r=0,43$, $p=0,0034$); лептина, объема и размера ЛП ($r=0,35$, $p=0,0025$ и $r=0,33$, $p=0,0044$, соответственно); циркулирующих ВМ адипонектина и MR-proANP ($r=0,42$, $p=0,0030$); циркулирующих резистина и MR-proANP и NT-proBNP ($r=0,51$, $p=0,0002$ и $r=0,41$, $p=0,0044$, соответственно); IL-6 и СРБ ($r=0,38$, $p=0,0213$); обратная слабая связь IL-6 и ФВ ЛЖ ($r=-0,34$, $p=0,0286$); обратные слабые связи между ВМ адипонектином и уровнем триглицеридов ($r=-0,34$, $p=0,0222$); обратные слабые связи между ВМ адипонектином и ЗС ЛЖ ($r=-0,33$, $p=0,0312$); обратная слабая связь ИМТ и ВМ адипонектина ($r=-0,33$, $p=0,0205$); обнаружена обратная слабая связь ИТБ и ВМ адипонектина ($r=-0,40$, $p=0,0371$); обратная слабая связь жировой массы и ВМ адипонектина ($r=-0,44$, $p=0,0110$); выявлена прямая взаимосвязь ХС ЛПВП и общим и ВМ адипонектином ($r=0,34$, $p=0,0273$ и $r=0,33$, $p=0,0320$, соответственно); обнаружена обратная слабая связь триглицеридов и общим и ВМ адипонектином ($r=-0,35$, $p=0,0168$ и $r=-0,34$, $p=0,0222$, соответственно).

У больных с благоприятным и неблагоприятным течением постинфарктной хронической сердечной недостаточности статистически значимых различий по уровню циркулирующих адипоцитокинов обнаружено не было.

Резюме

Ожирение у больных с ХСН носит сложный этиопатогенез, который на данный момент окончательно не выяснен, и представляет собой важный научный и клинический интерес, поскольку нарушение жирового обмена является одним из факторов отягощенного течения сердечной недостаточности. Вместе с тем, механизмы, лежащие в основе отягощения, прогрессирования ХСН и других ССЗ при ожирении до конца не изучены.

В исследуемой выборке у подавляющего большинства больных с ХСН, методом антропометрии и согласно анамнестическим данным, диагностировано

длительно существующее нарушение жирового обмена от избыточного веса до ожирения различной степени выраженности. Наибольший показатель индекса массы тела был в группе больных ХСН, сочетанной с СД2 и соответствовал ожирению 1-2 степени.

Следует отметить, что применение индекса массы тела на популяционном уровне позволяет оценивать риски заболеваемости и смертности для большинства мультифакториальных, в том числе алиментарно-зависимых заболеваний. Но на индивидуальном уровне ИМТ не всегда корректно отражает степень жировотложения, поскольку высокие индивидуальные значения ИМТ сами по себе не могут служить критерием ожирения. Помимо этого, существенные изменения ИМТ могут быть обусловлены повышенной гидратацией тканей. Задачи подобного рода позволяет решить метод оценки состава тела - биоимпедансометрия.

Согласно полученным нами результатам биоимпедансометрии, у больных ХСН и сопутствующим СД2 в сравнении с больными ХСН без СД2 количество жировой массы (кг) в среднем на 15,6% было больше.

В поисках связи между нарушением жирового обмена и тяжестью сердечной недостаточности мы сопоставили количество жировой и тощей массы, а также ИМТ с уровнем циркулирующих натрийуретических пептидов.

У больных в группе с ХСН без СД2, но сопутствующим избыточным весом и ожирением в сравнении с больными ХСН и нормальным весом уровень циркулирующего MR-proANP был снижен в 2 раза, NT-proBNP в 1,7 раза. Эти результаты были подтверждены данными корреляционного анализа, продемонстрировавшего наличие обратной средней связи между ИМТ, количеством жировой массы и концентрацией НУП в крови. У больных в группе ХСН, сочетанной с СД2 и выраженным ожирением также наблюдали снижение циркулирующих НУП в сравнении с больными ХСН и СД2 и ожирением 1 степени, хотя эти различия не достигали уровня статистической значимости.

Согласно ограниченным на данный момент исследованиям, причинами такого снижения НУП может являться повышение скорости клубочковой фильтрации и увеличение клиренса пептидов у пациентов с ожирением, а также уменьшение в условиях гиперинсулинизма при ожирении экспрессии адипоцитами рецепторов натрийуретических гормонов, что может ослаблять или нивелировать биологические эффекты натрийуретических гормонов.

Было высказано мнение, что пороговые значения НУП для диагностики ХСН в сочетании с ожирением должны быть ниже, чем для пациентов с нормальным весом. Так, например, общепринятое значение BNP 100 пг/мл дает до 20% ложно отрицательных результатов. Поэтому для больных с ИМТ > 35 кг/м² пороговое значение BNP должно быть уменьшено до ≤54 пг/мл, а для больных с ИМТ < 25 кг/м² значение мозгового натрийуретического пептида должно быть увеличено до ≥170 пг/мл. При этом, в противоположность BNP, значение NT-proBNP < 300 пг/мл сохраняет прогностическое значение в отношении неблагоприятного сердечно-сосудистого прогноза для больных ХСН с избыточным весом или ожирением [360].

Полученные нами результаты оценки циркулирующих НУП свидетельствуют об их снижении у больных с ХСН в сочетании с ожирением, а результаты импедансометрии подтверждают задержку жидкости и большую выраженность отека у больных с ХСН и сопутствующим СД2 и ожирением и согласуются с результатами других исследователей. Из вышесказанного следует, что уменьшение натрийуретических гормонов в крови при ожирении сопровождается повышенной задержкой натрия и воды, что клинически проявляется более ранним появлением одышки, независимо от тяжести дисфункции ЛЖ. В этой связи оценку НУП у больных ХСН в сочетании с ожирением целесообразно проводить под контролем жировой массы и водного обмена методом импедансометрии.

Оценка и поддержание оптимального водного баланса для больного сердечной недостаточностью имеет колоссальное значение, поскольку отражает

не только тяжесть клинических проявлений, но и адекватность проводимой патофизиологической терапии. В рутинной практике оценка водного баланса проводится по соотношению между выпитой за сутки жидкостью и количеством выделенной мочи, что сопряжено с техническими неудобствами для пациента, включая ведение дневника и субъективной оценкой результатов исследования. В данном случае биоимпедансометрия у больных с ССЗ, особенно у больных с ХСН в сочетании с ожирением, нарушением углеводного обмена, включая диабет, в первую очередь позволяет объективно выявить не только нарушение жирового и белкового обмена, но и выработать индивидуальные диетические рекомендации по коррекции алиментарных факторов риска сердечно-сосудистых осложнений, определяющих клиническое течение и прогноз больных ХСН. Во-вторых, дает объективную оценку водного баланса, включая перераспределение жидкости в водных секторах организма (внутри и внеклеточная жидкость), что, несомненно, облегчает подбор диуретической и лекарственной терапии в целом у больных ХСН, а также позволяет проводить контроль изменений гидратации как побочного эффекта применения лекарственных препаратов. Таким образом, полученные нами результаты свидетельствует о целесообразности включения импедансометрии в стандартный алгоритм обследования больных с ХСН.

Дальнейшие наши исследования были направлены на количественную оценку циркулирующих адипоцитокинов и их клиническую значимость у больных ХСН, в сочетании с СД2 и нарушением жирового обмена.

Предпосылкой этому послужили данные экспериментальных и пока еще немногочисленных клинических исследований, продемонстрировавших роль адипоцитокинов [401] как факторов, модулирующих углеводный и жировой обмен и причастных к развитию диабета, ожирения, ИБС, большинства ССЗ в механизмах развития которых, лежит важное общее звено патогенеза - инсулиновая резистентность (ИР).

В клинической практике золотым стандартом для оценки ИР является клэмп-тест, однако его проведение возможно только в специализированных учреждениях. По этой причине чаще применяются суррогатные методы оценки ИР, такие как НОМА-индекс или индекс Matsuda, рассчитанные на результатах оценки уровня глюкозы натощак и уровня иммунореактивного инсулина. Однако, у многих больных уровень глюкозы и инсулина подвержены значительным колебаниям в зависимости от ряда факторов, в том числе от принимаемых препаратов (например, β -блокаторы способны вызывать гипергликемию, инсулин и пероральные сахароснижающие препараты у больных диабетом модулируют уровень ИРИ и не позволяют объективно оценить истинные его значения. В последнее время стало известно, что адипоцитокнины могут быть новыми молекулярными коррелятами инсулиновой резистентности.

Одним из первых адипоцитокнинов жировой ткани в литературе был описан лептин. Позднее был идентифицирован рецептор лептина и его полиморфные варианты, документирована их связь с ожирением [85, 91, 266]. Несмотря на достаточное количество сведений, относительно биологических эффектов лептина, клинические исследования лептина у больных ХСН ограничены, а интерпретация результатов противоречива.

Согласно литературным данным, в крови уровень лептина у худощавых индивидов составляет от 5 - до 15 нг/мл; у лиц с ожирением его концентрация может увеличиваться до 50 нг/мл [154].

Лептин секретируется не только адипоцитами, но и другими клетками, включая кардиомиоциты и гладкомышечные клетки сосудов. Рецептор Ob-Rb обнаружен не только в сердце, но и в гладкомышечных и эндотелиальных клетках коронарных сосудов и сосудов мозга, в гепатоцитах, клетках почек, поджелудочной железы и в миометрии. Таким образом, лептин является плейотропным гормоном, оказывающим влияние на сердечно-сосудистую, нервную, иммунную и репродуктивную системы организма.

По современным представлениям связывание лептина с Ob-Rb рецептором, который представляет собой длинную изоформу рецептора Ob-R и ответственный за внутриклеточные эффекты лептина, активирует ряд сигнальных каскадов, таких как JAK, STAT, субстрат инсулинового рецептора и MAPK. В сердце лептин-активированная внеклеточная регуляторная киназа (ERK) и фосфатидилинозитол-3 киназа (PI3K) являются ключевыми для пролиферации кардиомиоцитов и защиты миокарда от ишемии и реперфузии [333, 348]. У крыс лептин-индуцированная p38 MAPK ассоциируется с гипертрофией и программируемой гибелью кардиомиоцитов и гладкомышечных клеток сосудов. По данным некоторых исследователей обнаружена взаимосвязь между лептином и Rho сигналингом, согласно которым активация RhoA/ROCK сигнального каскада приводит к уменьшению G-актина, способствует гипертрофии и ремоделированию сосудистой стенки в целом [272, 410]. Результаты большинства экспериментальных исследований, свидетельствуют, что лептин действует как прогипертрофический, прогипертензивный, проатерогенный и ангиогенный фактор [190, 272, 410].

По отдельным клиническим сведениям, у больных ожирением и артериальной гипертензией в отличие от нормотензивных лиц с нормальным весом масса миокарда ЛЖ коррелирует с уровнем циркулирующего лептина и не зависит от возраста, пола, ИМТ, НОМА-индекса, уровня глюкозы и инсулина. [292]. По данным других исследователей у больных артериальной гипертензией с нормальным весом масса миокарда ЛЖ также коррелирует с уровнем лептина. Высказано предположение, что длительная гиперлептинемия оказывает прогипертрофическое действие посредством стимуляции симпатической нервной системы, которая, как известно, вовлечена в патогенез артериальной гипертензии [284]. Было показано, что внутривенное введение лептина повышает артериальное давление и частоту сердечных сокращений [88]. Данные о клинической значимости лептина у больных ХСН крайне ограничены.

Нами установлено, что уровень циркулирующего лептина коррелирует с ожирением во всех обследованных группах. Наибольшая его концентрация отмечалась у больных с ХСН, сочетанной с диабетом, что, по-видимому, объясняется преобладанием в этой группе больных с нарушением жирового обмена. Интересными и взаимодополняющими оказались результаты корреляционного анализа, продемонстрировавшего не только прямую связь циркулирующего лептина с ИМТ и жировой массой, но и обратную взаимосвязь с уровнем MR-proANP, NT-proBNP. Подобные связи мы наблюдали между ИМТ, жировой массой и натрийуретическими пептидами. Из полученных результатов можно заключить, что циркулирующий лептин является коррелятом жировой массы и ассоциируется, так же как ожирение, со снижением циркулирующих натрийуретических пептидов, что может частично объяснять отягощенный характер течения сердечной недостаточности у больных с ожирением.

Кроме этого, у больных с ХСН мы обнаружили прямые корреляционные связи между уровнем лептина, размером и объемом ЛП, что может отражать вклад лептина в развитие гипертрофии и ремоделирования миокарда.

Исходя из полученных результатов, можно предполагать, что у больных с ХСН, сочетанной с ожирением низкий уровень НУП, проявляющих ряд благоприятных компенсаторных эффектов на сердечно-сосудистую систему, оказывается недостаточным, чтобы противостоять более высокой активности контргормонов (ренина, ангиотензина II, альдостерона, катехоламинов, эндотелина-1), оказывающих неблагоприятные эффекты на миокард и сосуды.

Адипонектин секретируется адипоцитами белой и бежевой жировой ткани. У здоровых лиц с нормальным весом концентрация адипонектина в сыворотке составляет от 5 до 30 мкг/мл [63, 346, 347].

Известно, что адипонектин существует в трех олигомерных формах: с низким, средним и высоким молекулярным весом. Высокомолекулярная форма адипонектина является функционально активной и связывается с тремя типами

рецепторов (AdipoR1, AdipoR2 и T-кадгерин). AdipoR1 экспрессируются преимущественно в клетках сердца и сосудов, в отличие от AdipoR2, который высоко экспрессируется в печени [399]. Связываясь с рецепторами, адипонектин активирует такие сигнальные пути как AMPK и PPAR- α , модулирует глюконеогенез и окисление жирных кислот [358, 398].

Показано, что делеция AdipoR1 блокирует адипонектин-опосредованную реакцию фосфорилирования AMPK, тогда как делеция гена AdipoR2 способствует увеличению жировой массы и нарушению толерантности к глюкозе; было высказано предположение, что это происходит за счет стимуляции глюконеогенеза [400]. Кроме этого, у AdipoR2- дефицитных мышей продемонстрировано нарушение адипонектин-опосредованной активации PPAR- α и в отличие от AdipoR1-дефицитных мышей показана устойчивость к развитию диет-индуцированной толерантности к глюкозе. Однако, делеция обоих типов рецепторов AdipoR1 и AdipoR2 приводит к развитию инсулиновой резистентности и нарушению углеводного обмена по типу нарушенной толерантности к глюкозе [400].

T-кадгерин экспрессируется в тех же органах и клетках, что и адипонектин- в сердце, гладкомышечных и эндотелиальных клетках [349]. Показано, что T-кадгерин экспрессируется в миокарде в избытке, оказывая кардиопротективное действие, предупреждая ремоделирование при его ишемическом повреждении. При этом у мышей, дефицитных по гену T-кадгерина, наблюдается увеличение уровня циркулирующего адипонектина, что обусловлено уменьшением связывания адипонектина с этим рецептором [119].

Результаты экспериментальных исследований позволяют заключить, что адипонектин оказывает ряд благоприятных эффектов на сердце и сосуды. Так, в сердце адипонектин, активируя AMPK, COX-2 и напротив, ингибируя Nf- κ B, TNf- α сигнальные пути, препятствует гипертрофии миокарда, апоптозу

кардиомиоцитов, уменьшает воспаление и реакции оксидативного стресса [246, 324, 325].

В сосудах адипонектин оказывает антипролиферативное действие на гладкомышечные клетки, стимулирует продукцию оксида азота эндотелиальными клетками, уменьшает выраженность эндотелиальной дисфункции, регулирует тонус сосудов, оказывает антитромбогенное, антиатеросклеротическое и противовоспалительное действие [140, 382, 401]. Данные клинических исследований циркулирующего адипонектина у больных с сердечной недостаточностью и коморбидной патологией крайне немногочисленны и противоречивы.

Согласно полученным нами результатам, во всех обследованных группах и подгруппах больных со значениями медианы ИМТ, соответствующих избыточному весу или ожирению I-II степени (в группе сравнения ≥ 29 кг/м²; в группе ХСН без СД2 $\geq 28,7$ кг/м²; в группе ХСН в сочетании с СД2 $\geq 33,5$ кг/м² и группе больных СД2 без ХСН $\geq 30,6$ кг/м² установлено снижение циркулирующего общего адипонектина и циркулирующего высокомолекулярного адипонектина. Статистически значимое снижение высокомолекулярного адипонектина выявлено у больных с ХСН без СД2.

При применении ROC-анализа было показано, что уровень общего адипонектина менее 33,3 пг/мл ассоциируется с сердечной недостаточностью.

Результаты корреляционного анализа, продемонстрировавшие в группе больных с сердечной недостаточностью без диабета, но с нарушением жирового обмена ряд связей, которые могут отражать клиническое значение адипонектина у этой категории больных. Так, обнаруженная обратная связь циркулирующего уровня ВМ адипонектина с ИМТ и жировой массой и свидетельствует, что ожирение ассоциируется с гипoadипонектиемией; прямая связь ВМ адипонектина с уровнем MR-proANP, вероятно, объясняет компенсаторное синергичное действие этих факторов в условиях сердечной недостаточности, направленное на защиту миокарда; обратная связь ВМ

адипонектина с толщиной задней стенки ЛЖ может отражать его антигипертрофическое действие; прямая связь общего и ВМ адипонектина с уровнем липопротеидов высокой плотности, может отражать роль адипонектина как антиатерогенного фактора у больных сердечной недостаточностью и ИБС.

У больных с сердечной недостаточностью, сочетанной с диабетом были обнаружены преимущественно обратные связи, характеризующие снижение циркулирующего адипонектина при гиперинсулинемии, гипертриглицеридемии, гиперхолестеринемии.

Таким образом, у данной категории больных традиционные модифицируемые факторы риска сердечно-сосудистых осложнений ассоциируются с гипoadипонектиемией, а признаки гипертрофии и ремоделирования миокарда - с гиперадипонектиемией [233].

Резистин экспрессируется в жировой ткани под влиянием гена RETN, но секретируется преимущественно моноцитами и макрофагами жировых депозитов [291, 339]. У грызунов показана взаимосвязь повышенного уровня резистина с инсулиновой резистентностью, гипергликемией и элевацией циркулирующих свободных жирных кислот. У человека повышенный циркулирующий уровень резистина ассоциируется с атеросклерозом, диабетом и высоким кардиометаболическим риском [212, 276], хотя специфический рецептор для резистина все еще не идентифицирован. Считается, что резистин реализует свои провоспалительные эффекты посредством связывания с toll-like рептором 4 (TLR4) иммунокомпетентных клеток жировой ткани [352], которые, обладая паракринным и аутокринным действием, поддерживают состояние хронического воспаления в жировой ткани. Помимо этого известно, что резистин активирует систему NF- κ B моноцитов, которая в свою очередь, приводит к стимуляции экспрессии ряда цитокинов этими клетками, в том числе, интерлейкина-6 (IL-6,) интерлейкина-1 β (IL1 β), фактора некроза опухоли- α (TNF α). Сегодня уже не вызывает сомнений тот факт, что ожирение

характеризуется развитием хронического воспаления. В ряде работ показано, что у больных ИБС с ишемической дисфункцией ЛЖ, ассоциированной с сердечной недостаточностью, повышенная экспрессия циркулирующих TNF α , ИЛ-1 β и ИЛ-6 ассоциируется с тяжестью ХСН и неблагоприятным характером течения заболевания. Однако, у больных сердечной недостаточностью и сочетанной патологией, такой как ожирение и диабет, подобные исследования не проводились, клиническая и прогностическая значимость циркулирующего резистина и ИЛ-6 у этой категории больных не определена.

При анализе данных, полученных в ходе нашего исследования, показано, что уровень циркулирующего резистина в исследуемых группах статистически значимо не отличался, хотя в целом наблюдалась тенденция к более высокому его уровню у больных ХСН и сопутствующим СД2 и СД2 без сердечной недостаточности, что может объясняться преобладанием в этих группах больных с ожирением и, вероятно, большей выраженностью системного воспаления на фоне ожирения.

Корреляционный анализ в группе больных ХСН без диабета позволил выявить прямую связь между уровнем циркулирующего резистина и размером левого предсердия и толщиной межжелудочковой перегородки, а также прямую связь резистина и уровнем MR-proANP и NT-proBNP, что, по-видимому, может отражать вклад резистина в развитие ремоделирования миокарда, при этом пропорциональное увеличение уровня натрийуретических пептидов уровню резистина отражает компенсаторный механизм НУП, нивелирующих провоспалительные и прогипертрофические эффекты резистина на сердечную мышцу. Обратная связь с толерантностью к физической нагрузке, возможно, отражает вклад резистина в тяжесть сердечной недостаточности. В группе больных ХСН, сочетающейся с СД2 обнаружены сходные связи, подтверждающие роль резистина в развитии гипертрофии миокарда и сердечной недостаточности. В группе больных СД2 без ХСН и в группе сравнения подобных связей обнаружено не было.

При оценке циркулирующего провоспалительного цитокина IL-6 было обнаружено, что его концентрация у больных с ХСН больше, чем в группе сравнения и группе больных СД2 без ХСН. В группе больных с ХСН и сопутствующим СД2 обнаружена прямая корреляционная связь между циркулирующим IL-6 и MR-proANP и обратная связь с фракцией выброса ЛЖ. Полученные данные дополняют результаты корреляционного анализа, также продемонстрировавшего связь резистина, натрийуретических пептидов и систолической функции ЛЖ и подтверждают однонаправленный вклад циркулирующих провоспалительных цитокинов резистина и IL-6 в развитие сердечной недостаточности.

Таким образом, молекулярный профиль больного ХСН с сопутствующим ожирением характеризуется низким уровнем натрийуретических пептидов, высоким уровнем лептина, низким уровнем адипонектина, повышенным содержанием в крови резистина и IL-6.

Несмотря на то, что мы не обнаружили прогностической значимости циркулирующих адипоцитокинов у больных с ХСН, тем не менее, их клиническое значение представляется крайне важным. Полученные данные ориентируют на новые потенциальные молекулярные механизмы взаимодействия между сердечной мышцей, натрийуретическими пептидами и жировой тканью у больных с хронической сердечной недостаточностью и сопутствующим ожирением и требуют отдельных углубленных исследований, в том числе, экспериментальных.

ГЛАВА 7

КЛИНИЧЕСКОЕ И ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ АНГИОГЕННЫХ ФАКТОРОВ РОСТА У БОЛЬНЫХ С ИШЕМИЧЕСКОЙ ХРОНИЧЕСКОЙ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ И СОПУТСТВУЮЩИМ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2 ТИПА

7.1. Клиническое значение циркулирующих ангиогенных факторов роста у больных с ишемической хронической сердечной недостаточностью и сопутствующим сахарным диабетом 2 типа

В патогенезе ишемии миокарда определенную роль играет состояние системы факторов роста и цитокинов, регулирующих процессы компенсаторного ангио-артериогенеза. Это состояние определяется соотношением между про- и антиангиогенными факторами. Сдвиг этого соотношения в сторону ангиогенных факторов может на определенном этапе компенсировать последствия развивающегося стеноза коронарных артерий за счет активации артериогенеза – развития коллатеральных сосудов, и в меньшей степени – ангиогенеза, формирования новых капилляров. Наоборот, преобладание ингибиторов ангиогенеза будет способствовать усугублению ишемии. Помимо регуляции роста сосудов, многие ангиогенные факторы роста являются важнейшими регуляторами функции стволовых/прогениторных клеток (HGF, VEGF, IGF-1, SDF, SCF), участвующих в процессах репарации/регенерации миокарда, оказывают антиапоптотическое действие на кардиомиоциты, повышая их жизнеспособность в условиях ишемии (HGF, FGFb), обладают противовоспалительным и антифиброзным действием (HGF). В ряде работ установлены связи между уровнем определенных ангиогенных факторов в крови и такими клиническими характеристиками больных ИБС, как тяжесть коронарного атеросклероза и выраженность ишемии миокарда [290],

количеством тромбоцитов у больных с острым ИМ, а также с выраженностью атеросклеротических изменений в крупных артериях у больных диабетом [214].

Все это делает актуальным вопрос о возможной клинической и прогностической значимости циркулирующих ангиогенных факторов у больных сердечной недостаточностью, в том числе, с сопутствующим диабетом.

Результаты сравнительного анализа циркулирующих концентраций VEGF, sVEGFR1, HGF, ангиопоэтина-1, FGFb и PlGF в исследуемых группах представлены в таблице 30.

Таблица 30 – Сравнительный анализ циркулирующих ангиогенных факторов роста в исследуемых группах

Ангиогенные факторы	группа сравнения n=25 (1)	ХСН n=30 (2)	ХСН+СД2 n=25 (3)	СД2 n=32 (4)	p Kruskal-Wallis test					
					1-2	1-3	1-4	2-3	2-4	3-4
VEGF, пг/мл	143,5 [86,1;228,4]	213,5 [135,3;298,7]	295,5 [150,0;414,9]	259,9 [218,6;522,1]	0,073	0,029	0,007	0,291	0,081	0,587
VEGFR1, пг/мл	179,6 [98,2;273,7]	82,7 [75,5;88,6]	225,3 [206,3;265,9]	373,3 [169,8;423,9]	0,007	0,190	0,020	0,004	0,0001	1,000
HGF, пг/мл	368,9 [323,4;459,6]	545,2 [414,7;661,1]	725,5 [500,0;808,8]	557,4 [507,7;663,4]	0,003	<0,0001	0,0003	0,006	1,000	0,423
Ангиопоэтин-1, пг/мл	2299,9 [1837,4;3732,3]	3315,3 [2165,4;5246,1]	2782,9 [1898,5;6585,5]	3451,9 [2036,0;6285,0]	0,099	0,384	0,068	0,681	0,709	0,562
FGFb, пг/мл	3,6 [1,9;6,9]	1,1 [1,8;5,6]	1,3 [1,1;3,4]	0,3 [2,4;6,0]	0,309	0,169	0,644	0,913	0,638	0,581
PlGF, пг/мл	7,8 [4,7;12,3]	2,9 [2,2;5,2]	9,6 [0,5;13,4]	2,9 [0,3;4,7]	0,026	1,000	0,448	0,004	0,756	0,192

Примечание: Данные представлены как Me±SD

Анализ циркулирующего VEGF показал, что его уровень в периферической крови больных исследуемых групп был повышен в сопоставлении с группой сравнения. Так, у больных ХСН в отличие от группы сравнения концентрация VEGF была в 1,5 раза выше, но не достигала уровня статистической значимости. У больных ХСН, в сочетании с диабетом уровень циркулирующего VEGF статистически значимо, в 1,8 раза превышал его содержание у больных группы сравнения. У больных диабетом без сердечной

недостаточности содержание VEGF в циркуляции более чем в 2 раза было больше, чем в группе сравнения.

При оценке растворимой циркулирующей фракции рецептора первого типа фактора роста эндотелия сосудов (sVEGFR1) оказалось, что его наименьшее содержание отмечалось в группе больных ХСН без диабета и в сопоставлении с группой сравнения статистически значимо было ниже ($p=0,0069$). Примечательно, что в группе больных ХСН в сочетании с СД2, также как и у больных СД2 без ХСН в сравнении с больными группы ХСН без СД2 уровень sVEGFR1 был статистически значимо выше ($p=0,0037$ и $p=0,0001$, соответственно).

Согласно литературным данным, VEGFR1 или Flt-1 рецептор VEGF является decoy рецептором (рецептором приманкой или ловушкой), который не обладает тирозинкиназной активностью, но эффективно связывает и ингибирует VEGF, предупреждая его взаимодействие с тирозинкиназными рецепторами (VEGFR2-KDR/Flk-1 и VEGFR3) и сдерживая процессы избыточного ангиогенеза и опухолевого роста. В ряде экспериментальных работ показано, что рекомбинантный VEGFR1 подавляет миграцию и пролиферацию эндотелиальных клеток и неоваскуляризацию хориоаллонтонидной мембраны цыпленка *in vitro* и ангиогенез у мышей *in vivo* [377, 381].

Обнаруженное повышение sVEGFR1 в периферической крови больных диабетом может носить компенсаторный характер в ответ на повышение циркулирующего VEGF. В литературе мы не обнаружили единой интерпретации повышенного уровня sVEGFR1 и VEGF у больных СД2. Большинство исследователей объясняют элевацию указанных исследованных факторов наличием атеросклероза, хронической ишемии и постоянной потребностью эндотелия у больных диабетом в обновлении [27, 28].

При применении ROC-анализа, оказалось, что уровень циркулирующего VEGF более 202,5 пг/мл (чувствительность-56,5%, специфичность-73,8%)

ассоциируется с диабетом (ROC-Area $\pm$ S.E. составила 0,70 $\pm$ 0,05 (95%ДИ 0,60-0,80, p=0,0149). Кроме этого было обнаружено, что уровень циркулирующего sVEGFR1 более 179,6 пг/мл (чувствительность-75,0%, специфичность-77,1%) также ассоциируется с диабетом (ROC-Area $\pm$ S.E. составила 0,70 $\pm$ 0,06 (95%ДИ 0,70-0,94, p=0,0011).

Анализ циркулирующего HGF показал, что его содержание у больных всех групп больше, чем в группе сравнения. У больных ХСН и ХСН в сочетании с СД2, а также больных СД2 без ИБС и ХСН наблюдалось статистически значимое повышение уровня HGF в периферической крови. Примечательно и то, что у больных ХСН в сочетании с СД2 в сравнении с больными ХСН без СД2 уровень HGF был статистически значимо выше, что может отражать вклад диабета *per se* в увеличение экспрессии исследуемого фактора.

При применении ROC-анализа, оказалось, что уровень циркулирующего фактора роста гепатоцитов более 495,9 пг/мл (чувствительность-56,3%, специфичность-81,8%) ассоциируется с наличием диабета (ROC-Area $\pm$ S.E. составила 0,75 $\pm$ 0,05 (95%ДИ 0,65-0,84, p=0,0008).

Дальнейший анализ показал, уровень HGF во всех группах обследованных прямо коррелировал с уровнем глюкозы натощак (r=0,36; p=0,0014) и HbA1c (r=0,5; p=0,00001). Анализ уровня HGF в зависимости от выраженности нарушений углеводного обмена, проведенный в группах больных с диабетом, показал, что у больных ХСН, сочетанной СД2 и неудовлетворительным контролем гликемии (HbA1c>7%) уровень HGF в плазме крови был статистически значимо выше, чем у больных с удовлетворительным контролем гликемии (HbA1c<7%) (871,4 пг/мл [776,5:1007,5] vs 530,9 пг/мл [499,6:802,4], p=0,0049, соответственно). В этой группе концентрация HGF прямо коррелировала с уровнем HbA1c (r=0,52, p=0,03), и эта связь не зависела от ИМТ. В группе больных СД2 без ХСН статистически значимой взаимосвязи между выраженностью гликемии и

уровнем HGF в плазме выявлено не было, что, возможно, объясняется преобладанием в этой группе больных с удовлетворительным контролем гликемии.

При анализе количества HGF в плазме в зависимости от нарушений жирового обмена было установлено, что в целом по выборке имеется прямая корреляционная связь между уровнем HGF, ИМТ и циркулирующим лептином как коррелятом жировой массы ($r=0,41$, $p<0001$ и $r=0,50$, $p<00001$, соответственно). Однако, анализ HGF внутри обследованных групп в зависимости от значений медианы ИМТ статистически значимых различий не обнаружил, хотя во всех группах наблюдалась тенденция к более высокому содержанию HGF у больных с ожирением. По-видимому, внутри групп больных влияние массы тела на уровень HGF нивелируется влиянием других факторов, таких как гипергликемия и гиперинсулинемия, ишемия и гипоксия тканей.

При проведении многофакторного корреляционного анализа было обнаружено, что в объединенной группе обследованных (группы сравнения и всех групп больных ИБС и СД2) уровень циркулирующего HGF прямо коррелирует с возрастом ($r=0,37$, $p=0,0006$), такими параметрами углеводного обмена, как уровень глюкозы ($r=0,35$, $p=0,001$), HbA1c ($r=0,49$, $p<0,0001$), С-пептида ($r=0,40$, $p<0,05$), индексом инсулинорезистентности НОМА-IR ($r=0,33$, $p=0,01$), а также с такими маркерами неблагоприятного прогноза, как концентрация мочевой кислоты и hsCRP ($r=0,43$, $p=0,042$ и $r=0,32$, $p=0,011$, соответственно), и обратно коррелирует с уровнем антиатерогенных липопротеидов ХС-ЛПВП ($r=-0,30$, $p=0,01$). Причем у больных диабетом (СД2 без ХСН и ХСН, сочетанная с СД2) корреляции с hsCRP и мочевой кислотой были более значимыми, чем в общей группе обследованных (с hsCRP $r=0,42$, $p<0,05$; с мочевой кислотой $r=0,81$, $p<0,05$), что в результате может указывать на влияние этих факторов на уровень HGF.

Анализ циркулирующего ангиопоэтина-1 показал, что его концентрация у больных всех групп в сопоставлении с больными группы сравнения больше, хотя различия не достигали статистической значимости. Сходная закономерность наблюдалась и при анализе циркулирующего FGFb.

Анализ циркулирующего PlGF показал, что у больных с ХСН, сочетающейся с СД2 в сопоставлении с больными ХСН без СД2 наблюдается статистически значимое увеличение исследуемого фактора, тогда как сравнение уровня PlGF у больных с ХСН без СД2 и больных СД2 без ХСН статистически значимых различий не обнаружило. Полученные результаты могут отражать вклад собственно диабета как фактора, стимулирующего экспрессию плацентарного фактора роста.

Сравнительный анализ циркулирующих ангиогенных факторов в объединенной группе больных ХСН в зависимости от функционального класса NYHA представлен в таблице 31.

Таблица 31 – Сравнительный анализ циркулирующих ангиогенных факторов в объединенной группе больных ХСН II и III ФК NYHA

Ангиогенные факторы	II ФК NYHA	III ФК NYHA	p Mann-Whitney U Test
VEGF, пг/мл	193,7 [132,3:392,8]	270,6 [170,1:382,9]	0,2689
sVEGFR1, пг/мл	219,6 [82,7:240,0]	113,8 [79,8:210,4]	0,4689
HGF, пг/мл	568,7 [458,1:679,3]	704,5 [499,6:807,3]	0,2514
FGFb, пг/мл	1,8 [1,1:10,8]	0,3 [0,1:3,0]	0,2043
Ангиопоэтин-1, пг/мл	3315,3 [2165,4:5551,4]	2782,9 [1989,5:5146,2]	0,6202
PlGF, пг/мл	1,5 [0,5:6,0]	0,9 [0,1:13,4]	0,7049

При сравнительном анализе циркулирующих ангиогенных факторов роста у больных с ХСН в зависимости от функционального класса NYHA было

показано, что концентрация исследуемых факторов не зависит от тяжести сердечной недостаточности и вероятно, может предопределяться другими детерминантами.

Корреляционный анализ, демонстрирующий связь циркулирующих ангиогенных факторов роста, адипоцитокинов, биохимических показателей и морфо-функциональных параметров ЛЖ у больных ХСН без СД2 представлен в таблице 32.

Таблица 32 – Корреляционная связь циркулирующих ангиогенных факторов роста с адипоцитокинами, биохимическими показателями и морфо-функциональными параметрами ЛЖ у больных ХСН без СД2

Показатели	Spearman R	p
VEGF, пг/мл & MR-proANP, пг/мл	0,40	0,039
VEGF, пг/мл & NT-proBNP, пг/мл	0,49	0,009
VEGF, пг/мл & ЗСЛЖ, мм	-0,41	0,040
VEGFR1, пг/мл & Адипонектин, нг/мл	0,89	0,007
HGF, пг/мл & Лептин, пг/мл	0,59	0,008
HGF, пг/мл & IL-6 пг/мл	0,47	0,028
FGFb, пг/мл & ИМТ, кг/м ²	0,32	0,094
FGFb, пг/мл & Инсулин, мкЕД/мл	0,40	0,032
Ангиопозитин-1, пг/мл & Резистин, пг/мл	-0,37	0,047
PIGF, пг/мл & ВМ адипонектин	0,47	0,028
PIGF, пг/мл & МЖП, мм	-0,49	0,019

В группе больных с ХСН без СД2 обнаружена прямая связь концентрации VEGF с уровнем циркулирующих натрийуретических пептидов; интересной оказалась обратная корреляционная связь VEGF и признаками гипертрофии ЛЖ, что в комплексе с наличием прямой связи VEGF и циркулирующим адипонектином может отражать как компенсаторное усиление ангиогенного потенциала, так и антигипертрофическое действие VEGF в ответ на нейрогуморальную и гемодинамическую нагрузку при хронической сердечной недостаточности и хронической тканевой гипоксии. Сходные

корреляционные связи выявлены и при анализе другого ангиогенного фактора из семейства VEGF - плацентарного фактора роста. Его уровень также обратно коррелировал с показателем гипертрофии миокарда - толщиной межжелудочковой перегородки и прямо коррелировал с уровнем высокомолекулярного адипонектина.

Корреляционный анализ, демонстрирующий связь циркулирующих ангиогенных факторов роста, адипоцитокинов, биохимических показателей и морфо-функциональных параметров ЛЖ у больных ХСН в сочетании с СД2 представлен в таблице 33.

Таблица 33 – Корреляционная связь циркулирующих ангиогенных факторов роста с адипоцитокинами, биохимическими показателями и морфо-функциональными параметрами ЛЖ у больных с ХСН в сочетании с СД2

Показатели	Spearman R	p
VEGF, пг/мл & Глюкоза, ммоль/ л	0,20	0,062
VEGF, пг/мл & HbA1c, %	0,28	0,011
VEGFR1, пг/мл & Лептин, пг/мл	0,47	0,072
VEGFR1, пг/мл & Глюкоза, ммоль/ л	0,52	0,015
VEGFR1, пг/мл & HbA1c, %	0,60	0,004
HGF, пг/мл & Глюкоза, ммоль/л	0,30	0,040
HGF, пг/мл & HbA1c, %	0,52	0,023
HGF, пг/мл & ИМТ, кг/м ²	0,38	0,048
HGF, пг/мл & Эндотелин-1, пг/мл	0,36	0,045
FGFb, пг/мл & ФВ ЛЖ, %	0,57	0,013
Ангиопоэтин-1, пг/мл & Лептин, пг/мл	0,62	0,001
PIGF, пг/мл & MR-proANP, пг/мл	0,49	0,043
PIGF, пг/мл & NT-proBNP, пг/мл	0,47	0,054
PIGF, пг/мл & МЖП, мм	-0,65	0,029
PIGF, пг/мл & ЗСЛЖ, мм	-0,67	<0,001
PIGF, пг/мл & ВМ адипонектин	0,61	0,024
PIGF, пг/мл & ИМТ, мм	-0,55	0,023
PIGF, пг/мл & Инсулин, мкЕД/мл	-0,5	0,069

В группе больных с ХСН, сочетающейся с СД2, в сравнении с больными ХСН без СД2 были обнаружены прямые слабые связи VEGF с параметрами углеводного обмена; прямые корреляционные связи рецептора фактора роста эндотелия сосудов с лептином, как коррелятом жировой массы; с уровнем глюкозы натощак и гликированным гемоглобином. Выявленные связи могут отражать вклад нарушений углеводного обмена (гипергликемии) у больных диабетом в увеличение экспрессии фактора роста эндотелия сосудов и его рецептора. Схожие корреляционные связи были обнаружены при анализе HGF, также подтверждающие связь исследованного ангиогенного фактора с уровнем гликемии.

Обнаруженные прямые корреляционные связи циркулирующего PlGF с уровнями натрийуретических пептидов и концентрацией ВМ адипонектина, но обратные - с показателями гипертрофии ЛЖ, позволяют предполагать наличие антигипертрофических свойств у плацентарного фактора роста, что нуждается в дальнейшем изучении.

Единственным фактором, уровень которого в циркуляции коррелировал с показателем насосной функции левого желудочка (ФВ ЛЖ) был основной фактор роста фибробластов (FGFb), что не удивительно, так как FGFb подавляет апоптоз кардиомиоцитов и стимулирует их жизнеспособность.

В объединенной группе больных с ХСН установлена обратная связь циркулирующего sVEGFR1 с ИММ ЛЖ ($r=-0,58$, $p=0,0179$); прямая связь VEGF и уровнем MR-proANP и NT-proBNP ($r=0,40$, $p=0,0071$ и $r=0,43$, $p=0,0038$, соответственно); обратная связь VEGF и толщиной межжелудочковой перегородки и толщиной задней стенки ЛЖ ($r=-0,37$, $p=0,0197$ и $r=-0,32$, $p=0,0406$, соответственно); прямая связь циркулирующего VEGF и уровнем эндотелина-1 ($r=0,39$, $p=0,0095$); прямая связь HGF с уровнем циркулирующего эндотелина-1 ($r=0,34$, $p=0,0172$) и лептина ($r=0,50$, $p=0,0004$); прямая связь HGF и уровнем С-пептида и НОМА-индексом ($r=0,34$, $p=0,0193$ и $r=0,30$, $p=0,0470$, соответственно), прямая связь HGF и уровнем С-реактивного белка ($r=0,42$,

$p=0,0032$); прямая связь FGFb с количеством жировой массы ($r=0,42$, $p=0,0281$); прямая связь ангиопоэтина-1 и лептина ($r=0,34$, $p=0,0222$); обратная связь FGFb и уровнем резистина ($r=-0,29$, $p=0,0441$); обратная связь PlGF и толерантностью к физической нагрузке ($r=-0,37$, $p=0,0391$). Результаты корреляционного анализа циркулирующих ангиогенных факторов роста с адипоцитокинами, биохимическими показателями и морфо-функциональными параметрами ЛЖ в объединенной группе больных с ХСН представлены в таблице 34.

Таблица 34 – Корреляционная взаимосвязь циркулирующих ангиогенных факторов роста с адипоцитокинами, биохимическими показателями и морфо-функциональными параметрами ЛЖ в объединенной группе больных с ХСН

Показатели	Spearman R	p
VEGFR1, пг/мл & ИММ ЛЖ	-0,58	0,018
VEGF, пг/мл & MR-proANP	0,40	0,007
VEGF, пг/мл & NT-proBNP	0,43	0,004
VEGF, пг/мл & МЖП, мм	-0,37	0,019
VEGF, пг/мл & ЗСЛЖ, мм	-0,32	0,040
VEGF, пг/мл & Эндотелин-1, пг/мл	0,39	0,009
HGF, пг/мл & Эндотелин-1, пг/мл	0,34	0,017
HGF, пг/мл & Лептин, пг/мл	0,50	<0,001
HGF, пг/мл & С-пептид, пг/мл	0,34	0,019
HGF, пг/мл & НОМА-индекс	0,30	0,047
HGF, пг/мл & С-реактивный белок, ммоль/мл	0,42	0,003
FGFb, пг/мл & ЖМ, кг	0,42	0,028
FGFb, пг/мл & Резистин, пг/мл	0,29	0,044
PlGF, пг/мл & 6-минутный тест ходьбы	-0,37	0,039
Ангиопоэтин-1, пг/мл & Лептин, пг/мл	0,34	0,022

7.2. Прогностическое значение циркулирующих ангиогенных факторов роста и частота сердечно-сосудистых осложнений у больных с ишемической хронической сердечной недостаточностью и сопутствующим сахарным диабетом 2 типа

В данной части исследования проводился сравнительный анализ циркулирующих ангиогенных факторов у больных с благоприятным и неблагоприятным течением хронической сердечной недостаточности в сопоставлении с риском развития неблагоприятных сердечно-сосудистых событий.

Сравнительный анализ циркулирующих ангиогенных факторов у больных с благоприятным и неблагоприятным течением хронической сердечной недостаточности представлен в таблице 35.

Таблица 35 – Сравнительный анализ циркулирующих ангиогенных факторов у больных с благоприятным и неблагоприятным течением ИБС/ХСН

Ангиогенные факторы	Благоприятное течение (n=25)	Неблагоприятное течение (n=18)	p Mann-Whitney U Test
VEGF, пг/мл	241,7 [138,7:392,8]	248,4 [128,6:367,4]	0,596
VEGFR1, пг/мл	203,5 [75,5:225,3]	129,1 [88,6:538,9]	0,275
HGF, пг/мл	543,5 [453,8:679,3]	736,0 [499,6:900,0]	0,022
FGFb, пг/мл	1,7 [0,9:5,0]	2,9 [1,8:5,6]	0,626
Ангиопоэтин-1, пг/мл	3315,3 [1898,5:5577,9]	2782,9 [2140,7:5004,2]	0,291
PIGF, пг/мл	1,02 [0,5:10,0]	2,9 [0,3:17,5]	0,596

Анализ показал, что по уровню большинства исследованных циркулирующих ангиогенных факторов у больных с благоприятным (А) и неблагоприятным (Б) течением хронической сердечной недостаточности

статистически значимых различий обнаружено не было, за исключением циркулирующего HGF, концентрация которого у больных группы Б была достоверно выше, чем у больных группы А.

При применении ROC-анализа показателей чувствительности и специфичности прогнозирования неблагоприятного сердечно-сосудистого события по значению HGF была выявлена прогностическая значимость исследуемого фактора, (рисунок 33). Площадь под кривой (ROC-Area $\pm$ S.E.) составила 0,73 $\pm$ 0,07 (95%ДИ 0,61-0,88, $p=0,0187$). Уровень HGF более 700 пг/мл (чувствительность-86,2%, специфичность-63,2%) позволил прогнозировать неблагоприятные сердечно-сосудистые события у больных ХСН.

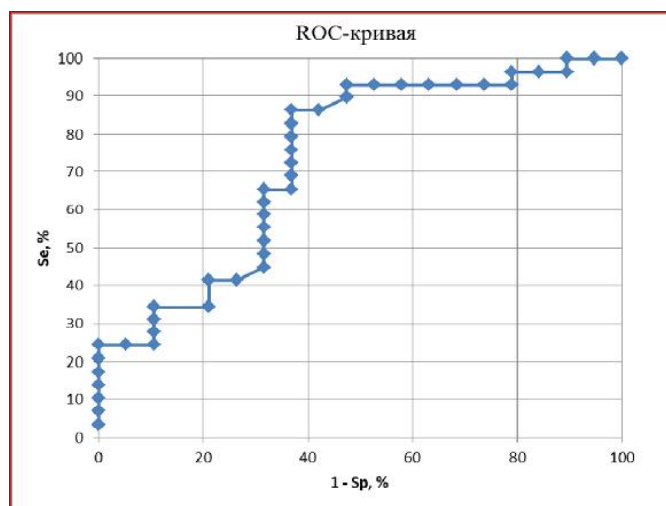


Рисунок 33 – Характеристическая кривая (ROC-кривая) чувствительности и специфичности значений HGF в неблагоприятном прогнозе течения ХСН

Однако, анализ вероятности развития неблагоприятных сердечно-сосудистых событий в ходе проспективного наблюдения по методу Каплана-Майера по комбинированной конечной точке (прогрессирование ХСН, повторный ИМ, летальность) в зависимости от концентрации HGF (медиана) не выявил достоверных взаимосвязей уровня экспрессии данного фактора с развитием сердечно-сосудистых событий, (рисунок 34).

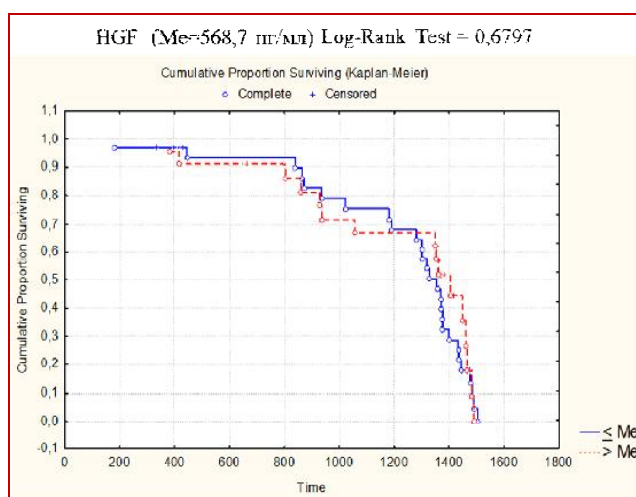


Рисунок 34 – Кривые Каплана-Майера вероятности развития неблагоприятных сердечно-сосудистых событий в ходе проспективного наблюдения в зависимости от уровня циркулирующего HGF

Анализ вероятности развития неблагоприятных сердечно-сосудистых событий в ходе проспективного наблюдения по методу Каплана-Майера по комбинированной конечной точке (прогрессирование ХСН, повторный ИМ, летальность) в зависимости от концентрации (медиана) VEGF и sVEGFR1 также не выявил статистически значимых взаимосвязей уровней экспрессии данных ангиогенных факторов с развитием сердечно-сосудистых событий у больных ХСН, (рисунок 35).

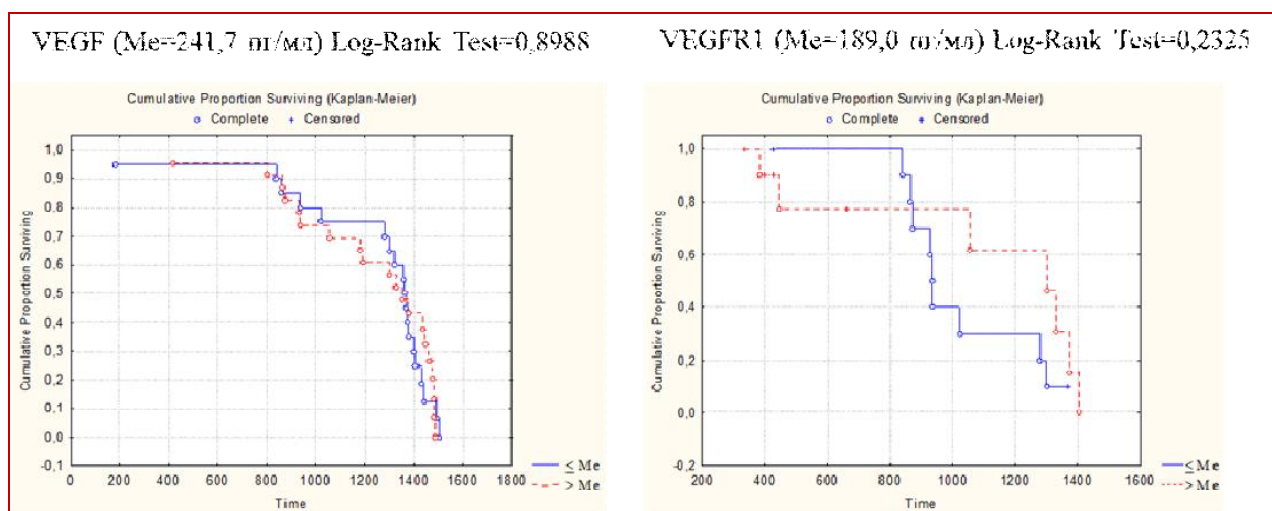


Рисунок 35 – Кривые Каплана-Майера вероятности развития неблагоприятных сердечно-сосудистых событий в ходе проспективного наблюдения в зависимости от уровня экспрессии VEGF и sVEGFR1

Резюме

В данной части работы мы изучали профиль циркулирующих ангиогенных факторов роста у больных с ХСН и сопутствующим СД2, поскольку не выясненным остается вопрос об изменении ангиогенного потенциала у больных ИБС в условиях повышенной активности нейрогуморальной системы, возникающей при постинфарктной сердечной недостаточности и хронической тканевой гипоксии. Данные об уровне циркулирующих ангиогенных факторов у больных ИБС на фоне сопутствующего СД2 еще более ограничены, чтобы можно было однозначно говорить об их клинической или прогностической значимости при сочетанных патологиях [27, 28, 244].

Не так давно появились отдельные клинические исследования, в которых установлено, что у больных ИБС, ассоциированной с сердечной недостаточностью, такие ангиогенные факторы роста как фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), тромбоцитарный фактор роста (PDGF) и основной фактор роста фибробластов (FGFb) ассоциируются с тяжестью заболевания и неблагоприятным сердечно-сосудистым прогнозом. Было показано, что уровень экспрессии VEGF в группе больных с неблагоприятным течением ХСН ниже в сравнении с больными сердечной недостаточностью и ее благоприятным течением.

Однако, у больных хронической сердечной недостаточностью, исследования, направленные на клиническую оценку базальных уровней циркулирующих ангиогенных факторов с позиции коморбидности, в основе которой лежат системные метаболические нарушения (такие как диабет и ожирение), ограничены и неоднозначны.

Анализ полученных результатов, касающихся оценки циркулирующего VEGF показал, что его уровень статистически значимо выше у больных с ХСН и больных диабетом обеих групп (ХСН+СД2 и СД2 без ХСН) по отношению к

группе сравнения. Было высказано предположение, что причиной подобного повышения VEGF в циркуляции может являться не столько сердечная недостаточность, сколько сопутствующее нарушение углеводного обмена. При применении ROC-анализа оказалось, уровень VEGF более 202,5 пг/мл (чувствительность-56,5%, специфичность-73,8%) ассоциируется с диабетом.

Сравнительный анализ циркулирующего sVEGFR1 продемонстрировал, что его уровень у больных диабетом (XCH+CD2 и CD2 без XCH) статистически значимо выше по отношению к группе сравнения и больным с XCH без CD2, в связи с чем мы также предположили, что причиной повышения sVEGFR1 может быть именно сопутствующий диабет. Подтверждением этому послужили результаты ROC-анализа показателя чувствительности и специфичности VEGFR1, продемонстрировавшего наибольшую диагностическую значимость в сравнении с результатами ROC-анализа показателя чувствительности и специфичности VEGF при диабете. Нами было установлено, что концентрация VEGFR1 более 179,6 пг/мл (чувствительность-75,0%, специфичность-77,1%) ассоциируется с наличием диабета. Результатами, взаимодополняющими вклад диабета в увеличение экспрессии ангиогенных факторов, стали данные корреляционного анализа, продемонстрировавшего наличие прямой связи исследованных факторов с уровнем глюкозы и гликированного гемоглобина. Однако, для того, чтобы определить возможный источник продукции ангиогенных факторов, необходимы дальнейшие экспериментальные исследования.

Важное клиническое значение на наш взгляд представляют и другие результаты корреляционного анализа, продемонстрировавшего прямую взаимосвязь циркулирующего VEGF с уровнем MR-proANP, NT-proBNP и адипонектином и обратную связь с параметрами, отражающими гипертрофию и ремоделирование ЛЖ (толщина задней стенки ЛЖ, толщина межжелудочковой перегородки), что в целом характеризует VEGF как кардиопротективный.

Согласно литературным данным большинство ССЗ ассоциируются с повышенным уровнем циркулирующего VEGF и неблагоприятным сердечно-сосудистым прогнозом [75]. По некоторым данным, повышенное содержание VEGF является предиктором нарушения мозгового кровообращения, в отношении этого факта с одной стороны исследователями дискутируется вопрос об ангио- и нейропротективном влиянии VEGF на мозг, с другой - об атерогенном воздействии повышенной концентрации VEGF, усугубляющим эндотелиальную дисфункцию. Результаты исследований циркулирующего VEGF и VEGFR1 у больных СД2 неоднозначны. В отдельных работах было отмечено, что у больных СД2 и сопутствующим атеросклерозом сосудов нижних конечностей уровень VEGF был ниже в сравнении с больными без СД2, тогда как уровень VEGFR1 был выше. Вероятным объяснением таких различий может служить тот факт, что независимо от диабета, гипоксия и хроническая тканевая ишемия компенсаторно стимулируют ангиогенез, но в то же время гипергликемия *per se* при диабете может быть причиной эндотелиальной дисфункции, инициирующей и потенцирующей развитие сердечно-сосудистых осложнений у больных СД2.

В другом исследовании было установлено, что уровень циркулирующего VEGF у больных СД2 независимо от наличия или отсутствия сопутствующих ССЗ в сравнении с больными без СД2 был выше. Авторы отмечали положительную корреляционную связь концентрации VEGF с уровнем гликозилированного гемоглобина, фактором Виллебранда и толщиной комплекса интима-медиа, предположив, что гипергликемия может быть причиной эндотелиальной дисфункции и атеросклероза. Среди возможных механизмов, посредством которых гипергликемия повреждает сосуды, обсуждаются конечные продукты гликозилирования белков внеклеточного матрикса, накопление которых стимулирует продукцию VEGF эндотелиальными клетками, в том числе, мезангиальными клетками почек и

способствует формированию микроангиопатии/нефропатии [60, 69, 259, 305, 361].

По некоторым данным уровень циркулирующего VEGF, а также VEGFR1 и VEGFR2 у больных СД2 и удовлетворительным контролем гликемии сопоставим с таковыми показателями у здоровых лиц, тогда как у больных СД2 и неудовлетворительным контролем гликемии уровень VEGF сыворотки значительно выше и ассоциируется с микро- и макро-сосудистыми осложнениями в сравнении с больными СД2 и удовлетворительным контролем гликемии без сердечно-сосудистых осложнений.

Менее всего изучен вопрос о влиянии нарушений жирового обмена на ангиогенный потенциал больных с ССЗ. Так, например, у больных, страдающих атеросклерозом сосудов нижних конечностей и сопутствующим ожирением, а также больных атеросклерозом сосудов нижних конечностей без ожирения уровень циркулирующего VEGF в сравнении с группой здоровых лиц и нормальным весом был выше, тогда как уровень VEGFR1 в сравниваемых группах не отличался. Однако, авторы обнаружили статистически значимую прямую корреляционную взаимосвязь VEGFR2 с ИМТ. Сходные результаты были получены в более крупном клиническом исследовании, показавшем положительную взаимосвязь циркулирующего VEGF-A с массой тела, независимо от наличия или отсутствия атеросклероза. Предполагается, что жировая ткань может являться источником не только адипоцитокинов, провоспалительных цитокинов, но и ангиогенных факторов роста.

Несмотря на то, что мы не обнаружили прогностической значимости VEGF и VEGFR1 в развитии неблагоприятных сердечно-сосудистых событий, тем не менее, полученные нами результаты позволяют наметить потенциальные молекулярные механизмы в патогенезе сердечной недостаточности при ее сочетании с СД2, что, безусловно, нуждается в дальнейших исследованиях.

Полученные результаты оценки циркулирующего HGF свидетельствуют о его статистически значимом повышении у больных ХСН, сочетанной с СД2 в

сравнении с больными группы сравнения и больными ХСН без СД2. При применении ROC-анализа установлено диагностическое значение циркулирующего HGF. Так, уровень HGF более 495,9 пг/мл (чувствительность-56,3%, специфичность-81,8%) ассоциируется с наличием диабета (ROC-Area $\pm$ S.E. составила 0,75 $\pm$ 0,05 (95%ДИ 0,65-0,84, p=0,0008).

Помимо этого, мы обнаружили, что уровень циркулирующего HGF ассоциируется не только с диабетом как с патологией, но и с уровнем гликемии. Было установлено, что у больных с неудовлетворительным контролем гликемии (HbA1c>7%) уровень HGF статистически значимо выше, чем у больных с удовлетворительным контролем гликемии (HbA1c<7%). Эти результаты подтверждаются и данными корреляционного анализа, продемонстрировавшего прямую связь HGF с уровнем глюкозы и гликированного гемоглобина у больных ХСН, сочетанной с СД2.

По данным некоторых авторов, такие факторы воспаления, как hsCRP, интерлейкин -1, -6 (IL-1, -6) и фактор некроза опухоли- α (TNF- α) индуцируют экспрессию HGF и в клетках жировой ткани, и в клетках сердца при постинфарктном ремоделировании. При наблюдении в течение 1 года за больными после острого инфаркта уровень hsCRP является независимым предиктором высокого уровня HGF в плазме [29].

У больных сердечной недостаточностью мы также обнаружили корреляционные зависимости между уровнем HGF и показателями тяжести ХСН, такими как концентрация NT-proBNP (r=0,55, p <0,0001), дистанция теста 6-минутной ходьбы (r=-0,48, p=0,001); со структурно-функциональными параметрами сердца: размером и максимальным объемом левого предсердия (r=0,44, p=0,0002 и r=0,45, p=0,0002 соответственно); ФВ (r=-0,32, p=0,001); КСР и КСО (r=0,34, p=0,004 и r=0,32, p=0,009 соответственно); КДР и КДО (r=0,30, p=0,01 и r=0,26, p=0,03 соответственно). Сходные результаты были получены в проспективном мультицентровом исследовании с участием 246 больных с перенесенным инфарктом миокарда и наблюдением в течение 1 года,

в котором было показано, что уровень HGF обратно коррелирует с фракцией выброса ЛЖ и прямо - с КСО и КДО и ЛЖ [29, 79].

В экспериментальных работах на моделях мелких и крупных животных с индуцированным инфарктом миокарда показано, что острая ишемия сердца сопровождается увеличением миокардиальной экспрессии HGF и его рецептора c-Met, а раннее системное введение рекомбинантного HGF или гена HGF в составе плазмидных или аденовирусных векторов улучшает параметры сердечной гемодинамики и предупреждает развитие сердечной недостаточности [29, 309]. Кардиопротективные эффекты HGF обусловлены его антиапоптотическим действием на кардиомиоциты, привлечением резидентных стволовых клеток сердца в область ишемии и инфаркта, стимуляцией роста сосудов в периинфарктной зоне, что способствует ограничению зоны ишемии. Полученные нами данные о более высокой концентрации HGF в периферической крови у больных ХСН с более выраженными нарушениями функции сердца совместно с приведенными данными литературы позволяют рассматривать повышение HGF при ХСН как вероятный компенсаторный механизм, направленный на улучшение функции миокарда и его кровоснабжения. Остается неясным источник повышения HGF в циркуляции: является ли им только поврежденный миокард или также и другие ткани, например, жировая ткань. Для ответа на этот вопрос нужны экспериментальные исследования. Возможно, при ХСН HGF может выполнять защитные функции подобно натрийуретическим пептидам (ANP, BNP, NT-proBNP), которые секретируются в ответ на механическое растяжение кардиомиоцитов, стимулируют натрийурез и уменьшение объемной нагрузки на миокард, подавляют пролиферацию фибробластов и предотвращают неблагоприятное ремоделирование миокарда [29].

Таким образом, при ХСН повышение уровня HGF в периферической крови может быть следствием как самой ХСН и нарушенной функции сердца, так и в случае сочетанной патологии следствием сопутствующих нарушений

углеводного и жирового обмена. Все эти данные указывают на возможную роль HGF в патогенезе кардиометаболических заболеваний. Однако сегодня молекулярные механизмы участия HGF в патогенезе метаболических расстройств остаются неясными. Также неясно, связан ли повышенный уровень HGF напрямую с риском развития диабета и резистентности к инсулину или же его повышение является лишь следствием влияния факторов риска развития СД2 или компенсаторным механизмом, направленным на коррекцию развивающейся резистентности к инсулину.

Известно, что в белой жировой ткани HGF оказывает инсулиноподобный эффект, стимулируя захват глюкозы через увеличение активности фосфатидилинозитол-3 киназа-зависимой протеинкиназы В.

Не исключена возможность, что нарушение этого эффекта HGF за счет изменений в рецепторах к HGF или сигнальных молекулах у больных с ожирением может вызывать резистентность к действию HGF подобно резистентности к инсулину, что может способствовать нарушениям метаболизма глюкозы и эндотелиальной дисфункции, инициирующей сердечно-сосудистые нарушения [174]. В ответ на резистентность к HGF его синтез и секреция адипоцитами могут усиливаться, что приводит к повышению его содержания в периферической крови. Повышение уровня HGF при ожирении может быть обусловлено также сопутствующей жировой дистрофией печени, как это описано у пациентов с неалкогольным метаболическим стеатогепатитом. Однако, в нашем исследовании и исследованиях других авторов более высокий уровень HGF в плазме у людей с ожирением наблюдается и при отсутствии каких-либо признаков поражения печени. В случае сочетания ХСН и метаболических расстройств повышение уровня HGF может быть обусловлено как реакцией на нарушения углеводного и жирового обмена, так и реакцией на ишемию тканей и нарушения функции сердца. Для ответа на эти вопросы необходимы исследования HGF в динамике после

коррекции нарушенного углеводного и жирового обмена или при улучшении показателей функции сердца [29].

Ангиопоэтин-1 представляет собой гликопротеин, фактор роста, необходимый для созревания вновь образованных сосудов и правильной организации сосудистой сети. В постнатальном периоде и в зрелом организме конститутивно этот белок секретируют периваскулярные клетки (перicytes и гладкомышечные клетки), предупреждая тем самым апоптоз эндотелиальных клеток. В зрелых, но поврежденных сосудах, ангиопоэтин-1 индуцирует ангиогенез и неоваскуляризацию, регулирует проницаемость сосудов в период воспаления.

По некоторым данным у больных с острым инфарктом миокарда в сравнении с группой контроля уровень циркулирующих ангиопоэтина-1,-2, Tie-2 и VEGF градуально нарастает в период от 48 часов после инфаркта и к 18 неделе постинфарктного состояния. Подобная закономерность увеличения в крови ангиогенных факторов роста может отражать стадийность ангиогенеза в случае острого ишемического повреждения [214, 303].

В нашем исследовании у больных хронической сердечной недостаточностью в сравнении с группой контроля уровень циркулирующего ангиопоэтина-1 был выше. При этом обращает на себя внимание закономерность более высокой концентрации ангиопоэтина-1, также как и других исследованных ангиогенных факторов, у больных диабетом, что наводит на мысль о возможно большем потреблении этих белков поврежденным эндотелием, поскольку именно эндотелиальная дисфункция является одним из первых, ранних этапов развития ангиопатии на фоне гипергликемии. В данном случае диабет представляет собой не только как заболевание обменного характера, характеризующегося хронической гипергликемией в результате нарушения секреции и/или действия инсулина, но и как сосудистая патология.

Плацентарный фактор роста (PIGF) в отличие от VEGF и других ангиогенных факторов, обладает более высокой специфической активностью, в частности уровень экспрессии PIGF коррелирует с улучшением функции ЛЖ у больных с острым инфарктом миокарда. В дальнейшем стало известно, что благоприятный эффект на миокард при введении рекомбинантного PIGF или гена, кодирующего PIGF в составе вирусных конструкций реализуется посредством стимуляции выживаемости кардиомиоцитов, подавления их апоптоза и индукции ангиогенеза в перинфарктной зоне за счет мигрировавших предшественников эндотелиальных клеток костного мозга. Помимо этого, увеличение экспрессии PIGF индуцирует экспрессию других ангиогенных факторов (в частности, VEGF, ангиопоэтина -1, -2) не только резидентными клетками сердца, но и прогениторными клеточными популяциями костного мозга. Доказательная база кардиопротективного действия PIGF включает и ряд других исследований, подтверждающих замедление образования некротической зоны у больных инфарктом миокарда. Постулируется, что улучшение морфофункциональных характеристик миокарда ЛЖ при введении PIGF является результатом стимуляции эндогенного ангио- и артериогенеза посредством паракринных эффектов прогениторных клеток костного мозга, стимуляции дифференцировки предшественников эндотелиальных клеток в эндотелиоциты, кардиопротективного, антиапоптотического действия PIGF и уменьшения размера инфаркта [87, 171, 222].

В нашем исследовании было показано, что наименьший уровень циркулирующего PIGF наблюдался у больных ХСН без диабета и больных диабетом без ХСН, тогда как наибольший уровень исследуемого фактора наблюдался в группе больных ХСН, сочетанной с диабетом. Учитывая, что мы не обнаружили статистически значимой взаимосвязи ангиогенных факторов с тяжестью ХСН, наличие сопутствующего диабета у больных сердечной недостаточностью может быть одной из причин повышения PIGF.

Результаты корреляционного анализа продемонстрировали сходные с VEGF связи PlGF, которые, по-видимому, могут отражать однонаправленное, синергичное действие указанных ангиогенных факторов у больных ХСН, в том числе, сочетанной с диабетом.

В ходе нашего исследования установлено, что повышенный уровень исследованных циркулирующих ангиогенных факторов (VEGF, sVEGFR1, PlGF, HGF, ангиопоэтина-1) ассоциируется с сердечной недостаточностью и сопутствующим диабетом.

Причины повышения ангиогенных факторов роста в крови у больных ХСН на фоне диабета могут объясняться с одной стороны - компенсаторным увеличением экспрессии указанных белков в ответ на более выраженную хроническую тканевую гипоксию в условиях гипергликемии, с другой - снижением ангиорегенеративного потенциала в целом, что требует большего количества ангиогенных факторов роста как аттрактантов, мобилизующих прогениторные клетки из костно - мозговой ниши в зоны ангиопатии.

Таким образом, в рамках данной части работы установлено, что исследованные ангиогенные факторы роста, по-видимому, модулируют не только функциональную активность миокарда в условиях хронической ишемии у больных сердечной недостаточностью на фоне сахарного диабета, но и сосудов, поскольку персистирующая эндотелиальная дисфункция является неотъемлемой составляющей обеих патологий. Безусловно, наши наблюдения необходимо подтвердить в более крупных исследованиях с участием больных с ХСН и сопутствующим диабетом.

ГЛАВА 8

КЛИНИЧЕСКОЕ И ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК И ЧАСТОТА СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ У БОЛЬНЫХ С ИШЕМИЧЕСКОЙ ХРОНИЧЕСКОЙ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ И СОПУТСТВУЮЩИМ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2 ТИПА

Исследования последнего десятилетия убедительно показали, что циркулирующие прогениторные клетки (ЦПК) костного мозга участвуют в формировании новых кровеносных сосудов путем дифференцировки в эндотелиальные клетки [332, 361]. Более того, появились ограниченные данные о том, что функциональные характеристики ЦПК нарушены у больных с ССЗ и СД2 [55, 58, 74, 96, 107, 121, 157, 186]. Учитывая это мы провели проспективное исследование с целью выявления связи между количеством ЦПК и вероятностью наступления сердечно-сосудистых осложнений у больных с ишемической хронической сердечной недостаточностью и сопутствующим СД2.

Следует отметить, что в настоящее время нет единого представления о фенотипе, который позволил бы надежно идентифицировать именно предшественников эндотелиальных клеток. В клинической практике для определения этой субпопуляции ЦПК наиболее часто используются такие наборы поверхностных маркеров, как CD133+/CD34+, CD133+/CD34+/VEGFR2+, CD133+/VEGFR2+, CD34+/ VEGFR2+ [23, 26, 37, 42, 257, 295]. При этом, например, показано, что популяция CD45- VEGFR2+(KDR)CD34+ клеток является в основном предшественниками лейкоцитов, в частности моноцитов [319]. Противоречивые представления относительно иммунофенотипа предшественников эндотелиальных клеток объясняются значительным перекрытием поверхностных маркеров между эндотелиальными и

гемопозитическими предшественниками, различиями в протоколах и особенностями анализа при количественной оценке популяций ЦПК с помощью проточной цитофлюориметрии.

В рамках данного исследования мы провели количественный анализ суммарной популяции циркулирующих стволовых/прогениторных CD34⁺ клеток, включающей как гемопозитические прогениторные клетки, так и эндотелиальные прогениторные клетки. В ходе цитометрического анализа среди суммарной CD34⁺ популяции обнаруживаются клетки с отсутствием экспрессии CD45 (CD45⁻), сравнительно низким уровнем CD45 (относительно зрелых лейкоцитов, CD45-Dim) и высоким уровнем экспрессии CD45. Клетки с высоким уровнем

экспрессии CD45 достаточно хорошо отличимы от клеток с низким уровнем или отсутствием экспрессии, однако последние две субпопуляции часто не различимы. В связи с этим для анализа мы использовали объединенную популяцию из CD34⁺ CD45⁻ и CD34⁺ CD45-dim клеток [23, 37, 42].

Суммарная популяция CD34⁺ клеток включает стволовые кроветворные клетки (СКК) и практически все определяемые *in vitro* гемопозитические колониеобразующие клетки, а также ранние предшественники Т и В-лимфоцитов. Она составляет 1–5% от популяции ядродержащих клеточных элементов костного мозга и представлена клетками, имеющими цитоморфологические признаки бластов и малых лимфоцитов. Антиген CD34 представляет собой высокогликозилированный трансмембранный белок типа I (сиаломуцин). Он экспрессируется на СКК, ранних кроветворных клетках-предшественниках, эндотелиальных клетках сосудов, эмбриональных фибробластах, некоторых клетках нервной ткани. Функция антигена CD34 окончательно не выяснена; имеются предположения, что он играет важную роль в гемопозе и может принимать участие во взаимодействии стромальных и кроветворных клеток. В настоящее время антиген CD34 признан одним из важнейших маркеров мультипотентных гемопозитических стволовых клеток и

широко используется для выявления, обогащения и очистки стволовых клеток и гемопоэтических клеток-предшественников костного мозга человека. Линейная коммитация клеток-предшественников сопровождается снижением уровня экспрессии антигена CD34. На поверхностных мембранах зрелых клеток костного мозга и периферической крови этот антиген не обнаруживается. Данные ряда экспериментальных и клинических работ свидетельствуют о способности общей популяции CD34⁺ клеток в определенных условиях *in vitro* дифференцироваться в эндотелиоциты и принимать участие в репарации поврежденного эндотелия и миокарда. Принимая во внимание представления о роли ЦПК в репарации сосудистой стенки и неоваскуляризации, мы предположили, что наличие сопутствующего СД2 может оказывать влияние на количество ЦПК в периферической крови больных ИБС и таким образом усугублять сосудистую патологию [23, 37, 42].

8.1. Количество циркулирующих прогениторных клеток у больных с ишемической хронической сердечной недостаточностью

Результаты показали, что наибольшее количество ЦПК определялось в группе сравнения, без ССЗ и у больных с ишемической ХСН без сопутствующего СД2, а наименьшее - у больных ИБС с ХСН и сопутствующим СД2 и СД2 без ИБС. Так, количество клеток суммарной фракции CD34⁺/млн. лейкоцитов в группе сравнения составляло 594,0 (436,5-850,5); у больных ИБС с ХСН без СД2 - 730 (454,0-1160,0); у больных ИБС с ХСН, с сопутствующим СД2 350,0 (200,0-579,0); у больных СД2 без ХСН 398,0 (248-810,0) клеток/млн. лейкоцитов (таблица 36).

У больных с ишемической ХСН без сопутствующего СД2 усредненное количество ЦПК было выше, чем в контрольной группе, однако эти различия не были достоверными из-за выраженного разброса показателей в группе больных ИБС с ХСН. В то же время, в обеих группах больных с сахарным диабетом количество стволовых/прогениторных клеток в циркуляции было достоверно

меньшим, чем в контрольной группе без ИБС и СД2 и в группе больных ИБС с ХСН. Это позволяет предполагать, что именно сахарный диабет является причиной снижения количества ЦПК.

Таблица 36 – Количество ЦПК в обследованных группах

Количество ЦПК (CD 34 ⁺ клеток/млн. лейкоцитов)			
Группа сравнения (1) n=25	ХСН (2) n=30	ХСН+СД2 (3) n=25	СД2 без ХСН (4) n=32
594,0 (436,5-850,5)	730,0 (454,0-1160,0)	350,0 (200,0-579,0)	398,0 (248-810,0)

Примечание: $p^{1-2} = 0,993$; $p^{1-3} = 0,0002$; $p^{1-4} = 0,0291$; $p^{2-3} = 0,0014$; $p^{2-4} = 0,066$; $p^{3-4} = 0,322$.

В поисках объяснения обнаруженных различий между группами больных мы проанализировали взаимосвязь количества ЦПК с тяжестью сердечной недостаточности. Оказалось, что количественное содержание прогениторных клеток в периферической крови не зависит от ФК сердечной недостаточности, как в объединенной группе больных ХСН, так и в отдельно взятых группах ХСН и ХСН, сочетанной с диабетом, хотя в некоторых исследованиях такая взаимосвязь была продемонстрирована [74, 101, 363].

Корреляционный анализ в объединенной группе больных с ХСН позволил выявить связь количества ЦПК с параметрами углеводного, липидного обмена, циркулирующими факторами роста, натрийуретическим пептидами и такими характеристиками ЛЖ как ФВ ЛЖ, КСО и КДО, а также с показателем эндотелиальной дисфункции (таблица 37).

В группе сравнения подобных связей обнаружено не было.

В группе больных СД2 без ХСН обнаружены корреляционные связи уровня ЦПК с такими параметрами как С-реактивный белок ($R = -0,56$, $p = 0,0543$), максимальный объем предсердия ($R = 0,64$, $p = 0,0425$) и толщина задней стенки левого предсердия ($R = 0,66$, $p = 0,0351$).

Таблица 37 – Корреляционный анализ ЦПК с биохимическими показателями и параметрами ЭХО-КГ в объединенной группе больных с ХСН

Показатель	Sperman, R	p-value
Глюкоза ммоль/л	-0,43	0,001
HbA1c, %	-0,53	<0,001
Триглицериды, ммоль/л	-0,29	0,037
VEGF, пг/мл	-0,47	0,003
Лептин, пг/мл	0,29	0,050
Адипонектин, пг/мл	0,28	0,057
Эндотелин, пг/мл	-0,25	0,062
NT-proBNP, пг/мл	-0,40	0,002
MR-proNP, пг/мл	-0,36	0,006
ФВ ЛЖ, %	0,36	0,007
КСО, мл	-0,35	0,022
КДО, мл	-0,31	0,044
ПЗВД, %	0,30	0,026

8.1.1. Влияние гипергликемии на количество циркулирующих прогениторных клеток у больных с ишемической хронической сердечной недостаточностью и сопутствующим сахарным диабетом 2 типа

Дальнейший анализ показал, что количество CD34⁺ ЦПК в объединенной группе всех участников исследования статистически значимо обратно коррелирует с уровнем глюкозы плазмы натощак ($r=-0,38$, $p=0,0003$) и гликозилированного гемоглобина ($r=-0,49$, $p<0,0001$).

Корреляционная зависимость между этими параметрами сохранялась и в объединенной группе больных диабетом (ХСН, в сочетании с СД2 и СД2 без ХСН), но несколько меньшей силы, что вполне закономерно при исключении из анализа контрольной группы и больных ИБС без СД2, имеющих нормальные уровни показателей углеводного обмена (рисунок 36).

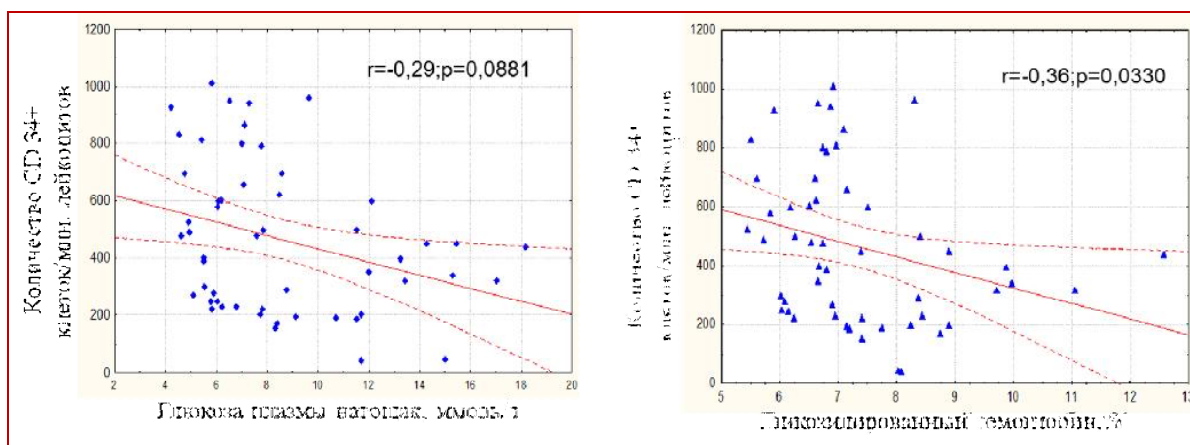


Рисунок 36 – Корреляционные связи между количеством циркулирующих CD34⁺ клеток и уровнем глюкозы плазмы натощак и гликозилированного гемоглобина у больных диабетом

Полученные результаты свидетельствуют о том, что у больных диабетом количество циркулирующих стволовых/прогениторных CD34⁺ клеток зависит от эффективности контроля гликемии. Сравнительный анализ показал, что у больных СД2 и уровнем HbA1c <7% (HbA1c=6,5±0,10%) в сравнении с больными диабетом и уровнем HbA1c >7% (HbA1c=8,7±0,32%) количество ЦПК составило 480,0 [350,0-660,0]/млн. лейкоцитов, что было больше в 2 раза, чем у больных с неудовлетворительным контролем гликемии, у которых количество ЦПК составило 220,0 [150,0-341,0]/ млн. лейкоцитов, (рисунок 37).

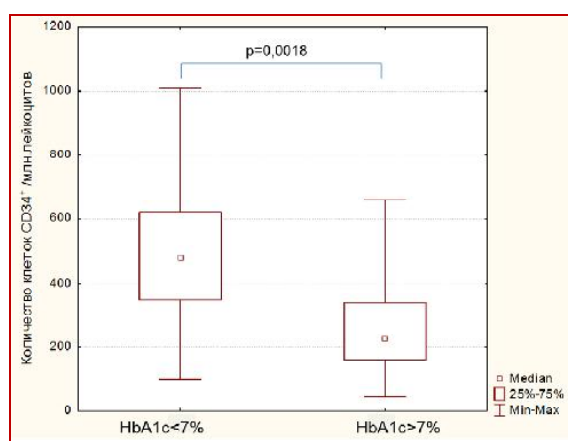


Рисунок 37 – Количество циркулирующих клеток суммарной фракции CD34⁺ у больных диабетом и уровнем HbA1c<7% и HbA1c>7%

Применение ROC-анализа позволило выявить ассоциацию количества ЦПК с диабетом. ROC-Area $\pm$ S.E. составила 0,72 $\pm$ 0,04 (95%ДИ=0,65-0,85), $p=0,0008$ (рисунок 38).

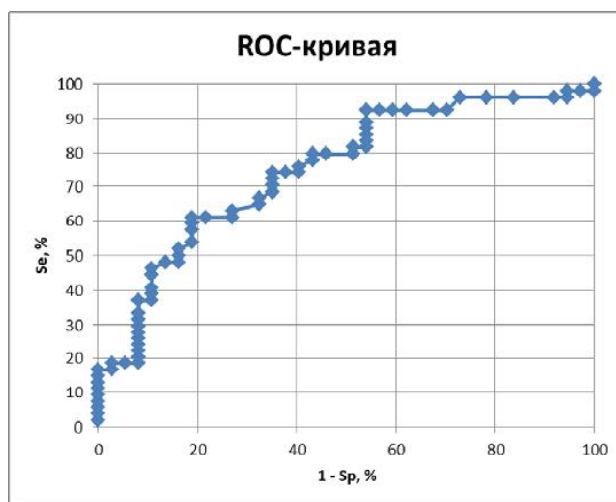


Рисунок 38 – Характерологическая кривая (ROC-кривая) чувствительности и специфичности значений ЦПК у больных СД2

Оказалось, что количество ЦПК менее 532 клеток/млн. лейкоцитов (чувствительность - 61,1%, специфичность 88,1%) ассоциируется с наличием диабета.

Корреляционный анализ в объединенной группе больных диабетом позволил обнаружить связи ЦПК с параметрами углеводного, липидного обмена, циркулирующими ангиогенными факторами роста, адипонектином и показателями дисфункции эндотелия и структурных изменений в брахиоцефальных артериях, (таблица 38).

Обращает на себя внимание обратная связь между количеством ЦПК и ТКИМ, показывающая, что у больных с более выраженным поражением брахиоцефальных артерий количество этих клеток в циркуляции снижено, учитывая в целом меньшее количество ЦПК у больных СД2. Можно предположить, что более выраженное поражение атеросклерозом крупных артерий связано либо с нарушенной мобилизацией ЦПК из костного мозга при

сахарном диабете, либо, а, возможно, и в сочетании с "потреблением" ЦПК зонами атеросклеротического поражения артерий.

Таблица 38 – Корреляционный анализ ЦПК с биохимическими показателями и параметрами ЭХО-КГ в объединенной группе больных СД2

Показатель	Sperman, R	p-value
Глюкоза ммоль/л	-0,29	0,088
HbA1c, %	-0,39	0,016
Триглицериды, ммоль/л	-0,35	0,046
VEGF, пг/мл	-0,39	0,045
Ангиопоэтин-1, пг/мл	0,46	0,009
Общий адипонектин, пг/мл	0,30	0,011
BM адипонектин, пг/мл	0,39	0,029
NT-proBNP, пг/мл	-0,32	0,055
ПЗВД, %	0,37	0,025
ТКИМ, мм	-0,47	0,016

Известно, что для больных диабетом характерно более раннее начало и быстрое прогрессирование атеросклероза, развитие полисегментарных сосудистых поражений, что, соответственно, должно сопровождается увеличением зон повреждения эндотелия, "потребляющих" для репарации циркулирующие прогениторные клетки.

Полученные результаты указывают на гипергликемию, как на ключевой фактор, влияющий на количество стволовых/прогениторных CD34+ клеток в циркуляции, которое в свою очередь может явиться фактором, влияющим на такие важные с прогностической точки зрения показатели, как выраженность атеросклеротического поражения крупных сосудов и дисфункция эндотелия [369, 387, 404].

8.1.2. Количество циркулирующих прогениторных клеток у больных сахарным диабетом 1 типа

В качестве контроля на влияние именно гипергликемии на количество циркулирующих прогениторных клеток мы исследовали больных СД1 типа, который в сравнении с СД2 типа представляет собой более "чистую"

клиническую модель метаболических нарушений, поскольку характерен для лиц более молодого возраста и имеющих меньшее количество модифицируемых факторов риска, которые могли бы повлиять на уровень ЦПК в периферической крови.

Мы обнаружили, что у больных СД1 типа в сравнении со здоровыми добровольцами того же пола и возраста количество ЦПК так же снижено и обратно коррелирует с уровнем гликозилированного гемоглобина (рисунок 39).

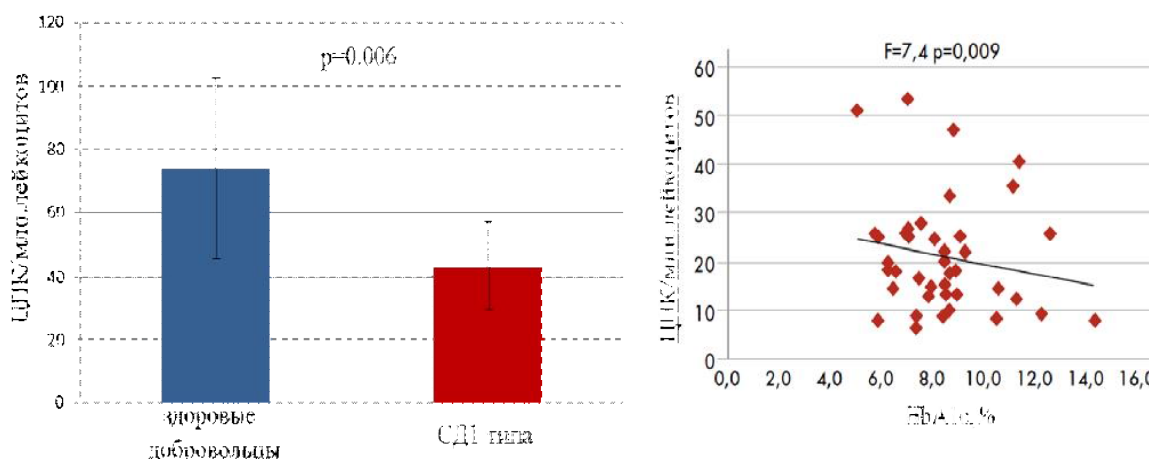


Рисунок 39 – Количество циркулирующих CD 34+ прогениторных клеток у больных сахарным диабетом1 типа и корреляционная связь с уровнем гликозилированного гемоглобина [42]

Полученные результаты указывают на то, что гипергликемия является важнейшим фактором, отрицательно влияющим на количество циркулирующих ангиогенных прогениторных клеток.

8.2. Прогностическое значение циркулирующих прогениторных клеток у больных с ишемической хронической сердечной недостаточностью и сопутствующим сахарным диабетом 2 типа

Хроническая сердечная недостаточность широко распространена в популяции, что представляет собой важную медицинскую, социальную и экономическую проблему. Известно, что ХСН это комплексный синдром,

представляющий собой исход многих ССЗ, таких как инфаркт миокарда, приводящий к потере части миокарда, который не восстанавливается за счет эндогенных репаративных процессов; артериальная гипертония, приводящая к развитию диффузного фиброза сердца; воспалительные и аутоиммунные, генетические заболевания миокарда, пороки сердца. Подавляющее число больных с ХСН представлены постинфарктной сердечной недостаточностью. Хотя за последние 20 лет был сделан существенный прогресс в лечении ХСН, прогноз ее остается фатальным и все виды имеющейся терапии направлены только на ограничение ее прогрессирования. Во многом это обусловлено тем, что важнейшие подгруппы пациентов с ХСН достаточно не исследованы. Это особенно касается пациентов, у которых ХСН сочетается с метаболическими расстройствами, такими как метаболический синдром, СД2 и ожирение. Известно, что пациенты с ХСН, сочетающейся с инсулинорезистентностью и СД2, характеризуются значительно более тяжелым течением и плохим прогнозом, что диктует необходимость более ранней диагностики такого сочетания и более агрессивного ведения таких больных [28, 37]. Качество и продолжительность жизни больного с ХСН во многом зависят от наличия, выраженности и сочетания так называемых факторов риска (ФР) неблагоприятного прогноза. Объективная риск-стратификация у больных ХСН с учетом независимых ФР не всегда возможна в связи с различной этиологией ХСН, индивидуальными особенностями ее течения, наличием сопутствующей патологии, влияющей на прогностическую ценность ФР. К ФР относят целый ряд показателей, таких как возраст, наличие ИБС, сахарного диабета, тяжесть ХСН, тахикардия, снижение массы тела, низкая фракция изгнания левого желудочка, снижение результатов теста 6-минутной ходьбы, повышение уровней мозгового натрийуретического пептида, мочевой кислоты, креатинина, тропонина, показатели "ремоделирования" камер сердца и пр. [28, 37].

Раскрытие роли стволовых клеток в механизмах репарации эндотелия и в репаративном васкулогенезе, а также те корреляционные связи с

прогностически важными показателями, которые были обнаружены нами (пептиды, ТКИМ, ПЗВД) обосновывает целесообразность изучения прогностического значения количества ЦПК у данной категории больных.

В последние годы особое внимание привлечено к исследованию клеточных маркеров тяжести различных заболеваний, в том числе сердечно-сосудистых, что обусловлено большим количеством исследований состояния стволовых и прогениторных клеток при различных патологиях и обнаружением связей между количественными и качественными характеристиками различных типов этих клеток и клиническими характеристиками пациентов.

По современным представлениям ключевую роль в регенеративных процессах в организме играют стволовые клетки, способные к самовоспроизведению, дифференцировке и к воспроизведению различных клеток других видов, то есть к трансформации через этапы клеток-предшественников в высокодифференцированные органо-специфичные клетки, например, в клетки эндотелия сосудов, кардиомиоциты, клетки крови, гепатоциты и другие [64, 84, 175, 180, 184]. Помимо этого, важнейшим механизмом стимуляции процессов регенерации тканей стволовыми и прогениторными клетками является их способность продуцировать большое количество биологически активных молекул, стимулирующих восстановительные процессы в тканях [44, 45, 47, 308].

Многие, если не все, заболевания сердечно-сосудистой системы связаны с дисфункцией эндотелия сосудов. Особая роль в процессе восстановления эндотелиального слоя и в поддержании его нормальной функции отводится циркулирующим в периферической крови предшественникам эндотелиальных клеток (ПЭК) [34]. Впервые популяция ПЭК была изолирована из циркулирующей моноклеарной фракции в 1997 г. Asahara T. et al. [65]. Эти клетки были охарактеризованы авторами как клетки с низкой экспрессией или полным отсутствием на своей поверхности общего лейкоцитарного антигена CD45 и наличием специфичных для предшественников (CD34) и зрелого

эндотелия (рецепторы 2 типа к VEGF (VEGF-R2)) клеточных маркеров. В последующем было продемонстрировано, что эти клетки представлены в циркуляции несколькими субпопуляциями, в частности субпопуляция, несущая маркер CD133+, представляет ранние предшественники эндотелиальных клеток, мобилизованные из костного мозга и в определенных условиях способные дифференцироваться в клетки с эндотелиальным фенотипом [23, 65].

Относительно недавно было показано, что увеличение количества циркулирующих предшественников эндотелиальных клеток может отражать наличие васкулярной патологии, эндотелиальной дисфункции и служить биомаркером заболеваний сосудов, а уменьшение пула ПЭК может приводить к нарушениям адаптивного ангиогенеза. Показано, что метаболический синдром и СД2 могут существенно влиять на количество и функциональные характеристики ПЭК при данных патологиях [23, 37].

У больных с сердечной недостаточностью имеется дисфункция эндотелия. Однако работ, посвященных исследованию популяций циркулирующих клеток-предшественников при сердечной недостаточности крайне мало и результаты их противоречивы [363]. Недавно показано, что СД2 обладает повреждающим действием на ПЭК и их мобилизацию из "костно-мозговой ниши", что может приводить к снижению количества этих клеток в циркуляции, нарушению их участия в репарации эндотелия сосудов и в ангиогенезе, а следовательно, и в восстановлении тканей после ишемического повреждения [205, 226, 228]. Это может приводить к прогрессированию заболеваний ишемической природы и ухудшению их прогноза. Однако способов прогнозирования сердечно-сосудистой летальности у больных с ХСН, ассоциированной с сахарным диабетом, по количеству циркулирующих в крови стволовых и прогениторных клеток не описано.

Существующие на сегодняшний день оценки вероятности развития неблагоприятных сердечно-сосудистых событий у больных с различными

формами хронической сердечной недостаточности (прогрессирование ХСН, повторный ИМ, летальность), например, в зависимости от уровня NT-proBNP (повышение более 1520 фмол/мл) и тканевого ингибитора матриксных металлопротеаз (TIMP-I, повышение более 865 нг/мл) в периферической крови, позволяют выделять среди пациентов с ХСН больных высокого риска, для которых необходимы интенсивное лечение как сердечной недостаточности, так и осложнений. Однако, подобного рода оценки не учитывают, что сопутствующие метаболические расстройства, такие как метаболический синдром, ожирение и сахарный диабет 2 типа, могут влиять на прогностическую ценность уровня NT-proBNP [37, 214, 254, 411].

Это диктует необходимость поиска новых предикторов неблагоприятного исхода для пациентов с ХСН, сочетающейся с метаболическими расстройствами, прежде всего сахарным диабетом. Помимо этого убедительно показано, что использование нескольких предикторов в дополнение к уровням натрийуретических пептидов позволяет значительно повышать прогнозирование исходов ССЗ [261], что делает актуальным разработку новых предикторов неблагоприятного прогноза хронической сердечной недостаточности, особенно при ее сочетании с метаболическими расстройствами, которые могут влиять на прогностическую ценность классических биомаркеров тяжести и прогноза хронической сердечной недостаточности.

При разделении всех больных ИБС с ХСН в том числе и с сопутствующим СД2 на группы с благоприятным течением ХСН (группа А) и неблагоприятным течением ХСН (группа Б) мы обнаружили значительно меньшее (более, чем в два раза) исходное количество CD34+ клеток в циркуляции у больных ХСН, характеризующейся неблагоприятным течением в ходе проспективного наблюдения, (таблица 39).

Таблица 39 – Количество ЦПК в зависимости от характера течения ИБС/ХСН

Количество ЦПК, (клеток/млн. лейкоцитов)		p Mann- Whitney U, тест
Благоприятное течение n=25	Неблагоприятное течение n=18	
560 [341,0-920,0]	260 [150-390]	0,0002

При применении ROC-анализа показателей чувствительности и специфичности прогнозирования неблагоприятного сердечно-сосудистого события по количеству ЦПК выявлена прогностическая значимость данного показателя. ROC-Area $\pm$ S.E. составила 0,79 $\pm$ 0,06 (95%ДИ=0,68-0,92, p=0,0020). Согласно этим данным количество ЦПК менее 450 клеток/млн. лейкоцитов ассоциируется с неблагоприятным сердечно-сосудистым прогнозом в течение проспективного наблюдения.

При анализе вероятности развития неблагоприятных сердечно-сосудистых событий (прогрессирование ХСН, повторный ИМ, летальность) все больные ХСН в зависимости от значений медианы (Me) ЦПК были разделены на две подгруппы: в 1-ю подгруппу (29 человек) вошли пациенты с количеством ЦПК $\leq$ 410,0 кл/млн. лейкоцитов, 2-ю подгруппу (26 человек) составили пациенты с количеством ЦПК>410,0 кл/млн. лейкоцитов. Оказалось, что в 1-й подгруппе неблагоприятные сердечно-сосудистые события в течение проспективного наблюдения отмечались у 25 (86,21%) больных, а во 2-й подгруппе - у 18 (69,23%) пациентов, т.е. на 17% меньше, чем в первой, что было статистически значимо.

Таким образом, вероятность развития неблагоприятных сердечно-сосудистых событий в течение проспективного наблюдения при уровне ЦПК $\leq$ 410 кл/млн. лейкоцитов выше, чем при уровне ЦПК>410 кл/млн.лейкоцитов, (рисунок 40).

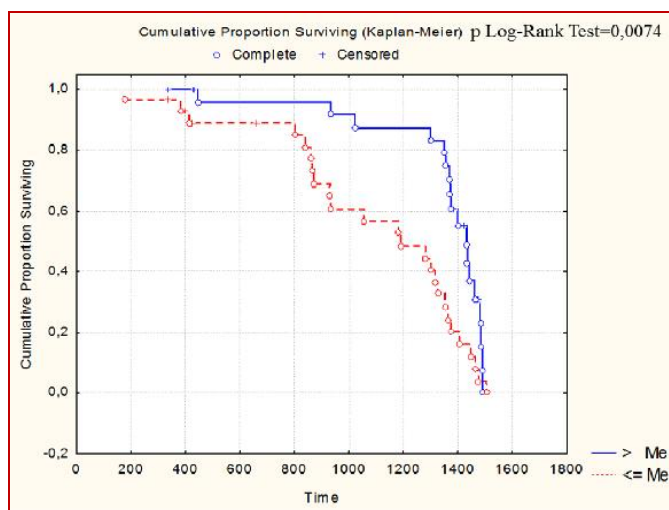


Рисунок 40 – Кривые Каплана-Майера вероятности развития неблагоприятных сердечно-сосудистых событий в ходе проспективного наблюдения в зависимости от количества ЦПК

При анализе взаимосвязи поток-зависимой вазодилатации, как показателя эндотелиальной дисфункции, с наступлением сердечно-сосудистых событий ROC-Area $\pm$ S.E. составила 0,78 $\pm$ 0,06 (95%ДИ=0,65-0,92, $p=0,0063$. Пороговое значение поток-зависимой вазодилатации менее 4,9% ассоциировалась с неблагоприятным прогнозом у больных ХСН (чувствительность - 71,4%, специфичность- 81,3%).

При разделении больных ХСН на две подгруппы в зависимости от медианы (Me) ПЗВД: первую подгруппу составил 31 больной со значением ПЗВД $\leq$ 4,9%, вторую подгруппу составили 24 больных со значением ПЗВД $>$ 4,9%. Оказалось, что неблагоприятные сердечно-сосудистые события наступили в первой подгруппе у 23 больных (74,2%), во второй у 20 (83,3%), различия не достигали статистической значимости, $p=0,0759$, (рисунок 41).

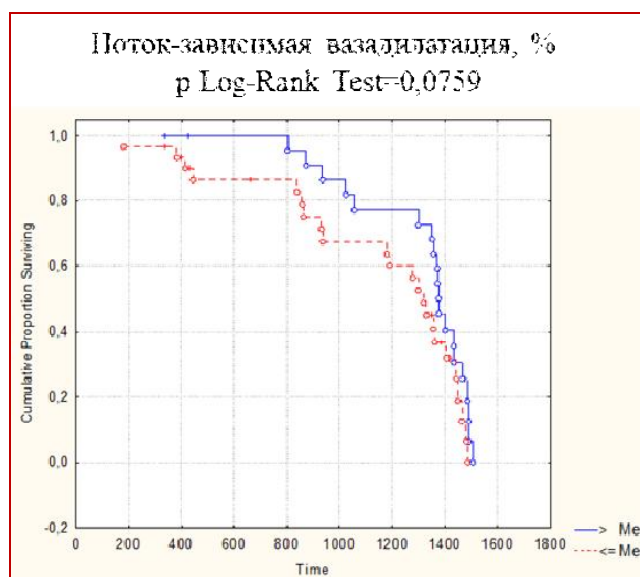


Рисунок 41 – Кривые Каплана-Майера вероятности развития неблагоприятных сердечно-сосудистых событий в ходе проспективного наблюдения в зависимости от величины поток-зависимой вазодилатации

Полученные результаты свидетельствуют о том, что количество ЦПК может быть более точным прогностическим показателем, чем показатель функции эндотелия – ПЗВД у больных ХСН, в том числе при ее сочетании с СД2.

8.3. Анализ прогностической значимости исследованных молекулярных факторов и циркулирующих прогениторных клеток у больных с ишемической хронической сердечной недостаточностью и сопутствующим сахарным диабетом 2 типа

По итогам проспективного наблюдения мы провели анализ прогностической значимости исследованных клеточных и молекулярных факторов: циркулирующих прогениторных клеток, эндотелина-1, натрийуретических пептидов, ангиогенных факторов и ЭХО-КГ параметров методом логистической регрессии (множественная регрессия с логит-преобразованием). Больные с ишемической ХСН без СД2 и ХСН с

сопутствующим СД2 были сопоставимы по возрасту и полу, что позволило пренебречь данными показателями.

Результаты однофакторного и многофакторного анализа влияния исследованных факторов на исход ИБС и ХСН при проспективном наблюдении представлены в таблице 40.

В однофакторном анализе наиболее прогностически неблагоприятными факторами оказались: низкий уровень ЦПК и высокий уровень циркулирующего эндотелина-1, увеличивая риск неблагоприятного течения ИБС в 9 и 6 раз, соответственно; высокий уровень натрийуретических пептидов, выраженность ДД ЛЖ по соотношению E/e', в меньшей степени, но также статистически значимо ассоциировались с неблагоприятным течением ИБС.

Таблица 40 – Однофакторный и многофакторный анализ влияния циркулирующих прогениторных клеток, эндотелина-1, натрийуретических пептидов, ангиогенного фактора HGF и параметров эхокардиографии на течение ишемической болезни сердца и хронической сердечной недостаточности при проспективном наблюдении

Фактор n=43	Однофакторный анализ		Многофакторный анализ	
	ОШ (5%-95% ДИ)	p	ОШ (5%-95% ДИ)	p
ЦПК/млн.лейкоцитов	9,3 (2,09-38,6)	0,002	8,01 (1,26-51,8)	0,022
Эндотелин-1, пг/мл	6,2 (1,5-25,8)	0,009	2,6 (0,25-26)	0,4
MR-proANP, пг/мл	3,9 (1,2-14,9)	0,041	1,7 (0,17-15,9)	0,6
NT-proBNP, пг/мл	4,6 (1,2-17,9)	0,022	1,32 (0,12-14,5)	0,8
HGF, пг/мл	3,6 (0,95-13,2)	0,051	4,6 (0,5-41,3)	0,15
ФВ ЛЖ, %	2,4 (0,6-9,1)	0,2	1,5 (0,18-12,3)	0,6
Соотношение E/e'	5,8 (1,4-23,8)	0,011	1,97 (0,25-15,6)	0,5

В многофакторном анализе только низкий уровень ЦПК сохранял высокую прогностическую значимость, увеличивая риск неблагоприятного течения ИБС в 8 раз (p=0,022), что может отражать снижение репаративного

потенциала клеток сосудов, усугубляя сосудистые нарушения и отягощая течение ХСН и ИБС в целом.

Несмотря на то, что представленная модель прогноза вероятности неблагоприятного течения ИБС построена на небольшой выборке больных ХСН и небольшом количестве ССС за весь период проспективного наблюдения, тем не менее, многофакторный анализ, включающий только уровень ЦПК и концентрацию эндотелина-1 свидетельствует, что оба этих показателя сопоставимо увеличивают риск неблагоприятного течения ИБС и ХСН в 7,4 и 6,8 раза, соответственно ($\chi^2=19,9$; $p<0,001$), (таблица 41) что, безусловно, нуждается в уточнении на большей выборке больных.

Таблица 41 – Многофакторный анализ влияния циркулирующих прогениторных клеток, эндотелина-1 на течение ишемической болезни сердца и хронической сердечной недостаточности при проспективном наблюдении

Фактор n=43	Многофакторный анализ	
	ОШ (5%-95%) ДИ	p
ЦПК, млн/лейк.	7,4 (2,1-25,8)	0,001
Эндотелин-1, пг/мл	6,8 (1,94-24,0)	0,002

В целом, результаты, полученные в этой части работы, свидетельствуют о том, что одновременное присутствие у больных с ишемической систолической ХСН в сочетании с СД2 более выраженных диастолических нарушений, повышенной сывороточной активности эндотелина-1 и недостаточной эффективности системы натрийуретических пептидов, гипoadипонектинемии и пониженного количества циркулирующих прогениторных клеток, может являться совокупным фактором неблагоприятного (отягощенного) течения сердечной недостаточности и ИБС в целом.

Резюме

В результате проведенного исследования мы обнаружили, что количество прогениторных CD34⁺ клеток в периферической крови больных ХСН не зависит от функционального класса NYHA, хотя в литературе имеются единичные сведения о связи между тяжестью сердечной недостаточности и уровнем циркулирующих прогениторных CD34⁺клеток. Возможно, отсутствие такой связи в нашем исследовании объясняется тем, что в него были включены больные сердечной недостаточностью II-III ФК NYHA, но отсутствовали больные с I и IV ФК NYHA, как было в других исследованиях [75, 363].

Мы установили, что наличие такой хронической патологии как сахарный диабет сопряжено со значительным снижением количества ЦПК в сравнении с больными, у которых нет диабета. В ходе анализа полученных результатов мы обнаружили обратную корреляционную связь количества ЦПК и уровня глюкозы плазмы натощак и гликозилированного гемоглобина, как в целом по выборке ($r = -0,38$, $p = 0,0003$) и ($r = -0,49$, $p < 0,0001$), соответственно, так и в объединенной группе больных диабетом (ХСН+СД2 и СД2 без ХСН), ($r = -0,29$, $p = 0,0881$) и ($r = -0,39$, $p = 0,0162$), соответственно.

На сегодняшний день среди возможных механизмов снижения количества циркулирующих прогениторных клеток у больных СД2 обсуждаются такие как нарушение процессов мобилизации клеток-предшественников из костного мозга повышенное "потребление" этих клеток в зонах ишемии, повреждения эндотелия, непосредственное повреждение самих ЦПК при воздействии различных факторов риска, наконец, что наиболее вероятно, сочетанное действие перечисленных выше механизмов [23, 369].

Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что гипергликемия может являться одним из факторов, способствующих снижению числа ЦПК.

По данным N. Krankel N. et al., длительная инкубация клеток-предшественников в среде с высокой концентрацией глюкозы приводит к

дозозависимому снижению их количества и пролиферативной активности, ускорению старения, нарушению миграции и способности к образованию капилляроподобных трубочек. Негативное действие повышенной концентрации глюкозы на предшественников эндотелиальных клеток связано с подавлением синтеза NO. При этом отрицательное влияние повышенного уровня глюкозы нивелируется при инкубации этих клеток с донором оксида азота – нитропруссидом натрия и усугубляется при добавлении ингибиторов eNOS [210]. Как отмечалось ранее, данные ряда авторов также свидетельствуют о негативном влиянии СД2 на количество ЦКП. Так, резкие колебания уровня глюкозы крови оказывают влияние на количество ЦКП, при этом низкий уровень клеток в периферическом кровотоке объясняется непродолжительностью периода их жизни в крови больных с диабетом. Этой же группой ученых было выявлено снижение как $CD34^+$ (на 33,0%), так и $CD34^+/VEGF-R2^+$ (на 40,0%) клеток у больных диабетом 2 типа ($HbA1c > 7,5\%$) в сравнении со здоровыми донорами. Кроме того, была обнаружена обратная корреляция между числом $CD34^+/VEGF-R2^+$ и уровнем глюкозы крови [23, 42, 221]. Те же авторы опубликовали данные не только о снижении числа ЦКП, но и нарушении функциональных способностей культивированных клеток-предшественников эндотелия при диабете 2 типа [42]. Их выводы согласуются с результатами, полученными О. Террегер с соавт., которые наблюдали снижение пролиферации, адгезии и способности участвовать в образовании капилляроподобных структур *in vitro* эндотелиальных клеток-предшественников, полученных от больных СД2 [53, 356]. Показано, что в основе этих нарушений лежит оксидативный стресс, снижение уровней VEGF-R2 и SDF-1, а также ухудшение биодоступности NO [370, 379, 389].

Авторы независимо друг от друга пришли к выводу, что низкий уровень $CD34^+$ и $CD34^+/VEGF-R2^+$ клеток в крови и нарушение их функциональных способностей при СД2 могут оказаться важным патофизиологическим

механизмом раннего развития атеросклероза и сосудистых осложнений у больных с этим заболеванием [23, 42, 198].

У больных СД2 (ХСН+СД2 и СД2 без ХСН) количество ЦПК прямо соотносилось с величиной ПЗВД и обратно с ТКИМ. Иными словами, меньшее количество $CD34^{+}$ клеток в циркуляции соответствовало меньшей ПЗДВ, то есть более выраженной дисфункции эндотелия, а также большей толщине комплекса интима-медиа, отражающей атеросклеротическое поражение брахиоцефальных артерий. Учитывая связь между гипергликемией и количеством $CD34^{+}$ клеток в циркуляции можно предположить, что сахарный диабет может усугублять эндотелиальную дисфункцию и ускорять развитие атеросклероза крупных сосудов в том числе и за счет нарушений мобилизации и, возможно, функции эндотелиальных прогениторных клеток. Это предположение подтверждается экспериментальными данными [122, 345, 369].

Полученные нами данные в сопоставлении с данными литературы указывают на то, что гипергликемия у больных диабетом может быть важнейшим фактором, влияющим на количество прогениторных клеток в циркуляции, а это количество может влиять как на развитие дисфункции эндотелия, так и на развитие атеросклероза. Видимо, на ранних этапах и в условиях удовлетворительного контроля гликемии дисфункция эндотелия может носить функциональный обратимый характер. Вместе с тем, неудовлетворительный контроль гликемии, хроническая гипергликемия, дислипидемия, которая также характерна для диабета, приводят не только к функциональным нарушениям сосудов, но и к структурным изменениям, характерным для атеросклероза.

Известно, что на чувствительность тканей к инсулину оказывают влияние различные факторы, в том числе пожилой возраст, наличие избыточной массы тела и характер распределения жировой ткани, наличие гипертензии, дислипидемии, многие заболевания сердечно-сосудистой системы, включая диабет и ИБС. При этом повышенный уровень инсулина способствует не

только дисфункции эндотелия, но и является мощным фактором, стимулирующим клеточную пролиферацию, способствует раннему развитию и прогрессированию атеросклероза у больных с данными патологиями [223].

В физиологических условиях инсулин является, прежде всего, анаболическим гормоном, но в патологических условиях (как правило, сопровождающихся гипоксией тканей) инсулин проявляет митогенные свойства, способствует высвобождению инсулиноподобного фактора роста-1 (ИФР-1) и многих других факторов роста и цитокинов, стимулирует мобилизацию прогениторных клеток из костного мозга или тканевых депо, индуцирует пролиферативные процессы в стенках сосудов. В исследованиях *in vitro* при культивировании суммарной популяции CD34⁺ клеток в условиях гиперинсулинемии (3 μ M) первоначально увеличивается число этих клеток в культуре, но по мере культивирования наблюдается снижение общего числа клеток и появление клеток, фенотипически напоминающих гладкомышечные клетки, фибробласты и моноциты. Авторы полагают, что изменение пролиферативного и дифференцировочного потенциала CD34⁺ клеток в условиях гиперинсулинемии может способствовать раннему атерогенезу у больных диабетом [23].

Несмотря на то, что все больные диабетом получали антидиабетическую терапию, которая, возможно, нивелирует истинные значения ИРИ в сыворотке, в нашем исследовании оказалось, что уровень ИРИ и С-пептида у больных ХСН, в сочетании с диабетом почти в 2 раза выше, чем у больных ХСН без диабета и в контрольной группе. Однако, имеющиеся различия в количественном содержании ИРИ и С-пептида между группами никак не влияли на их взаимосвязь с количеством ЦПК, хотя по некоторым данным гиперинсулинемия ассоциируется с пониженным количеством прогениторных клеток [23].

Помимо этого, имеются сведения, согласно которым адекватная инсулинотерапия в течение 5 недель у больных диабетом с

неудовлетворительным контролем гликемии ($HbA1c=10,6\pm1,6\%$) способствует увеличению в периферической крови количества $CD34^+CD133^+$ клеток, считающихся ранними эндотелиальными предшественниками. Полагают, что подобный эффект опосредован стимулирующим влиянием инсулина на экспрессию в периферических тканях и костном мозге SDF-1 - одного из ключевых факторов, участвующих в мобилизации ЦПК из костно-мозговой ниши, что приводит к увеличению этого пула предшественников в периферической крови [23].

Описано несколько механизмов влияния инсулина на функцию эндотелия. Инсулин активирует фосфатидилинозитол-3-киназу в эндотелиальных клетках, что приводит к стимуляции экспрессии eNOS, высвобождению NO эндотелием и инсулинобусловленной вазодилатации, лежащей в основе сосудистого протективного эффекта инсулина. При ИР показано уменьшение инсулиноопосредованной и нарушение эндотелий-зависимой вазодилатации. С другой стороны, инсулин может оказывать повреждающее действие на сосуды через митоген-активированные протеинкиназы и активацию экспрессии различных факторов роста, что ведет к пролиферации и миграции гладкомышечных клеток, способствующих процессам патологического сосудистого ремоделирования и прогрессированию атеросклероза [23].

В нашей работе в ходе проспективного наблюдения мы обнаружили, что низкий уровень циркулирующих прогенитрных клеток является независимым предиктором неблагоприятного прогноза у больных сердечной недостаточностью в том числе с сопутствующим сахарным диабетом [37, 204, 205]. Прогностическое значение этого показателя по полученным данным на исследованных нами группах больных более сильное, чем таких классических биомаркеров, как мозговой и предсердный натрийуретические пептиды и фракция выброса левого желудочка. Учитывая небольшое количество больных в нашем исследовании этот факт, безусловно, требует подтверждения в

дополнительных исследованиях на большей выборке пациентов. Полученные нами данные являются основанием для организации такого исследования.

Изучение и понимание механизмов, посредством которых диабет 2 типа может влиять на количество и функциональное состояние прогениторных клеток, важно для разработки эффективных методов диагностики и коррекции микро- и макроангиопатий. Разработка подходов к увеличению количества этих клеток и/или изменение (улучшение) ряда их характеристик представляется рациональным терапевтическим инструментом [13, 54, 107, 118, 197, 285, 287]. В настоящее время во всем мире производятся попытки использования аутологичных прогениторных клеток в терапевтических целях, как для неоваскуляризации, так и для лечения сердечной недостаточности [23].

Безусловный интерес вызывает изучение функциональных характеристик прогениторных клеток, изолированных от больных сердечной недостаточностью и диабетом [23].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сердечно-сосудистые заболевания, в том числе СД2 сохраняют лидирующие позиции среди основных причин инвалидности и смертности населения. Одним из открытых вопросов на сегодня остается поиск биологических маркеров неблагоприятного прогноза у отдельной категории больных, а именно у больных с сердечно-сосудистыми заболеваниями и коморбидной патологией. Наиболее распространенным сочетанием патологий во всем мире является сочетание ИБС с диабетом 2 типа и ожирением.

Прежде всего следует отметить ряд клинических особенностей, обнаруженных нами у больных ИБС и постинфарктной ХСН при ее сочетании с ожирением и СД2. Во-первых, сочетание ожирения и СД2 у больных постинфарктной ХСН быстрее приводит пациента к более высокому функциональному классу по НУНА (подавляющее большинство больных были III ФК со значительным снижением толерантности к физической нагрузке). Второй отличительной чертой являлось то, что у больных ИБС и постинфарктной систолической ХСН при ее сочетании с ожирением и СД2 чаще диагностировалась диастолическая дисфункция ЛЖ. Таким образом, в данной работе основным объектом исследования были больные преимущественно с систоло-диастолической сердечной недостаточностью ишемического генеза, у части больных сочетающейся с ожирением и СД2.

В нашей работе было показано, что больные с постинфарктной ХСН, при ее сочетании с ожирением и СД2 характеризуются определенным нейрогормональным статусом. Так, мы установили, что наличие у больных ИБС и ХСН сопутствующего ожирения сопряжено с более низким уровнем NT-proBNP и MR-proANP, чем у больных ИБС и ХСН, но без ожирения. Поэтому у больных ХСН и сопутствующим ожирением диагностическая ценность НУП может быть снижена, а значит, исследованные классические маркеры не корректно отражают тяжесть ХСН.

Кроме этого, исходя из роли натрийуретических пептидов в регуляции деятельности сердечно-сосудистой системы, можно предполагать более тяжелое течение сердечной недостаточности у больных ХСН, сочетанной с ожирением. Ожирение является фактором, вероятно, ухудшающим прогноз данной категории больных, так как согласно полученным нами данным неблагоприятные сердечно-сосудистые события в ходе 4-х летнего проспективного наблюдения чаще регистрировались у больных ИБС и ХСН с сопутствующим ожирением.

Кроме этого мы обнаружили, что у больных ХСН без СД2 уровень циркулирующих NT-proBNP и MR-proANP не зависит от функционального класса сердечной недостаточности. У больных ХСН с сопутствующим СД2 концентрация NT-proBNP, но не MR-proANP в сравнении с больными ХСН без СД2 повышена и ассоциируется с более высоким функциональным классом сердечной недостаточности.

Также, мы показали, что активность системы эндотелина у больных с постинфарктной систолической ХСН и сопутствующим СД2 повышена и, по-видимому, может играть значимую патогенетическую роль в инициации и прогрессировании ДД ЛЖ.

Мы обнаружили, что уровень циркулирующего эндотелина-1 коррелирует с выраженностью ДД и связан с неблагоприятным прогнозом больных постинфарктной ХСН и сопутствующим СД2. Это позволило нам предположить, что нарушения в системе эндотелина могут играть важную роль в инициации и прогрессировании ДД ЛЖ у больных ИБС с постинфарктной ХСН и сопутствующим СД2.

Нарушение жирового обмена часто встречается при многих заболеваниях сердечно-сосудистой системы, однако какой вклад вносит ожирение в развитие сердечно-сосудистых осложнений все еще остается не выясненным.

В нашем исследовании показано, что циркулирующие концентрации лептина и адипонектина у больных ИБС и сердечной недостаточностью

ассоциированы с метаболическими нарушениями. Установлено, что уровень циркулирующего лептина у больных ИБС и ХСН с сопутствующим ожирением и СД2 коррелирует с количеством жира в организме. Кроме этого, мы обнаружили, что циркулирующий уровень общего и ВМ адипонектина в объединенной группе больных ХСН обратно коррелирует с количеством жировой массой.

Мы обнаружили, что сывороточная концентрация общего адипонектина менее 33,3 пг/мл ассоциируется с сердечной недостаточностью, а прямые коррелятивные взаимосвязи адипонектина и натрийуретических пептидов могут отражать синергичное однонаправленное действие этих белков, препятствуя гипертрофии миокарда, апоптозу кардиомиоцитов, уменьшая воспаление и реакции оксидативного стресса.

Помимо особенностей нейрогормонального и адипокинового статуса больные ИБС с постинфарктной ХСН и сопутствующим СД2 характеризуются особенностями системы, регулирующей ангиогенез. В частности, мы обнаружили, что уровни ангиогенных факторов роста (VEGF, HGF и PlGF) в периферической крови повышены у больных с сопутствующим СД2 по сравнению с больными без СД2 и не зависят от функционального класса сердечной недостаточности. Обнаруженные прямые коррелятивные связи уровней ангиогенных факторов с уровнями гликемии и гликированного гемоглобина указывают на то, что именно нарушения углеводного обмена могут являться причиной повышения в крови этих больных ангиогенных факторов, а не выраженность ХСН.

Помимо ангиогенных факторов роста важную роль в компенсаторной реваскуляризации при ишемии могут играть циркулирующие прогениторные клетки – предшественники эндотелиальных клеток. Они не только способствуют реваскуляризации, встраиваясь в вновь образующиеся сосуды, но и выполняют важную роль в репарации эндотелия сосудов. Мы обнаружили, что наличие сопутствующего СД2 у больных ИБС с ХСН ассоциируется с

уменьшением количества эндотелиальных предшественников в циркуляции. Более того, декомпенсация нарушений углеводного обмена, по-видимому, является фактором, способствующим снижению количества этих клеток в периферической крови. Так у больных с уровнем $HbA1c > 7\%$ количество ЦПК снижено более чем в 2 раза в сравнении с их уровнем у больных с $HbA1c < 7\%$. Результаты 4-х летнего проспективного наблюдения показали, что низкий уровень ЦПК (< 440 клеток/млн.лейкоцитов) является независимым предиктором неблагоприятного прогноза у больных ИБС и постинфарктной ХСН и сопутствующим СД2 в сравнении с доплеровскими показателями морфофункционального состояния сосудов - поток-зависимой вазодилатацией и толщиной комплекса интима-медиа.

Помимо ЦПК важную роль в регуляции компенсаторного ангиогенеза играют резидентные мезенхимальные стволовые клетки, располагающиеся в сосудистом компартменте большинства тканей организма. Располагаясь периэндотелиально и супраадвентициально эти клетки участвуют в регуляции ангиогенеза, процессов воспаления и в целом регенеративных/репаративных процессов за счет уникальной паракринной активности. Мы исследовали влияние ИБС и сопутствующего сахарного диабета 2 типа на антигенные свойства мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани и установили, что МСК этих больных характеризуются сниженной способностью стимулировать ангиогенез за счет паракринных механизмов. Однако, это снижение не обусловлено сниженной секрецией ангиогенных факторов, напротив, она повышена по сравнению с МСК пациентов без ИБС. В то же время, МСК больных ИБС, экспрессируют и секретируют значительно больше ингибиторов ангиогенеза, в частности, ингибитора активаторов плазминогена - PAI-1. Подавление его активности антителами позволило частично восстановить ангиогенную активность продуктов секреции МСК ЖТ больных ИБС и СД2. Таким образом, нарушение баланса между активаторами и ингибиторами ангиогенеза может быть причиной снижения ангиогенных

свойства продуктов секреции МСК ЖТ больных ИБС, в том числе с сопутствующим сахарным диабетом 2 типа. Эти результаты важны не только для понимания механизмов нарушения регенеративных свойств прогениторных клеток при сочетанных патологиях, но и указывают на перспективы повышения этих свойств путем воздействия на эти механизмы в процессе предтрансплантационной подготовки клеток для их использования в клеточной терапии.

ВЫВОДЫ

1. Метаболические нарушения, характерные для диабета 2 типа, являются факторами, обуславливающими снижение ангиогенных и регенеративных свойств тканевых прогениторных клеток, так как моделирование гипергликемии *in vitro* изменяет экспрессию генов, регулирующих ангиогенез, в мезенхимных стволовых клетках жировой ткани, подавляет способность продуктов секреции этих клеток стимулировать ангиогенез в моделях *in vitro*, а культивирование этих клеток в присутствии окисленных ЛПНП снижает их жизнеспособность.

2. Ангиогенная активность суммарных продуктов секреции мезенхимных стволовых клеток жировой ткани снижена у пациентов с ИБС, в том числе с сопутствующим сахарным диабетом 2 типа, что обусловлено дисбалансом продукции ангиогенных и антиангиогенных факторов, прежде всего повышенной экспрессией и секрецией ингибиторов ангиогенеза - тромбоспондина-1 и ингибитора активаторов плазминогена 1 типа (PAI-1).

3. Метаболические нарушения, обусловленные сопутствующим сахарным диабетом 2 типа (гипергликемия и гиперлипидемия), отрицательно влияют на регенеративные свойства как циркулирующих, так и тканевых прогениторных клеток, способствуют дисбалансу циркулирующих факторов роста, эндотелина-1 и адипокинов, что может иметь патогенетическое значение в развитии осложнений ХСН и лежать в основе ее отягощенного течения при сочетании с сахарным диабетом. Характерные для данной категории пациентов нарушения свойств прогениторных клеток, дисбаланс ангиогенных факторов роста, эндотелина-1 и адипокинов могут служить мишенями для разработки новых методов лечения ХСН при ее сочетании с сахарным диабетом 2 типа.

4. Наличие сопутствующего сахарного диабета 2 типа у пациентов с ИБС и постинфарктной ХСН ассоциировано с более высоким функциональным классом ХСН по NYHA, сниженной толерантностью к физической нагрузке и

более выраженной диастолической дисфункцией ЛЖ, эндотелиальной дисфункцией и атеросклеротическим ремоделированием стенки сосудов (толщиной комплекса интима/медия), ожирением и гипергидратацией тканей по сравнению с пациентами с ИБС и ХСН без сопутствующего сахарного диабета, что указывает на большую тяжесть течения сердечной недостаточности и выраженность сосудистых нарушений при наличии сахарного диабета.

5. Больные ИБС с постинфарктной ХСН и сопутствующим сахарным диабетом 2 типа в сравнении с больными без сопутствующего диабета характеризуются более высоким уровнем эндотелина-1 в периферической крови, который прямо коррелирует с выраженностью диастолической дисфункции и ассоциируется с неблагоприятным сердечно-сосудистым прогнозом.

6. В ходе проспективного наблюдения установлено, что в периферической крови больных ИБС с постинфарктной ХСН повышено содержание ангиогенных факторов (VEGF, VEGFR1, HGF). Это не коррелирует с тяжестью ХСН, но ассоциируется с нарушением углеводного обмена и наличием сахарного диабета 2 типа. При этом высокий уровень циркулирующего HGF ассоциируется с неблагоприятным течением постинфарктной ХСН.

7. Снижение количества циркулирующих $CD34^{+}$ прогениторных клеток у пациентов с ишемической ХСН и сопутствующим сахарным диабетом не соотносится с тяжестью ХСН, но обратно коррелирует с выраженностью нарушений углеводного обмена (уровнем гипергликемии и гликированного гемоглобина).

8. В ходе проспективного наблюдения установлено, что наличие у пациентов с ХСН сопутствующего СД2 ассоциируется с плохим прогнозом: более высокой сердечно-сосудистой смертностью и большей частотой нефатальных осложнений. При этом развитие неблагоприятных сердечно-сосудистых событий в однофакторной модели логистической регрессии связано

с более высокими уровнями натрийуретических пептидов (NT-proBNP и MR-proANP), эндотелина-1, HGF, выраженностью диастолической дисфункции левого желудочка и снижением циркулирующих CD34⁺ прогениторных клеток. Наибольшее прогностическое значение для данной категории больных имеет многофакторная модель прогноза, включающая количество циркулирующих CD34⁺ прогениторных клеток и уровень эндотелина-1 ($\chi^2=19,9$; $p<0,001$).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При разработке протоколов аутологичной клеточной терапии на основе МСК-ЖТ у больных ИБС с ХСН необходимо учитывать сниженную способность этих клеток стимулировать ангиогенез за счет паракринных влияний, что диктует необходимость предтрансплантационной подготовки клеток, повышающей секрецию ими ангиогенных факторов (например, культивирование в условиях гипоксии перед трансплантацией).

2. Определение низкого уровня (<410 клеток/млн.лейкоцитов) циркулирующих $CD34^{+}$ прогениторных клеток может использоваться для стратификации риска сердечно-сосудистых осложнений у больных с постинфарктной ХСН и сопутствующим сахарным диабетом 2 типа. Для более точной стратификации риска у данной категории больных рекомендуется определение уровня эндотелина-1 и циркулирующих $CD34^{+}$ прогениторных клеток.

3. Поскольку количество $CD34^{+}$ прогениторных клеток в периферической крови снижено и ассоциируется с неблагоприятным прогнозом у больных ИБС с ХСН и сопутствующим сахарным диабетом данная категория больных может являться целевой для заместительной клеточной терапии биомедицинскими клеточными продуктами на основе $CD34^{+}$ прогениторных клеток, получаемых из костного мозга или периферической крови.

4. Поскольку уровень $CD34^{+}$ прогениторных клеток в циркуляции обратно коррелирует с выраженностью нарушений углеводного обмена и является независимым предиктором осложненного течения постинфарктной ХСН, при проведении гипогликемической терапии у больных ИБС с ХСН и выраженными нарушениями углеводного обмена было бы целесообразно контролировать уровень $CD34^{+}$ прогениторных клеток в циркуляции.

5. Разработанная и оптимизированная в ходе выполнения проспективного исследования электронная карта-история болезни может быть использована для проведения подобных исследований.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

МСК-ЖТ	мезенхимальные стромальные клетки жировой ткани	G-SCF	гранулоцитарный колониестимулирующий фактор
ЦПК	циркулирующие прогенитрные клетки	ICAM-1	межклеточная молекула адгезии-1 (intercellular adhesion molecule-1)
VEGF	фактор роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor)	IL-6,8	интерлейкин-6, 8 (interleukin-6, 8)
VEGFR1, 2	рецептор фактора роста эндотелия сосудов 1 и 2 типа	KDR/Flk-1	рецептор к фактору роста эндотелия сосудов 1 типа
HGF	фактор роста гепатоцитов (hepatocyte growth factor)	МАР-киназы	митоген-активируемые протеинкиназы (mitogen-activated proteinkinases)
HIF	индуцируемый при гипоксии фактор (hypoxia inducible factor)	MMP	матриксная металлопротеиназа (matrix metalloproteinase)
HUVEC	эндотелиальные клетки пупочной вены человека (human umbilical vein endothelial cells)	MR-proANP	срединный участок предшественника предсердного натрийуретического пептида (mid-region pro-ANP)
bFGF	основной фактор роста фибробластов (basic fibroblast growth factor)	NFκB	ядерный фактор κ-B (nuclear factor κ-B)

PAI-1 -	Plasminogen activator inhibitor -1	NO	оксид азота (nitric oxide)
C-РБ	C-реактивный белок	NT-proBNP	N-концевой фрагмент предшественника мозгового натрийуретического пептида
FITC	флуоресцеинизотиоцианат (fluorescein isothiocyanate)	PDGF	фактор роста, высвобождаемый тромбоцитами (platelet-derived growth factor)
SDF-1	фактор стромальных клеток (stromal-derived factor)	PDGFR	рецептор фактора роста, высвобождаемого тромбоцитами (platelet-derived growth factor β -receptor)
TGF- β	трансформирующий ростовой фактор (transforming growth factor β)	TIMP	тканевой ингибитор металлопротеиназы (tissue inhibitor of metalloproteinase)
TNF- α	фактор некроза опухолей альфа (tumor necrosis factor α)	uPA	урокиназный активатор плазминогена (urokinase)
tPA	тканевой активатор плазминогена (tissue plasminogen activator)	VCAM-1	молекула адгезии эндотелия-1 (vascular cellular adhesion molecule-1)
АКШ	аорто-коронарное шунтирование	АФР	ангиогенный фактор роста

АПФ	ангиотензин– превращающий фермент	ВКМ	внеклеточный матрикс
ИБС	ишемическая болезнь сердца	ИФА	иммуноферментный анализ
ИМ	инфаркт миокарда	ФВ ЛЖ	фракция выброса левого желудочка
ИМТ	индекс массы тела	ПЗВД	поток-зависимая вазодилатация
МСК	мезенхимальные стволовые клетки	ТКИМ	толщина комплекса интима-медиа
мРНК	матричная РНК	СД2	сахарный диабет 2 типа
ПНА	передняя нисходящая артерия	ССЗ	сердечно-сосудистые заболевания
ПЦР	полимеразная цепная реакция	ЭК	эндотелиальные клетки
ХСН	хроническая сердечная недостаточность	ЭДТА	этилендиаминтетрау ксусная кислота

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Агеев, Ф.Т. Роль эндотелиальной дисфункции в развитии и прогрессировании сердечно-сосудистых заболеваний / Ф.Т. Агеев // Сердечная недостаточность. – 2003. – № 1. – С. 22–23.
2. Агеева, В. Новые подходы к патогенетическому лечению метаболического сердечно-сосудистого синдрома. / В. Агеева, Т. Винник, Е. Красильникова, Е. Шляхто // Врач. – 2004. – N 3. – С.46–50.
3. Акопян, Ж.А. Влияние высокой концентрации глюкозы на способность мезенхимальных стромальных клеток контролировать рост кровеносных сосудов / Ж.А. Акопян, Г.В. Шаронов, Т.Н. Кочегура, Н.Ф. Ильяшенко, И.Э. Белянко [и др.] // Сахарный диабет. – 2011. – № 2. – С. 32–36.
4. Акопян, Ж.А. Системная трансплантация аутологичных мезенхимальных клеток костного мозга больным ишемической болезнью сердца, сочетающейся с сахарным диабетом: долгосрочное наблюдение и результаты повторного введения / Ж.А. Акопян, А.Ю. Ефименко, К.А. Рубина, Н.И. Калинина, Ю.Г. Суздальцева [и др.] // Стволовые клетки и регенеративная медицина: сб. науч. тр. – М. : МАКС Пресс Москва. – 2011. – С. 235–263.
5. Акопян, Ж.А. Хроническая гипергликемия и способность стромальных клеток жировой ткани воздействовать на рост кровеносных сосудов / Ж.А. Акопян, Т.Н. Кочегура, Г.В. Шаронов, Н.И. Калинина // Вестник РГМУ. – 2010. – № 2. – С. 449–450.
6. Балацкий, А.В. Однонуклеотидные замены в гене Т-кадгерина (cdh13) кумулятивно влияют на массу тела у лиц с ишемической болезнью сердца / А.В. Балацкий, Д.Ю. Коновалов, Л.М., Самоходская Т.Н. Кочегура, К.А. Рубина [и др.] // Кардиология. – 2015. – № 11. – С. 12–15.
7. Беленков, Ю.Н. Истинная распространенность ХСН в Европейской части Российской Федерации (исследование ЭПОХА, госпитальный этап)

/Ю.Н. Беленков, В.Ю. Мареев, Ф.Т. Агеев, И.В. Фомин, Ю.В. Бадин [и др.] // Сердечная недостаточность. – 2011. – № 12 (2). – С. 63–68.

8. Беленков, Ю.Н. Нарушение микроциркуляции у больных ишемической болезнью сердца и сахарным диабетом 2 типа / Ю.Н. Беленков, Е.В. Привалова, А.А. Щендрыгина, И.С. Чекнева, Т.В. Емельянова // Сеченовский вестник. – 2014. – № 18 (4). – С. 27.

9. Бондарь, И.А. Генетические основы сахарного диабета 2 типа / И.А. Бондарь, О.Ю. Шабельникова // Сахарный диабет. – 2013. – № 4. – С. 11–16.

10. Верткин, А.Л. Терапия коморбидного больного сахарным диабетом: фокус на гипогликемию / А.Л. Верткин, А.С. Скотников, А.Ю. Магомедова, О.В. Ястребова, С.С. Казарцева [и др.] // Лечащий Врач. – 2013. – № 3. – С. 7–10.

11. Дедов, И.И. Алгоритмы специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом / И.И. Дедов, М.В. Шестакова, Г.Р. Галстян, О.Р. Григорян, Р.М. Есаян [и др.] // Сахарный диабет. – 2015. – № 1S (18). – С. 4–72.

12. Демидова, Т.Ю. Влияние тиазолидиндионов на инсулинорезистентность и сердечно-сосудистые факторы риска при сахарном диабете 2 типа / Т.Ю. Демидова, Е.Н. Ерохина // Ожирение и метаболизм. – 2008. – № 2. – С. 2–5.

13. Демидова, Т.Ю. Новые возможности коррекции дисфункции эндотелия у больных инсулинорезистентным сахарным диабетом 2 типа. / Т.Ю. Демидова, О.И. Титова, А.С. Ахметов // Сахарный диабет. – 2006. – № 3. – С. 15–19.

14. Ефименко, А.Ю. Аутологичная клеточная терапия: влияние факторов риска на стволовые и прогениторные клетки / А.Ю. Ефименко, Т.Н. Кочегура, Н.А. Джояшвили, Ж.А. Акопян, Г.В. Шаронов [и др.] // Клеточные технологии – практическому здравоохранению: сб. науч. тр. – Екатеринбург : Астер. – 2014. – С. 17–22.

15. Ефименко, А.Ю. Влияние гипоксии и воспалительных факторов на жизнеспособность и ангиогенную активность мезенхимных стромальных клеток из жировой ткани и костного мозга / А.Ю. Ефименко, Е.Е. Старостина, К.А. Рубина, Н.И. Калинина, Е.В. Парфенова // Цитология. – 2010. – № 52. – С. 144–154.

16. Ефименко, А.Ю. Изменения ангиогенных свойств ММСК жировой ткани с возрастом у больных ишемической болезнью сердца / А.Ю. Ефименко, Н.А. Джояшвили, Н.И. Калинина, Т.Н. Кочегура, Р.С. Акчурин с // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2012. – № 4 (7). – С. 74–83.

17. Ефименко, А.Ю. Клинический опыт и перспективы применения аутологичных стволовых и прогениторных клеток для восстановления насосной функции сердца / А.Ю. Ефименко, Т.Н. Кочегура, Е.В. Парфенова, В.А. Ткачук // сб. науч. тр. – М. : Литтерра. – 2009. – С. 292–319.

18. Ефименко, А.Ю. Системная трансплантация аутологичных мезенхимальных клеток костного мозга больным ишемической болезнью сердца: долгосрочное наблюдение и результаты повторного введения / А.Ю. Ефименко, Ж.А. Акопян, К.А. Рубина, Н.И. Калинина, Ю.Г. Суздальцева [и др.] // Стволовые клетки и регенеративная медицина: сб. науч. тр. – М. : МАКС Пресс Москва. – 2011. – С. 206–234.

19. Ефименко, А.Ю. Способ оценки ангиогенного потенциала прогениторных клеток у больных сердечно-сосудистыми заболеваниями / А.Ю. Ефименко, Н.А. Джояшвили, Е.Е. Старостина, Т.Н. Кочегура, Ж.А. Акопян [и др.] // патент RUS 2548801 от 20.04.2015; Бюл. № 11. – С. 13.

20. Калинина, Н.И. Влияние гипергликемии на функциональное состояние клеток эндотелия вены пуповины человека *in vitro* / Н.И. Калинина, Ж.А. Акопян, Е.А. Пахомова, М.В. Шестакова, Е.В. Парфёнова // Доклады Российской Академии наук. – 2009. – № 4 (426). – С. 210–212.

21. Калюжин, В.В. Патогенез хронической сердечной недостаточности: изменение доминирующей парадигмы / В.В. Калюжин, А.Т. Тепляков, Ю.Ю.

Вечерский, Н.В. Рязанцева, А.П. Хлапов // Бюллетень сибирской медицины. – 2007. – № 4 (6) – С. 71–79.

22. Кочегура, Т.Н. Влияние липопротеидов низкой плотности на мезенхимальные стромальные клетки жировой ткани / Т.Н. Кочегура, Г.В. Шаронов, В.Ю. Сысоева, А.С. Оленев, Е.В. Парфенова [и др.] // Доклады Академии Наук. – 2011. – № 5 (441). – С. 714–717.

23. Кочегура, Т.Н. Влияние сопутствующего сахарного диабета 2 типа на количество циркулирующих прогениторных клеток у больных с ишемической кардиомиопатией // Сахарный диабет. – 2011. – № 3. – С. 36–43.

24. Кочегура, Т.Н. Изменяются ли аутологичные стволовые и прогениторные клетки с возрастом и при развитии хронических патологий у человека? / Т.Н. Кочегура, А.Ю. Ефименко, Н.А. Джояшвили, Ж.А. Акопян, Г.В. Шаронов [и др.] / Стволовые клетки и регенеративная медицина: сб. науч. тр. – М.: Изд-во. Московского университета. – 2014. – С. 117–139.

25. Кочегура, Т.Н. Клеточная терапия сердечной недостаточности: клинический опыт, проблемы и перспективы / Т.Н. Кочегура, А.Ю. Ефименко, Ж.А. Акопян, Е.В. Парфенова // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2010. – № 2 (5). – С. 11–18.

26. Кочегура, Т.Н. Прогностическое значение циркулирующих предшественников эндотелиальных клеток и молекулярных факторов у больных ишемической ХСН / Т.Н. Кочегура, П.И. Макаревич, А.Ю. Ефименко [и др.] // Гены и клетки. – 2017. – Т. XII. – №3. – С. 133.

27. Кочегура, Т.Н. Циркулирующие ангиогенные факторы, ассоциированные с постинфарктной сердечной недостаточностью и метаболическими нарушениями / Т.Н. Кочегура, П.И. Макаревич, А.Г. Овчинников, Л.В. Жигунова, Е.Л. Лахова [и др.] // Стволовые клетки и регенеративная медицина. V Всероссийская научно-практическая конференция: сб. науч. тр. – М. – 2013. – С. 37.

28. Кочегура, Т.Н. Циркулирующие факторы, ассоциированные с метаболическими нарушениями у пациентов с постинфарктной сердечной недостаточностью / Т.Н. Кочегура, П.И. Макаревич, А.Г. Овчинников, Л.В. Жигунова, Е.Л. Лахова [и др.] // Сердечная недостаточность. – 2013. – № 4 (78). – С. 191–199.

29. Кочегура, Т.Н. Циркулирующий фактор роста гепатоцитов (HGF) у больных с хронической сердечной недостаточностью, сочетающейся с сахарным диабетом 2 типа и нарушением жирового обмена / Т.Н. Кочегура, П.И. Макаревич, А.Г. Овчинников, Л.В. Жигунова, Е.Л. Лахова [и др.] // Сахарный диабет. – 2013. – № 2. – С. 17–25.

30. Кулебякин, К.Ю. Механизмы транскрипционного контроля регуляции глюкозы в печени / К.Ю. Кулебякин, Ж.А. Акопян, Т.Н. Кочегура Д.Н. Пеньков // Сахарный диабет. – 2016. – № 3 (19). – С. 190–198.

31. Ланкин, В.З. Влияние глюкозы на свободнорадикальное окисление липопротеинов низкой плотности *in vitro* и *in vivo* / В.З. Ланкин, Г.Г. Коновалова, А.К. Тихазе, Л.В. Недосугова // Биомедицинская химия. – 2012. – № 3 (58). – С. 339–352.

32. Мареев, В.Ю. Больные с хронической сердечной недостаточностью в российской амбулаторной практике: особенности контингента, диагностики и лечения (по материалам исследования ЭПОХА-О-ХСН) / В.Ю. Мареев, Ю.Н. Беленков, Ф.Т. Агеев, М.О. Даниелян // Сердечная Недостаточность. – 2004. – № 1. – С. 4–7.

33. Мареев, В.Ю. Национальные рекомендации ВНОК и ОССН по диагностике и лечению ХСН (третий пересмотр) / В.Ю. Мареев, Ф.Т. Агеев, Г.П. Арутюнов, А.В. Коротеев, А.Ш. Ревитшвили, Ю.Н. Беленков [и др.] // Сердечная недостаточность. – 2010. - 11. – № 1 (11). – С. 3-62.

34. Мареев, В.Ю. Сравнительная характеристика больных с ХСН в зависимости от величины ФВ по результатам Российского многоцентрового

исследования / В.Ю. Мареев, М.О. Даниелян, Ю.Н. Беленков // Сердечная Недостаточность. – 2006. – № 4 (38). – С. 164–171.

35. Овчинников, А.Г. Роль нарушения баланса коллагена в формировании и прогрессировании диастолической дисфункции левого желудочка и оптимизация лечения больных с диастолическими нарушениями с учётом их тяжести и выраженности клинических проявлений: автореф. дис. ...докт. мед. наук: 14.01.05. / Овчинников Артем Германович. – М., 2012. – 54 с.

36. Парфенова, Е.В. Поиск новых "инструментов" для терапевтического ангиогенеза. / Е.В. Парфенова, В.А. Такчук, Н.И. Калинина, Д.О. Трактуев, Е.И. Ратнер [и др.] // Молекулярная медицина. – 2006. – № 2. С. 10–23.

37. Парфенова, Е.В. Способ прогнозирования риска сердечно-сосудистой летальности у больных с хронической сердечной недостаточностью ишемической этиологии, сочетающейся с сахарным диабетом 2 типа / Е.В. Парфенова, Т.Н. Кочегура, Г.В. Шаронов, Л.В. Жигунова, А.Г. Овчинников [и др.] // патент RUS 2531947 от 27.10.2014; Бюл. № 30. – С. 14.

38. Парфенова, Е.В. Стромальные клетки жировой ткани – мультипотентные клетки с терапевтическим потенциалом для стимуляции ангиогенеза при ишемии тканей / Е.В. Парфенова, В.А. Ткачук, Д.О. Трактуев, К.Л. Марч // Кардиология. – 2006. – № 6. – С. 53–63.

39. Парфенова, Е.В. Терапевтический ангиогенез: достижения, проблемы, перспективы / Е.В. Парфенова, В.А. Ткачук / Кардиологический вестник. – 2007. – № 2. – С. 5–15.

40. Пеньков, Д.Н. Транскрипционный контроль экспрессии инсулинчувствительного переносчика глюкозы *glut4* в клетках жировой ткани / Д.Н. Пеньков, Ж.А. Акопян, Т.Н. Кочегура А.Д. Егоров // Доклады Академии наук. – 2016. – № 5 (467). – С. 612–616.

41. Рубина, К.А. Механизм стимуляции ангиогенеза в ишемизированном миокарде с помощью стромальных клеток жировой ткани /

К.А. Рубина, Н.И. Калинина, А.Ю. Ефименко, Т.В. Лопатина, В.С. Мелихова [и др.] // Кардиология. – 2010. – № 2 (50). – С. 51–61.

42. Соколова, А.В. Изучение количества циркулирующих прогениторных клеток эндотелия у больных сахарным диабетом 1 типа / А.В. Соколова, Т.Н. Кочегура, Е.В. Парфёнова М.В. Шестакова // Сахарный диабет. – 2015. – № 3. – С. 5–10.

43. Степанова, А.В. Изменение адипогенного потенциала мезенхимных стромальных клеток жировой ткани человека при инсулинорезистентности / А.В. Степанова, Т.Н. Кочегура, А.Ю. Ефименко [и др.] // Гены и клетки. – 2017. – № 3 (XII). – С. 140–141.

44. Ткачук, В.А. Косметическое средство на основе продуктов секреции мезенхимных стволовых/стромальных клеток жировой ткани человека и способ его получения / В.А. Ткачук, Ж.А. Акопян, А.Ю. Ефименко, О.А. Григорьева, Н.И. Калинина [и др.] // патент RUS 2620342 от 24.05.2017; Бюл. № 15. – С. 4.

45. Ткачук, В.А. Молекулярные механизмы развития резистентности к инсулину / В.А. Ткачук, А.В. Воротников // Сахарный диабет. – 2014. – № 2. – С. 29–40.

46. Ткачук, В.А. Способ получения средства для стимуляции регенерации на основе продуктов секреции мультипотентных мезенхимных стромальных клеток человека / В.А. Ткачук, Ж.А. Акопян, А.Ю. Ефименко, О.А. Григорьева, Н.И. Калинина [и др.] // патент RUS 2620167 от 23.05.2017; Бюл. № 15. – С. 2.

47. Ткачук, В.А. Средство для лечения ожогов и ран на основе цитокинов и факторов роста, секретируемых мезенхимными клетками человека, способ получения средства и способ лечения ожогов и ран / В.А. Ткачук, Ж.А. Акопян, А.Ю. Ефименко, Т.Н. Кочегура, К.А. Рубина [и др.] // патент RUS 2574017 от 27.01.2016; Бюл.3. – С. 30.

48. Фомин, И.В. Сахарный диабет как этиологическая причина ХСН в Европейской части Российской Федерации (Исследование ЭПОХА–ХСН, госпитальный этап) / И.В. Фомин, В.Ю. Мареев, Ф.Т. Агеев, Ю.В. Бадин, Д.С. Поляков [и др.] // Журнал Сердечная Недостаточность. – 2012. – № 1 (13). – С. 3–8.

49. Фомин, И.В. Хроническая сердечная недостаточность в Российской Федерации: что сегодня мы знаем и должны делать / И.В. Фомин // Российский кардиологический журнал. – 2016. – № 8 (136). – С. 7–13.

50. Шевченко, Е.К. Эффективная трансдукция стромальных клеток жировой ткани человека с помощью рекомбинантного аденоассоциированного вируса / Е.К. Шевченко, П.И. Макаревич, З.И. Цоколаева, Е.И. Ратнер, Е.В. Парфенова // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2010. – № 1. – С. 60–64.

51. Abdalla, M.C. Association of serum Leptin and Adiponectin with Atherosclerosis in obese and non-obese Type 2 Diabetes Mellitus patients / M.C. Abdalla, H. M. Sharada, A. I. Amin [et al.] // Journal of American Science. – 2010. – № 6 (5). – P. 153–164.

52. Abel, E.D. Cardiac remodeling in obesity / E.D. Abel, S.E. Litwin, G. Sweeney // Physiol Rev. – 2008. – № 88. – P. 389–419.

53. Agnoletti, L. Serum from patients with severe heart failure downregulates eNOS and is proapoptotic: role of tumor necrosis factor-alpha/ L. Agnoletti, S. Curello, T. Bachetti, F. Malacarne, G. Gaia [et al.]. // Circulation. – 1999. – № 100 (19). – P. 1983–1991.

54. Ahmed, F.W. Metformin improves circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells in type 1 diabetes: MERIT study/ F.W. Ahmed, R. Rider, M. Glanville, K. Narayanan, S. Razvi [et al.] // Cardiovasc Diabetol. – 2016. – №1 (15). – P. 116.

55. Ahmed, FW. Circulating endothelial progenitor cells and angiogenic factors in diabetes complicated diabetic foot and without foot complications / A.

Kulwas, E. Drela, W. Jundziłł, B. Góralczyk, B. Ruszkowska-Ciastek [et al.] // Cardiovasc Diabetol. – 2015. – № 5 (29). – P. 686–690.

56. Ahn, C.H. Hemoglobin Glycation Index Is Associated With Cardiovascular Diseases in People With Impaired Glucose Metabolism / C.H. Ahn, S.H. Min, D.H. Lee, T.J. Oh, K.M. Kim [et al.] // J Clin Endocrinol Metab. – 2017. – № 8 (102). – P. 2905–2913.

57. Akyurekli, C. A systematic review of preclinical studies on the therapeutic potential of mesenchymal stromal cell-derived microvesicles / C. Akyurekli, Y. Le, R.B. Richardson, D. Fergusson, J.A.D. Tay // Stem Cell Rev. – 2015. – № 1 (11). – P. 150–160.

58. Alba, A.C. Changes in circulating progenitor cells are associated with outcome in heart failure patients: a longitudinal study/ A.C. Alba, S.D. Lalonde, V. Rao, S.D. Walter, G.H. Guyatt [et al.] // Can J Cardiol. – 2013. – № 12 (29). – P. 1657–1164.

59. Allison, M.A. Relation of leptin to left ventricular hypertrophy (from the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis) / M.A. Allison, D.A. Bluemke, R. McClelland, M. Cushman, M.H. Criqui [et al.] // Am J Cardiol. – 2013. № 112. – P. 726–730.

60. Anderson, E.M. Local delivery of VEGF and SDF enhances endothelial progenitor cell recruitment and resultant recovery from ischemia / E.M. Anderson, B.J. Kwee, S.A. Lewin, T. Raimondo, M. Mehta [et al.] // Tissue Eng Part A. – 2015. – № 7–8 (21). – P. 1217–27.

61. Andreas, M. N-terminal-pro-brain natriuretic peptide is decreased in insulin dependent gestational diabetes mellitus: a prospective cohort trial / M. Andreas, H. Zeisler, A. Handisurya, M.B. Franz, M. Gottsauner-Wolf [et al.] // Cardiovasc Diabetol. – 2011. (10). – P. 28.

62. Angeli, F. Hyperglycemia in acute coronary syndromes: from mechanisms to prognostic implications / F. Angeli, G. Reboldi, C. Poltronieri, L.

Lazzari, M. Sordi [et al.] // *Ther Adv Cardiovasc Dis.* – 2015. – № 6 (9). – P. 412–424.

63. Arita, Y. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity / Y. Arita, S. Kihara N. Ouchi, M. Takahashi, K. Maeda [et al.] // *Biochem Biophys Res Commun.* – 1999. – № 257 (1). – P. 79–83.

64. Asahara, T. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization / T. Asahara, H. Masuda, T. Takahashi, C. Kalka, C. Pastore [et al.] // *Circ Res.* – 1999. – № 85 (3). – P. 221–228.

65. Asahara, T. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis / T. Asahara, T. Murohara, A. Sullivan, M. Silver, R. van der Zee [et al.] // *Science.* – 1997. – № 275 (5302). – P. 964–967.

66. Aversa, M. Comparative safety and tolerability of endothelin receptor antagonists in pulmonary arterial hypertension / M. Aversa, S. Porter, J. Granton // *Drug Saf.* – 2015. – № 38 (5). – P. 419–435.

67. Awgulewitsch, C.P. The Vascular Wall: a Plastic Hub of Activity in Cardiovascular Homeostasis and Disease. / C.P. Awgulewitsch, L.T. Trinh, A.K. Hatzopoulos // *Curr Cardiol Rep.* – 2017. – № 19 (6). – P. 51.

68. Bahtiyar, G. Heart Failure: a Major Cardiovascular Complication of Diabetes Mellitus / G. Bahtiyar, D. Guterman, H. Lebovitz // *Curr Diab Rep.* – 2016. – № 16 (11). – P. 116.

69. Balaji, S. The Role of Endothelial Progenitor Cells in Postnatal Vasculogenesis: Implications for Therapeutic Neovascularization and Wound Healing / S. Balaji, A. King, T.M. Crombleholme, S.G. Keswani // *Adv Wound Care (New Rochelle).* – 2013. – № 2 (6). – P. 283–295.

70. Bando, Y.K. Diabetes-related heart failure / Y.K. Bando, T. Murohara // *Circ J.* – 2014. – № 78 (3). – P. 576–583.

71. Barton, M. Endothelin: 20 years from discovery to therapy / M. Barton, M. Yanagisawa // *Can J Physiol Pharmacol.* – 2008. – № 86 (8). – P. 485–498.

72. Baxter, M.A. Study of telomere length reveals rapid aging of human marrow stromal cells following in vitro expansion / M.A. Baxter, R.F. Wynn, S.N. Jowitt, J.E. Wraith, L.J. Fairbairn [et al.] // *Stem Cells*. – 2004. – № 22 (5). – P. 675–682.
73. Beltowski, J. Leptin decreases plasma paraoxonase 1 (PON1) activity and induces oxidative stress: the possible novel mechanism for proatherogenic effect of chronic hyperleptinemia / J. Beltowski, G. Wójcicka, A. Jamroz // *Atherosclerosis*. – 2003. – № 170 (1). – P. 21–29.
74. Berezin, A.E. Circulating endothelial progenitor cells as markers for severity of ischemic chronic heart failure / A.E. Berezin, A.A. Kremzer // *J Card Fail*. – 2014. – № 20 (6). – P. 438–447.
75. Berezin, A.E. Predictive Value of Circulating Vascular Endothelial Growth Factor-1 Level Measured Repeatedly During Long-Term Follow-Up in Patients with Arterial Hypertension after Acute Ischemic Stroke / A.E. Berezin, O.A. Lisovaya // *Angiol*. – 2014. – № 2 (1). – P. 119.
76. Berk, P.D. Uptake of long chain free fatty acids is selectively up-regulated in adipocytes of Zucker rats with genetic obesity and non-insulin-dependent diabetes mellitus / P.D. Berk, S.L. Zhou, C.L. Kiang, D. Stump, M. Bradbury // *J Biol Chem*. – 1997. – № 272 (13). – P. 8830–8835.
77. Bernal-Mizrachi, L. High levels of circulating endothelial microparticles in patients with acute coronary syndromes / L. Bernal-Mizrachi, W. Jy, J.J. Jimenez, J. Pastor, L.M. Mauro [et al.] // *Am Heart J*. – 2003. – № 145 (6). – P. 962–970.
78. Berry, C. The survival of patients with heart failure with preserved or reduced left ventricular ejection fraction: an individual patient data meta-analysis (Meta-analysis Global Group in Chronic Heart Failure (MAGGIC) / C. Berry, R.N. Doughty, C. Granger, L. Køber, B. Massie, F. McAlister, J. McMurray, S. Pocock [et al.] // *Eur Heart J*. – 2012. – № 33 (14). – P. 1750–1757.
79. Bielinski, S.J. Hepatocyte growth factor demonstrates racial heterogeneity as a biomarker for coronary heart disease / S.J. Bielinski, C. Berardi,

P.A. Decker, N.B. Larson, E.J. Bell [et al.] // *Heart*. – 2017. – № 103 (15). – P. 1185–1193.

80. Boden, G. Recent findings concerning thiazolidinediones in the treatment of diabetes / G. Boden, M. Zhang // *Expert Opin Investig Drugs*. – 2006. №15 (3). – P. 243–250.

81. Booth, A. Adipose tissue: an endocrine organ playing a role in metabolic regulation / A. Booth, A. Magnuson, J. Fouts, M.T. Foster // *Horm Mol Biol Clin Investig*. – 2016. – 26 (1). – P. 25–42.

82. Boucek, R.J.Jr. Ex vivo paracrine properties of cardiac tissue: Effects of chronic heart failure / R.J.Jr. Boucek, J. Steele, J.P. Jacobs, P. Steele, A. Asante-Korang [et al.] // *J Heart Lung Transplant*. – 2015. – № 34 (6). – P. 839–848.

83. Bura, A. Phase I trial: the use of autologous cultured adipose-derived stroma/stem cells to treat patients with non-revascularizable critical limb ischemia / A. Bura, V. Planat-Benard, P. Bourin, J.S. Silvestre, F. Gross [et al.] // *Cytherapy*. – 2014. – № 16 (2). – P. 245–257.

84. Cai, L. IFATS collection: human adipose tissue-derived stem cells induce angiogenesis and nerve sprouting following myocardial infarction, in conjunction with potent preservation of cardiac function / Cai L., B.H. Johnstone, T.G. Cook, J. Tan, M.C. Fishbein [et al.] // *Stem Cells*. – 2009. – № 27 (1). – P. 230–237.

85. Campfield, L.A. OB protein (leptin) pathway--a link between adipose tissue mass and central neural networks / L.A. Campfield, F.J. Smith, P. Burn // *Horm Metab Res*. – 1996. – № 28 (12). – P. 619–632.

86. Carrasco-Sanchez, F.J. Association between type-2 diabetes mellitus and post-discharge outcomes in heart failure patients: findings from the RICA registry / F.J. Carrasco-Sánchez, R. Gomez-Huelgas, F. Formiga, A. Conde-Martel, J.C. Trullàs [et al.] // *Diabetes Res Clin Pract*. – 2014. – №104 (3). – P. 410–419.

87. Cassidy, A. Potential role for plasma placental growth factor in predicting coronary heart disease risk in women / A. Cassidy, S.E. Chiuve, J.E.

Manson, K.M. Rexrode, C.J. Girman, E.B. Rimm // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2009. – № 29 (1). – P. 134–139.

88. Casto, R.M. Effects of central leptin administration on blood pressure in normotensive rats / R.M. Casto, J.M. VanNess, J.M. Overton // *Neurosci Lett.* – 1998. – № 246 (1). – P. 29–32.

89. Celermajer, D.S. Endothelium-dependent dilation in the systemic arteries of asymptomatic subjects relates to coronary risk factors and their interaction / D.S. Celermajer, K.E. Sorensen, C. Bull, J. Robinson, J.E. Deanfield // *J Am Coll Cardiol.* – 1994. – № 24 (6). – P. 1468–1474.

90. Chavakis, E. Role of beta2-integrins for homing and neovascularization capacity of endothelial progenitor cells / E. Chavakis, A. Aicher, C. Heeschen, K. Sasaki, R. Kaiser [et al.] // *J Exp Med.* – 2005. – № 201 (1). – P. 63–72.

91. Chavarria-Avila, E. The Impact of LEP G-2548A and LEPR Gln223Arg Polymorphisms on Adiposity, Leptin, and Leptin-Receptor Serum Levels in a Mexican Mestizo Population / E. Chavarria-Avila, M. Vázquez-Del Mercado, E. Gomez-Bañuelos, S.L. Ruiz-Quezada, J. Castro-Albarran [et al.] // *Biomed Res Int.* – 2015. – № 2015. – P. 1–10.

92. Chazova, I.E. Pulmonary hypertension in Russia: the first results of the national register / I.E. Chazova, O.A. Arkhipova, Z.S. Valieva, S.N. Nakonechnikov, T.V. Martyniuk // *Ter Arkh.* – 2014. – № 86 (9). – P. 56–64.

93. Chen, C.L. Glycated hemoglobin level is an independent predictor of major adverse cardiac events after nonfatal acute myocardial infarction in nondiabetic patients: A retrospective observational study / C.L. Chen, D.H. Yen, C.S. Lin, S.H. Tsai, S.J. Chen [et al.] // *Medicine.* – 2017. – № 96 (18). – P. e6743.

94. Chen, M. High Glucose-Induced PC12 Cell Death by Increasing Glutamate Production and Decreasing Methyl Group Metabolism / M. Chen, H. Zheng, T. Wei, D. Wang, H. Xia // *Biomed Res Int.* – 2016. – № 2016. – P. 1-9.

95. Chen, Q.H. Interaction between mesenchymal stem cells and endothelial cells restores endothelial permeability via paracrine hepatocyte growth factor in vitro

/ Q.H. Chen, A.R. Liu, H.B. Qiu, Y. Yang // Stem Cell Res Ther. – 2015. – № 6. – P. 44.

96. Chen, Y. Circulating CD133+ CD34+ progenitor cells and plasma stromal-derived factor-1alpha: predictive role in ischemic stroke patients / Y. Chen, B. Lu, J. Wang, S. Chen, Z. Lin, X. Ma [et al.] // J Stroke Cerebrovasc Dis. – 2015. – № 24 (2). – P. 319–326.

97. Cheng, J.W. Bosentan / J.W. Cheng // Heart Dis. 2003. – № 5 (2). – P. 161–169.

98. Cheng, K.H. Adipocytokines and proinflammatory mediators from abdominal and epicardial adipose tissue in patients with coronary artery disease / K.H. Cheng, C.S. Chu, K.T. Lee, T.H. Lin, C.C. Hsieh, C.C. Chiu [et al.] // Int J Obes. – 2008. – № 32 (2). – P. 268–274.

99. Cheng, P.C. Relationship between hemoglobin glycation index and extent of coronary heart disease in individuals with type 2 diabetes mellitus: a cross-sectional study / P.C. Cheng, S.R. Hsu, Y.C. Cheng, Y.H. Liu // Peer J. – 2017. – № 5. – P. e3875.

100. Cheng, Y. Effect of oxidized low-density lipoprotein on the expression of the prorenin receptor in human aortic smooth muscle cells / Y. Cheng, X. Liu, L. Zhang, Y. Zhang, Y. Liu, Lu, Y. Jiang // Mol Med Rep. 2015. – № 11 (6). – P. 4341–4344.

101. Chiang, C.H. Decreased circulating endothelial progenitor cell levels in patients with heart failure with preserved ejection fraction / C.H. Chiang, P.H. Huang, H.B. Leu, C.Y. Hsu, K.F. Wang, J.W. Chen, S.J. Lin // Cardiology. – 2013. – № 126 (3). – P. 191–201.

102. Chou, S.H. Mesenchymal stem cell insights: prospects in cardiovascular therapy / S.H. Chou, S.Z. Lin, W.W. Kuo, P. Pai, J.Y. Lin, C.H. Lai, C.H. Kuo, K.H. Lin [et al.] // Cell Transplant. – 2014. – № 23 (4-5). – P. 513–529.

103. Choy, J.C. Endothelial cell apoptosis: biochemical characteristics and potential implications for atherosclerosis / J.C. Choy, D.J. Granville, D.W. Hunt, B.M. McManus // *J Mol Cell Cardiol.* – 2001. № 33 (9). – P. 1673–1690.
104. Cleland, J.G. Clinical trials in patients with heart failure and preserved left ventricular ejection fraction / J.G. Cleland, P. Pellicori, R. Dierckx // *Heart Fail Clin.* – 2014. – № 10 (3). – P. 511–523.
105. Cleland, J.G. The EuroHeart Failure survey programme – a survey on the quality of care among patients with heart failure in Europe. Part 1: patient characteristics and diagnosis / J.G. Cleland, K. Swedberg, F. Follath, M. Komajda, A. Cohen-Solal, J.C. Aguilar, R. Dietz, A. Gavazzi // *Eur Heart J.* – 2003. – № 24 (5). – P. 442–463.
106. Clerico, A. Circulating forms of the b-type natriuretic peptide prohormone: pathophysiologic and clinical considerations / A. Clerico, S. Vittorini, C. Passino // *Adv Clin Chem.* – 2012. – № 58. – P. 31–44.
107. Conboy, I.M. Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment / I.M. Conboy, M.J. Conboy, A.J. Wagers, E.R. Girma, I.L. Weissman, T.A. Rando // *Nature.* – 2005. – № 433 (7027). – P. 760–764.
108. Correia, M.L. Role of leptin in the cardiovascular and endocrine complications of metabolic syndrome / M.L. Correia, K. Rahmouni // *Diabetes Obes Metab.* – 2006. – № 8 (6). – P. 603–610.
109. Crestani, B. Hepatocyte growth factor and lung fibrosis / B. Crestani, S. Marchand-Adam, C. Quesnel, L. Plantier, K. Borensztajn, J. Marchal [et al.] // *Proc Am Thorac Soc.* – 2012. № 9 (3). – P. 158–163.
110. Cubbon, R.M. Diabetes mellitus is associated with adverse prognosis in chronic heart failure of ischaemic and non-ischaemic aetiology / R.M. Cubbon, B. Adams, A. Rajwani, B.N. Mercer, P.A. Patel, G. Gherardi, C.P. Gale, P.D. Batin [et al.] // *Diab Vasc Dis Res* – 2013. – № 10 (4). – P. 330–336.
111. Dallmeier, D. Serial measurements of N-terminal pro-brain natriuretic peptide in patients with coronary heart disease / D. Dallmeier, M.J. Pencina, I.

Rajman, W. Koenig, D. Rothenbacher, H. Brenner // PLoS One. – 2015. – № 10 (1). – P. e0117143.

112. Danaei, G. National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2.7 million participants / Danaei G., Finucane M.M., Lu Y., Singh G.M., Cowan M.J., Paciorek C.J., Lin J.K., Farzadfar F. // Lancet. – 2011. – № 378 (9785). – P. 31–40.

113. Dasgupta, J. Reactive oxygen species control senescence-associated matrix metalloproteinase-1 through c-Jun-N-terminal kinase / J. Dasgupta, S. Kar, R. Liu, J. Joseph, B. Kalyanaraman, S.J. Remington, C. Chen, J.A. Melendez // J Cell Physiol. – 2010. – № 225 (1). – P. 52–62.

114. Dauriz, M. Association Between Diabetes and 1-Year Adverse Clinical Outcomes in a Multinational Cohort of Ambulatory Patients With Chronic Heart Failure: Results From the ESC-HFA Heart Failure Long-Term Registry / M. Dauriz, G. Targher, C. Laroche, P.L. Temporelli, R. Ferrari, S. Anker, A. Coats, G. Filippatos [et al.] // Diabetes Care. – 2017. – № 40 (5). – P. 671–678.

115. Dauriz, M. Prognostic Impact of Diabetes on Long-term Survival Outcomes in Patients With Heart Failure: A Meta-analysis / M. Dauriz, A. Mantovani, S. Bonapace, G. Verlato, G. Zoppini, E. Bonora, G. Targher // Diabetes Care. – 2017. № 40 (11). P. 1597–1605.

116. Day, R.M. Hepatocyte growth factor regulates angiotensin converting enzyme expression / // J Biol Chem. 2004. № 10 (279). P. 8792–801.

117. Deanfield, J.E. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance / J.E. Deanfield, J.P. Halcox, T.J. Rabelink // Circulation. – 2007. – № 115 (10). – P. 1285–1295.

118. Dei Cas, A. Vildagliptin, but not glibenclamide, increases circulating endothelial progenitor cell number: a 12-month randomized controlled trial in patients with type 2 diabetes / A. Dei Cas, V. Spigoni, M. Cito, R. Aldigeri, V.

Ridolfi, E. Marchesi, M. Marina, E. Derlindati [et al.] // Cardiovasc Diabetol. – 2017. – № 16 (1). – P. 27.

119. Denzel, M.S. T-cadherin is critical for adiponectin-mediated cardioprotection in mice / M.S. Denzel, M.C. Scimia, P.M. Zumstein, K. Walsh, P. Ruiz-Lozano, B. Ranscht // J Clin Invest. – 2010. – № 120 (12). – P. 4342–4352.

120. Deursen, V.M. Co-morbidities in heart failure. / V.M. Deursen, K. Damman, P. van der Meer, P.J. Wijkstra, G.J. Luijckx [et al.] // Heart Fail Rev. – 2014. – № 19 (2). – P. 163–172.

121. Devaraj, S. Dysfunctional endothelial progenitor cells in metabolic syndrome / S. Devaraj, I. Jialal // Exp Diabetes Res. – 2012. – № 2012. – P. 5.

122. Dimmeler, S. Oxidized low-density lipoprotein induces apoptosis of human endothelial cells by activation of CPP32-like proteases A mechanistic clue to the "response to injury" hypothesis / S. Dimmeler, J. Haendeler, J. Galle, A.M. Zeiher // Circulation. – 1997. – № 95 (7). – P. 1760–1763.

123. Djousse, L. Association between adiponectin and heart failure risk in the physicians' health study / L. Djoussé, J.B. Wilk, N.Q. Hanson, R.J. Glynn, M.Y. Tsai, J.M. Gaziano // Obesity. – 2013. – № 21 (4). – P. 831–834.

124. Doehner, W. Insulin resistance in moderate chronic heart failure is related to hyperleptinaemia, but not to norepinephrine or TNF-alpha / W. Doehner, M. Rauchhaus, I.F. Godsland, K. Egerer, J. Niebauer, R. Sharma, M. Cicoira, V.G. Florea // Int J Cardiol. – 2002. – № 83 (1). – P. 73–81.

125. Doehner, W. Inverse relation of body weight and weight change with mortality and morbidity in patients with type 2 diabetes and cardiovascular co-morbidity: an analysis of the PROactive study population / W. Doehner, E. Erdmann, R. Cairns, A.L. Clark, J.A. Dormandy, E. Ferrannini, S.D. Anker // Int J Cardiol. – 2012. № 162 (1). – P. 20–26.

126. Doehner, W. Leptin, insulin sensitivity and growth hormone binding protein in chronic heart failure with and without cardiac cachexia / W. Doehner, C.D.

Pflaum, M. Rauchhaus, I.F. Godsland, K. Egerer, M. Cicoira, V.G. Florea, R. Sharma [et al.] // Eur J Endocrinol. – 2001. – № 145 (6). – P. 727–735.

127. Donato, A.J. Cellular and molecular biology of aging endothelial cells / A.J. Donato, R.G. Morgan, A.E. Walker, L.A. Lesniewski // J Mol Cell Cardiol. – 2015. – № 89 (Pt B). – P. 122–135.

128. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function / W. Droge // Physiol Rev. – 2002. – № 82 (1). – P. 47–95.

129. Durand, E. In vivo induction of endothelial apoptosis leads to vessel thrombosis and endothelial denudation: a clue to the understanding of the mechanisms of thrombotic plaque erosion / E. Durand, A. Scoazec, A. Lafont, J. Boddaert, A. Al Hajzen, F. Addad, M. Mirshahi, M. Desnos // Circulation. – 2004. – № 109 (21). – P. 2503–2506.

130. Dzhoyashvili, N.A. Disturbed angiogenic activity of adipose-derived stromal cells obtained from patients with coronary artery disease and diabetes mellitus type 2/ N.A. Dzhoyashvili, Efimenko A.Y., T.N. Kochegura, N.I. Kalinina, N.V. Koptelova, O.Y. Sukhareva, M.V. Shestakova, R.S. Akchurin [et al] // J Transl Med. – 2014. – № 12 – P. 337–349.

131. Ebner, P. Accumulation of VEGFR-2+/CD133+ cells and decreased number and impaired functionality of CD34+/VEGFR-2+ cells in patients with SLE / P. Ebner, F. Picard, J. Richter, E. Darrelmann, M. Schneider, B.E. Strauer [et al] // Rheumatology. – 2010. – № 49 (1). – P. 63–72.

132. Eeg-Olofsson, K. Risk of cardiovascular disease and mortality in overweight and obese patients with type 2 diabetes: an observational study in 13,087 patients / K. Eeg-Olofsson, J. Cederholm, P.M. Nilsson, B. Zethelius, L. Nunez, S. Gudbjörnsdóttir, B. Eliasson // Diabetologia. – 2009. – № 52 (1). – P. 65–73.

133. Efimenko, A. Adipose-Derived Mesenchymal Stromal Cells From Aged Patients With Coronary Artery Disease Keep Mesenchymal Stromal Cell Properties but Exhibit Characteristics of Aging and Have Impaired Angiogenic Potential / A.

Efimenko, N. Dzhoyashvili, N. Kalinina, T. Kochegura, R. Akchurin [et al.] // *Stem Cells Translational Medicine*. – 2014. – № 1 (3). – P. 32–41.

134. Efimenko, A. Angiogenic properties of aged adipose derived mesenchymal stem cells after hypoxic conditioning / A. Efimenko, E. Starostina, N. Kalinina, A. Stolzing // *Translat. Med.* – 2011. – № 9. – P. 10.

135. Efimenko, A.Yu. Adipose-Derived Stromal Cell (ADSC) for Autologous Cell Therapy: Disturbed Angiogenic Activity in Patients With Coronary Artery Disease and Diabetes Mellitus Type 2/ A. Yu. Efimenko, Dzhoyashvili N.A., Kochegura T.N., Kalinina, N.I., Akchurin R.S., Parfyonova Ye. V. // *Molecular Therapy*. – 2014. – № 22 (S1). – P. 185 – 186.

136. Efimenko, A.Yu. Autologous Stem Cell Therapy: How Aging and Chronic Diseases Affect Stem and Progenitor Cells / A.Yu. Efimenko, T.N. Kochegura, Zh.A. Akopyan, Ye. V. Parfyonova // *Bioresearch open access*. – 2015. - №4 (1) – P. 26–38.

137. El-Ftesi, S. Aging and diabetes impair the neovascular potential of adipose-derived stromal cells / S. El-Ftesi, E.I. Chang, M.T. Longaker, G.C. Gurtner // *Plast Reconstr Surg*. – 2009. – № 123 (2). – P. 475–485.

138. Ellinor, P.T. Discordant atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide levels in lone atrial fibrillation / P.T. Ellinor, A.F. Low, K.K. Patton, M.A. Shea, C.A. Macrae // *Am. Coll. Cardiol.* – 2005. – № 45 (1). – P. 82–86.

139. Erqou, S. Association between glycated haemoglobin and the risk of congestive heart failure in diabetes mellitus: systematic review and meta-analysis / S. Erqou, C.T. Lee, M. Suffoletto, J.B. Echouffo-Tcheugui, R.A.de Boer, J.P. van Melle, A.I. Adler // *Eur J Heart Fail.* – 2013. – № 15 (2). – P. 185–193.

140. Ewart, M.A. Inhibition of tumor necrosis factor alpha-stimulated monocyte adhesion to human aortic endothelial cells by AMP-activated protein kinase / M.A. Ewart, C.F. Kohlhaas, I.P. Salt // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2008. – № 28 (12). – P. 2255–2257.

141. Færch, K. Cardiovascular risk stratification and management in pre-diabetes / K. Færch, D. Vistisen, N.B. Johansen, M.E. Jørgensen // *Curr Diab Rep.* – 2014. № 14 (6). – P. 493.
142. Fan, M. The effect of age on the efficacy of human mesenchymal stem cell transplantation after a myocardial infarction/ M. Fan, W. Chen, W. Liu, G.Q. Du, S.L. Jiang, W.C. Tian, L. Sun, R.K. Li [et al] // *Rejuvenation Res.* – 2010. – № 13 (4). – P. 429–438.
143. Fehrer, C. Mesenchymal stem cell aging / C. Fehrer, G. Lepperdinger // *Exp Gerontol.* – 2005. – № 40 (12). – P. 926–930.
144. Felmeden, D.C. Angiogenesis: basic pathophysiology and implications for disease / D.C. Felmeden, A.D. Blann, G.Y. Lip // *Eur Heart J.* – 2003. – № 24 (7). – P. 586–603.
145. Flaquer, M. Hepatocyte growth factor gene therapy enhances infiltration of macrophages and may induce kidney repair in db/db mice as a model of diabetes / M. Flaquer, M. Franquesa, A. Vidal, N. Bolaños, J. Torras, N. Lloberas, I. Herrero-Fresneda, J. Grinyó [et al] // *Diabetologia.* – 2012. – № 55 (7). – P. 2059–2068.
146. Flores, I. The role of telomeres and telomerase in stem cell aging / I. Flores, M.A. Blasco // *FEBS Lett.* – 2010. – № 584 (17). – P. 3826–3830.
147. Ford, E.S. Risk factors for mortality from all causes and from coronary heart disease among persons with diabetes. Findings from the National Health and Nutrition Examination Survey I Epidemiologic Follow-up Study / E.S. Ford, F. DeStefano // *Am J Epidemiol.* – 1991. – № 133 (12). – P. 1220–1230.
148. Forstermann, U. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace / U. Forstermann, T. Munzel // *Circulation.* – 2006. – № 113 (13). – P. 1708–1714.
149. Förstermann, U. Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions / U. Förstermann, E.I. Closs, J.S. Pollock, M. Nakane, P. Schwarz, I. Gath, H. Kleinert // *Hypertension.* – 1994. – № 23 (6 Pt 2) – P. 1121–1131.

150. Gahr, S. Hepatocyte growth factor stimulates proliferation of pancreatic beta-cells particularly in the presence of subphysiological glucose concentrations / S. Gahr, M. Merger, L.C. Bollheimer, C.G. Hammerschmied, J. Schölmerich, S.R. Hügl // *J Mol Endocrinol.* – 2002. – № 28 (2). – P. 99–110.
151. Gallo, S. Cellular and molecular mechanisms of HGF/Met in the cardiovascular system / S. Gallo, V. Sala, S. Gatti, T. Crepaldi // *Clin Sci.* – 2015. – № 129 (12). – P. 1173–1193.
152. Georgescu, A. Vascular dysfunction in diabetes: The endothelial progenitor cells as new therapeutic strategy / A. Georgescu // *World J Diabetes.* – 2011. – № 2 (6). – P. 92–97.
153. Germani, A. Regenerative therapy in peripheral artery disease / A. Germani, C. Di Campli, G. Pompilio, P. Biglioli, M.C. Capogrossi // *Cardiovasc Ther.* – 2009. – № 27 (4). – P. 289–304.
154. Ghantous, C.M. Differential Role of Leptin and Adiponectin in Cardiovascular System / C.M. Ghantous, Z. Azrak, S. Hanache, W. Abou-Kheir, A. Zeidan // *Int J Endocrinol.* – 2015. – № 2015. – P. 1–13.
155. Ghebre, Y.T. Vascular Aging: Implications for Cardiovascular Disease and Therapy / Y.T. Ghebre, E. Yakubov, W.T. Wong, P. Krishnamurthy, N. Sayed, A.G. Sikora [et al] // *Transl Med.* – 2016. – № 6 (4). – pii. 183.
156. Ghimire, K. Nitric oxide: what's new to NO? / K. Ghimire, H.M. Altmann, A.C. Straub, J.S. Isenberg // *Am J Physiol Cell Physiol.* – 2017. – № 312 (3). – P. 254–262.
157. Ghosh, A. Role of free fatty acids in endothelial dysfunction / A. Ghosh, L. Gao, A. Thakur, P.M. Siu, C.W.K. Lai // *J Biomed Sci.* – 2017. – № 24 (1). – P. 50.
158. Gimble, J.M. Adipose-derived stromal/stem cells: a primer / J.M. Gimble, B.A. Bunnell, T. Frazier, B. Rowan, F. Shah, C. Thomas-Porch, X. Wu // *Organogenesis.* – 2013. – № 9 (1). – P. 3–10.

159. Girolamo, L. Human adipose-derived stem cells isolated from young and elderly women: their differentiation potential and scaffold interaction during in vitro osteoblastic differentiation / L. Girolamo, S. Lopa, E. Arrigoni, M.F. Sartori, F.W. Baruffaldi Preis, A.T. Brini // *Cytotherapy*. – 2009. – № 11 (6). – P. 793–803.
160. Gjesdal, O. Cardiac remodeling at the population level – risk factors, screening, and outcomes / O. Gjesdal, D.A. J.A. Bluemke, Lima // *Nat Rev Cardiol*. – 2011. – № 8 (12). – P. 673–685.
161. Glogner, S. The association between BMI and hospitalization for heart failure in 83,021 persons with Type 2 diabetes: a population-based study from the Swedish National Diabetes Registry / S. Glogner, A. Rosengren, M. Olsson, S. Gudbjörnsdottir, A.M. Svensson, M. Lind // *Diabet Med*. – 2014. – № 31 (5). – P. 586–594.
162. Gomez-Mauricio, G. Combined administration of mesenchymal stem cells overexpressing IGF-1 and HGF enhances neovascularization but moderately improves cardiac regeneration in a porcine model / G. Gómez-Mauricio, I. Moscoso, M.F. Martín-Cancho, V. Crisóstomo, C. Prat-Vidal, C. Báez-Díaz, F.M. Sánchez-Margallo, A. Bernad // *Stem Cell Res Ther*. – 2016. – № 7 (1). – P. 94.
163. Gonzalez, S. The biological variation of N-terminal pro-brain natriuretic peptide in postmenopausal women with type 2 diabetes: a case control study / S. González, E.S. Kilpatrick, S.L. Atkin // *PLoS One*. – 2012. – № 7 (11). – P. e47191.
164. Gruden, G. Natriuretic peptides, heart, and adipose tissue: new findings and future developments for diabetes research / G. Gruden, A. Landi, G. Bruno // *Diabetes Care*. – 2014. – № 37 (11). – P. 2899–2908.
165. Han, K.H. Therapeutic Potential of Human Mesenchymal Stem Cells for Treating Ischemic Limb Diseases / K.H. Han, A.K. Kim, D.I. Kim // *Int J Stem Cells*. – 2016. – № 9 (2). – P. 163–168.
166. Hao, Y. Admission hyperglycemia and adverse outcomes in diabetic and non-diabetic patients with non-ST-elevation myocardial infarction undergoing

percutaneous coronary intervention / Y. Hao, Q. Lu, T. Li, G. Yang, P. Hu, A. Ma // BMC Cardiovasc Disord. – 2017. – № 17 (1). – P. 6.

167. Harris, L.J. Availability of adipose-derived stem cells in patients undergoing vascular surgical procedures / L.J. Harris, P. Zhang, H. Abdollahi, N.A. Tarola, C. DiMatteo, S.E. McIlhenny, T.N. Tulenko, P.J. DiMuzio // J Surg Res. – 2010. – № 163 (2). – P. 105–112.

168. Hata, N. Hepatocyte growth factor and cardiovascular thrombosis in patients admitted to the intensive care unit / N. Hata, A. Matsumori, S. Yokoyama, T. Ohba, T. Shinada, H. Yoshida, K. Tokuyama, T. Imaizumi // Circ J. – 2004. – № 68 (7). – P. 645–649.

169. Hayashi, K. In vivo transfer of human hepatocyte growth factor gene accelerates re-endothelialization and inhibits neointimal formation after balloon injury in rat model / K. Hayashi, S. Nakamura R. Morishita, A. Moriguchi, M. Aoki, K. Matsumoto, T. Nakamura, Y. Kaneda // Gene Ther. – 2000. – №7 (19). P. – 1664–1671.

170. Hayashi, Y. Hepatocyte growth factor and 24-hour ambulatory blood pressure monitoring / Y. Hayashi, S. Saitoh, S. Takagi, K. Tuchihashi, T. Miura, K. Shimamoto // Hypertens Res. – 2002. – № 25 (5). – P. 655–660.

171. Heeschen, C. Prognostic value of placental growth factor in patients with acute chest pain / C. Heeschen, S. Dimmeler, S. Fichtlscherer, C.W. Hamm, J. Berger, M.L. Simoons, A.M. Zeiher // JAMA. – 2004. – № 291 (4). – P. 435–441.

172. Hill, J.M. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk / J.M. Hill, G. Zalos, J.P. Halcox, W.H. Schenke, M.A. Waclawiw, A.A. Quyyumi, T. Finkel // N Engl J Med. – 2003. – № 348 (7). – P. 593–600.

173. Hirase, T. Endothelial dysfunction as a cellular mechanism for vascular failure / T. Hirase, K. Node // Am J Physiol Heart Circ Physiol. – 2012. – № 3 № 302 (3). – P. 499-505.

174. Hiratsuka, A. Strong association between serum hepatocyte growth factor and metabolic syndrome / A. Hiratsuka, H. Adachi, Y. Fujiura, S. Yamagishi, Y. Hirai, M. Enomoto, A. Satoh, A. Hino [et al.] // *J Clin Endocrinol Metab.* – 2005. – № 5 № 90 (5). – P. 2927–2931.
175. Hirschi, K.K. Assessing identity, phenotype, and fate of endothelial progenitor cells / K.K. Hirschi, D.A. Ingram, M.C. Yoder // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2008. – 28 (9). – P. 1584–1595.
176. Ho, J.E. Predictors of new-onset heart failure: differences in preserved versus reduced ejection fraction / J.E. Ho, A. Lyass, D.S. Lee, R.S. Vasan, W.B. Kannel, M.G. Larson, D. Levy // *Circ Heart Fail.* – 2013. – № 6 (2). – P. 279–286.
177. Højlund, K. Metabolism and insulin signaling in common metabolic disorders and inherited insulin resistance / K. Højlund // *Dan Med J.* – 2014. – № 61 (7). – P. B4890.
178. Hopper, I. Comorbidities in Heart Failure: Are There Gender Differences? / I. Hopper, D. Kotecha, K.L. Chin, R.J. Mentz, T.G. von Lueder // *Curr Heart Fail – Rep.* – 2016. – № 13 (1). – P. 1–12.
179. Hristov, M. Endothelial progenitor cells: mobilization, differentiation, and homing / M. Hristov, W. Erl, P.C. Weber // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2003. – № 23 (7). – P. 1185–1189.
180. Hsiao, L.C. Stem cell-based therapy for ischemic heart disease / L.C. Hsiao, C. Carr, K.C. Chang, S.Z. Lin, K. Clarke // *Cell Transplant.* – 2013. – № 22 (4). – P. 663–675.
181. Huang, S.C. Mechanical strain modulates age-related changes in the proliferation and differentiation of mouse adipose-derived stromal cells / S.C. Huang, T.C. Wu, H.C. Yu, M.R. Chen, C.M. Liu, W.S. Chiang, K.M. Lin // *BMC Cell Biol.* – 2010. – № 11. – P. 18.
182. Hur, J. Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovasculogenesis / J. Hur, C.H. Yoon, H.S. Kim, J.H.

Choi, H.J. Kang, K.K. Hwang, B.H. Oh, M.M. Lee [et al.] // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2004. – № 24 (2). – P. 288–293.

183. Iwami, Y. Endothelial progenitor cells: past, state of the art, and future / Y. Iwami, H. Masuda, T. Asahara // *J Cell Mol Med.* – 2004. – № 8 (4). – P. 488–497.

184. Jezierska-Wozniak, K. Stem cells as therapy for cardiac disease - a review / K. Jezierska-Woźniak, D. Mystkowska, A. Tutas, M.K. Jurkowski // *Folia Histochem Cytobiol.* – 2011. – № 49 (1). – P. 13–25.

185. Johansson, I. Prognostic Implications of Type 2 Diabetes Mellitus in Ischemic and Nonischemic Heart Failure / I. Johansson, U. Dahlström, Edner, P. Näsman, L. Rydén, A. Norhammar // *J Am Coll Cardiol.* – 2016. – № 68 (13). – P. 1404–1416.

186. Jorbenadze, R. Expression of platelet-bound stromal-cell derived factor-1 (SDF-1) and number of CD34(+) progenitor cells in patients with congestive heart failure / R. Jorbenadze, E. Schleicher, B. Bigalke, K. Stellos, M. Gawaz // *Platelets.* – 2014. – № 25 (6). – P. 409–415.

187. Kalogeropoulos, A. Glycemic status and incident heart failure in elderly without history of diabetes mellitus: the health, aging, and body composition study / A. Kalogeropoulos, V. Georgiopoulou, T.B. Harris, S.B. Kritchevsky, D.C. Bauer, A.L. Smith, E. Strotmeyer, A.B. Newman // *J Card Fail.* – 2009. – № 15 (7). – P. 593–599.

188. Kannel, W.B. Role of diabetes in congestive heart failure: the Framingham study / W.B. Kannel, M. Hjortland, W.P. Castelli // *Am J Cardiol.* – 1974. – № 34 (1). – P. 29–34.

189. Kaplan, R.N. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche / R.N. Kaplan, R.D. Riba, S. Zacharoulis, A.H. Bramley, L. Vincent, C. Costa, D.D. MacDonald, D.K. Jin [et al.] // *Nature.* – 2005. – № 438 (7069). – P. 820–827.

190. Karmazyn, M. Leptin as a cardiac hypertrophic factor: a potential target for therapeutics / M. Karmazyn, D.M. Purdham, V. Rajapurohitam, A. Zeidan // Trends Cardiovasc Med. – 2007. – 17 (6). – P. 206–211.
191. Katagi, M. Hyperglycemia induces abnormal gene expression in hematopoietic stem cells and their progeny in diabetic neuropathy / M. Katagi, T. Terashima, J. Okano, H. Urabe, Y. Nakae, N. Ogawa, J. Udagawa, H. Maegawa [et al.] // FEBS Lett. – 2014. – № 588 (6). – P. 1080–1086.
192. Katsara, O. Effects of donor age, gender, and in vitro cellular aging on the phenotypic, functional, and molecular characteristics of mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells / O. Katsara, L.G. Mahaira, E.G. Iliopoulou, A. Moustaki, A. Antsaklis, D. Loutradis, K. Stefanidis, C.N. Baxevanis [et al.] // Stem Cells Dev. – 2011. – № 20 (9). – P. 1549–1561.
193. Khan, H. Fasting plasma glucose and incident heart failure risk: a population-based cohort study and new meta-analysis / H. Khan, S.K. Kunutsor, J. Kauhanen, S. Kurl, E.Z. Gorodeski [et al.] // J Card Fail. – 2014. – № 20 (8). – P. 584–592.
194. Khan, W.S. The epitope characterisation and the osteogenic differentiation potential of human fat pad-derived stem cells is maintained with ageing in later life / W.S. Khan, A.B. Adesida, S.R. Tew [et al.] // Injury. – 2009. – № 40 (2). – P. 150–157.
195. Kilroy, G.E. Cytokine profile of human adipose-derived stem cells: expression of angiogenic, hematopoietic, and pro-inflammatory factors / G.E. Kilroy, S.J. Foster, X. Wu, J. Ruiz, S. Sherwood, A. Heifetz, J.W. Ludlow, D.M. Stricker [et al.] // J. Cell. Physiol. – 2007. – 212 (3). – P. 702–709.
196. Kim, H. Diabetic Mesenchymal Stem Cells Are Ineffective for Improving Limb Ischemia Due to Their Impaired Angiogenic Capability / H. Kim, J.W. Han, J.Y. Lee [et al.] // Cell Transplant. – 2015. – № 24 (8). – P. 1571–1584.
197. Kim, I.I. Affect of morphofunctional properties of mobilized progenitor cells of patients with chronic heart failure on the efficiency of autologous

intramyocardial cell transplantation / I.I. Kim, O.V. Poveshchenko, N.A. Bondarenko, A.P. Lykov, A.F. Poveschenko, D.V. Khabarov, E.A. Pokushalov, A.B. Romanov // Bull Exp Biol Med. – 2014. – № 157 (5). – P. 695–700.

198. Kim, K.A. Dysfunction of endothelial progenitor cells under diabetic conditions and its underlying mechanisms / K.A. Kim, Y.J. Shin, J.H. Kim, H. Lee, S.Y. Noh, S.H. Jang, O.N. Bae // Arch Pharm Res. – 2012. – № 35 (2). – P. 223–234.

199. Kizer, J.R. Associations of total and high-molecular-weight adiponectin with all-cause and cardiovascular mortality in older persons: the Cardiovascular Health Study / J.R. Kizer, D. Benkeser, A.M. Arnold, K.J. Mukamal, J.H. Ix, S.J. Zieman, D.S. Siscovick, R.P. Tracy [et al] / Circulation. – 2012. – № 126 (25). – P. 2951–2961.

200. Ko, K.I. Diabetes reduces mesenchymal stem cells in fracture healing through a TNF α -mediated mechanism / K.I. Ko, L.S. Coimbra, C. Tian, J. Alblowi, R.A. Kayal, T.A. Einhorn, L.C. Gerstenfeld, R.J. Pignolo [et al.] // Diabetologia. – 2015. – № 58 (3). – P. 633–642.

201. Kochegura, T. Circulating adipocytokines in comorbid patients with ischemic cardiomyopathy and type 2 diabetes mellitus / T. Kochegura, P. Makarevich, Ye. Parfyonova // Abstract Book the 3rd International Congress on Abdominal obesity Québec City, Québec, Canada. – 2012. – № 1 (5). – P. 64.

202. Kochegura, T. Circulating level of endothelin-1 in patients with chronic systolic heart failure correlates with the degree of diastolic dysfunction and type 2 diabetes co-morbidity / T. Kochegura, A. Ovchinnikov, P. Makarevich [et al.] // European Heart Journal Abstract Suppl. – 2013. – Vol. 34. – P. 461.

203. Kochegura, T. Circulating level of hepatocyte growth factor in patients with a comorbidity of heart failure and diabetes mellitus type 2 / T. Kochegura, P. Makarevich, A. Ovchinnikov [et al.] // European Journal of Heart Failure. – 2013. – Vol. 15 (S1). – P. S108.

204. Kochegura, T. Reduced number of circulating progenitor cells in patients with chronic heart failure and type 2 diabetes mellitus is associated with

cardiovascular death during three years follow-up / T. Kochegura, A. Ovchinnikov, L. Zhigunova [et al.] // *European Journal of Heart Failure Abstracts Suppl.* – 2014. – Vol. 16 (S2). – P. 301.

205. Kochegura, T. Circulating progenitor cells in patients with ischemic cardiomyopathy and type 2 diabetes mellitus comorbidity / T. Kochegura, Zh. Akopyan, G. Sharonov [et al.] // *Abstracts book the 9th International Congress on Coronary Artery Disease (ICCAD), Venice,.* – 2011. – P. 1131.

206. Kocot, J. Adipokine Profile in Patients with Type 2 Diabetes Depends on Degree of Obesity / J. Kocot, P. Dziemidok, M. Kiełczykowska, A. Hordyjewska, G. Szcześniak, I. Musik // *Med Sci Monit.* – 2017. – № 19 (23). – P. 4995–5004.

207. Kong, D. Enhanced inhibition of neointimal hyperplasia by genetically engineered endothelial progenitor cells / D. Kong, L.G. Melo, A.A. Mangi, L. Zhang, M. Lopez-Illasaca, M.A. Perrella, C.C. Liew, R.E. Pratt [et al.] // *Circulation.* – 2004. – № 109 (14). – P. 1769–1775.

208. Konya, H. Hepatocyte growth factor, a biomarker of macroangiopathy in diabetes mellitus / H. Konya, M. Miuchi, K. Satani, S. Matsutani, T. Tsunoda, Y. Yano, T. Katsuno, T. Hamaguchi [et al.] // *World J Diabetes.* – 2014. – № 5 (5). – P. 678–688.

209. Kostopoulos, C.G. Adiponectin/T-cadherin and apelin/APJ expression in human arteries and periadventitial fat: implication of local adipokine signaling in atherosclerosis? / C.G. Kostopoulos, S.G. Spiroglou, J.N. Varakis, E. Apostolakis, H.H. Papadaki // *Cardiovasc Pathol.* – 2014. – № 23 (3). – P. 131–138.

210. Krankel, N. Hyperglycemia reduces survival and impairs function of circulating blood-derived progenitor cells / N. Kränkel, V. Adams, A. Linke, S. Gielen, S. Erbs, K. Lenk, G. Schuler, R. Hambrecht // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2005. – № 25 (4). – P. 698–703.

211. Kroon, M.H. Prospective associations of B-type natriuretic peptide with markers of left ventricular function in individuals with and without type 2 diabetes: an 8-year follow-up of the Hoorn Study / M.H. Kroon, K. van den Hurk, M. Alssema,

O. Kamp, C.D. Stehouwer, R.M. Henry, M. Diamant, F. Boomsma [et al.] // *Diabetes Care*. – 2012. – № 35 (12). – P. 2510–2514.

212. Kumar, S. Resistin 420C/G gene polymorphism on circulating resistin, metabolic risk factors and insulin resistance in adult women / S. Kumar, V. Gupta, N. Srivastava, V. Gupta, S. Mishra, M. Natsu Shankar, A. Chandra, Roy U. [et al.] // *Immunol Lett*. – 2014. – № 162 (2 Pt B). – P. 287–291.

213. Kunita, E. Association between plasma high-molecular-weight adiponectin and coronary plaque characteristics assessed by computed tomography angiography in conditions of visceral adipose accumulation / E. Kunita, H. Yamamoto, T. Kitagawa, N. Ohashi, H. Utsunomiya, T. Oka, J. Horiguchi, K. Awai [et al.] // *Circ J*. – 2012. – № 76 (7). – P. 1687–1696.

214. Lamblin, N. Prognostic significance of circulating levels of angiogenic cytokines in patients with congestive heart failure / N. Lamblin, S. Susen, J. Dagorn, F. Mouquet, B. Jude, E. Van Belle, C. Bauters, P. de Groote // *Am Heart J*. – 2005. – №150 (1). – P. 137–143.

215. Lan, T.H. Ginsenoside Rb1 prevents homocysteine-induced EPC dysfunction via VEGF/p38MAPK and SDF-1/CXCR4 activation / T.H. Lan, D.P. Xu, M.T. Huang, J.X. Song, H.L. Wu, M. Li // *Sci Rep*. – 2017. – № 1 № 7 (1). – P. 13061.

216. Laufs, U. Physical inactivity increases oxidative stress, endothelial dysfunction, and atherosclerosis / U. Laufs, S. Wassmann, T. Czech, T. Münzel, E M. isenhauer, M. Böhm, G. Nickenig // *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. – 2005. – № 25 (4). – P. 809–814.

217. Lawler, P.R. Molecular basis for the regulation of angiogenesis by thrombospondin-1 and -2 / P.R. Lawler, J. Lawler // *Cold Spring Harb. Perspect. – Med*. 2012. – № 2 (5). – P. a006627.

218. LeBlanc, A.J. Thrombospondin-1, Free Radicals, and the Coronary Microcirculation: The Aging Conundrum / A.J. LeBlanc, N.Q. Kelm // *Antioxid Redox Signal*. – 2017. – № 27 (12). – P. 785–801.

219. Lei, L. Biological character of human adipose-derived adult stem cells and influence of donor age on cell replication in culture / L. Lei, W. Liao, P. Sheng, M. Fu, A. He, G. Huang // *Sci China C Life Sci.* – 2007. – № 50 (3). – P. 320–328.

220. Lenderink, T. Elevated placental growth factor levels are associated with adverse outcomes at four-year follow-up in patients with acute coronary syndromes / T. Lenderink, C. Heeschen, S. Fichtlscherer, S. Dimmeler, C.W. Hamm, A.M. Zeiher, M.L. Simoons, E. Boersma // *J Am Coll Cardiol.* – 2006. – № 47 (2). – P. 307–311.

221. Lev, E.I. Effect of intensive glycaemic control on endothelial progenitor cells in patients with long-standing uncontrolled type 2 diabetes / E.I. Lev, J. Singer, D. Leshem-Lev, M. Rigler, O. Dadush, M. Vaduganathan, A. Battler, R. Kornowski // *Eur J Prev Cardiol.* – 2014. – № 9 (21). – P. 1153–1162.

222. Li, B. VEGF and PlGF promote adult vasculogenesis by enhancing EPC recruitment and vessel formation at the site of tumor neovascularization / B. Li, E.E. Sharpe, A.B. Maupin, A.A. Teleron, A.L. Pyle, P. Carmeliet, P.P. Young // *FASEB J.* – 2006. – № 20 (9). – P. 1495–1497.

223. Li, M. Vascular Endothelial Regulation of Obesity-Associated Insulin Resistance / M. Li, M. Qian, J. Xu // *Front Cardiovasc Med.* – 2017. – № 4. – P. 51.

224. Li, Y. Hyperglycemia and Advanced Glycation End Products Regulate miR-126 Expression in Endothelial Progenitor Cells / Y. Li, Q. Zhou, C. Pei, B. Liu, M. Li, L. Fang, Y. Sun, Y. Li [et al] // *J Vasc Res.* – 2016. – № 53 (1-2). – P. 94–104.

225. Liang, X. Paracrine mechanisms of mesenchymal stem cell-based therapy: current status and perspectives / X. Liang, Y. Ding, Y. Zhang, H.F. Tse, Q. Lian // *Cell Transplant.* – 2014. – № 23 (9). – P. 1045–59.

226. Liao, S. Endothelial Progenitor Cells for Ischemic Stroke: Update on Basic Research and Application / S. Liao, C. Luo, B. Cao, H. Hu, S. Wang, H. Yue [et al] // *Stem Cells Int.* – 2017. – Vol. 2017. – P. 1–12.

227. Liao, W.I. An Elevated Glycemic Gap is Associated with Adverse Outcomes in Diabetic Patients with Acute Myocardial Infarction / W.I. Liao, C.S

Lin., C.H. Lee, Y.C. Wu, W.C. Chang, C.W. Hsu [et al] // *Sci Rep.* – 2016. – № 6. – P. 1-11.

228. Liew, A. Endothelial progenitor cells: diagnostic and therapeutic considerations / A. Liew, F. Barry, T. O'Brien // *Bioessays.* – 2006. – № 28 (3). – P. 261–270.

229. Lim, J.C. TNF α contributes to diabetes impaired angiogenesis in fracture healing / J.C. Lim, K.I. Ko, M. Mattos, M. Fang, C. Zhang, D. Feinberg, H. Sindi, S. Li [et al] // *Bone.* – № 99. – P. – 26–38.

230. Lim, S.S. A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010 / S.S. Lim, T. Vos, A.D. Flaxman, G. Danaei, K. Shibuya, H. Adair-Rohani, M. Amann, H.R. Anderson [et al] // *Lancet.* – 2012. – № 380 (9859). – P. 2224–2260.

231. Lin, C.S. Defining adipose tissue-derived stem cells in tissue and in culture / C.S. Lin, Z.C. Xin, C.H. Deng, H. Ning, G. Lin, T.F. Lue // *Histol Histopathol.* – 2010. – № 25 (6). – P. 807–815.

232. Lind, M. The association between HbA1c, fasting glucose, 1-hour glucose and 2-hour glucose during an oral glucose tolerance test and cardiovascular disease in individuals with elevated risk for diabetes / M. Lind, J. Tuomilehto, M. Uusitupa, O. Nerman, J. Eriksson, P. Ilanne-Parikka, S. Keinänen-Kiukaanniemi, M. Peltonen [et al.] // *PLoS One.* – 2014. – № 9 (10). – P. e109506.

233. Lindberg, S. Cardio-adipose tissue cross-talk: relationship between adiponectin, plasma pro brain natriuretic peptide and incident heart failure / S. Lindberg, J.S. Jensen, M. Bjerre, S.H. Pedersen, J. Frystyk, A. Flyvbjerg, R. Mogelvang // *Eur J Heart Fail.* – 2014. – № 16 (6). – P. 633–638.

234. Liu, K.L. Plasma angiopoietin-1 level, left ventricular ejection fraction, and multivessel disease predict development of 1-year major adverse cardiovascular events in patients with acute ST elevation myocardial infarction - a pilot study / K.L.

Liu, S.M. Lin, C.H. Chang, Y.C. Chen, P.H. Chu // *Int J Cardiol.* – 2015. – № 182. – P. 155–160.

235. Low Wang, C.C. Clinical Update: Cardiovascular Disease in Diabetes Mellitus: Atherosclerotic Cardiovascular Disease and Heart Failure in Type 2 Diabetes Mellitus - Mechanisms, Management, and Clinical Considerations / C.C. Low Wang, C.N. Hess, W.R. Hiatt, A.B. Goldfine // *Circulation.* – 2016. – № 133 (24). – P. 2459–2502.

236. Luttun, A. Revascularization of ischemic tissues by PlGF treatment, and inhibition of tumor angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Flt1 / A. Luttun, M. Tjwa, L. Moons, Y. Wu, A. Angelillo-Scherrer, F. Liao, J.A. Nagy, A. Hooper // *Nat Med.* – 2002. – № 8 (8). – P. 831–840.

237. Ma, F.X. Effects of oxidized low-density lipoprotein on endothelial progenitor cells survival and activity mediated by lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor / F.X. Ma, Q. Ren, Z.C. Han // *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao.* – 2007. – № 29 (3). – P. 336–341.

238. Ma, F.X. oxLDL reduced endothelial progenitor cells survival and function via regulating Akt/eNOS signal pathway / F.X. Ma, Q. Ren, Z.C. Han // *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi.* – 2007. – № 35 (2). – P. 173–177.

239. Madani, S. Direct effects of leptin on size and extracellular matrix components of human pediatric ventricular myocytes / S. Madani, S. De Girolamo, D.M. Muñoz, R.K. Li, G. Sweeney // *Cardiovasc Res.* – 2006. – № 69 (3). – P. 716–725.

240. Madonna, R. High glucose-induced hyperosmolarity impacts proliferation, cytoskeleton remodeling and migration of human induced pluripotent stem cells via aquaporin-1 / R. Madonna, Y.J. Geng, H. Shelat, P. Ferdinandy, R. De Caterina // *Biochim Biophys Acta.* – 2014. – № 1842 (11). – P. 2266–2275.

241. Maglione, D. Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor / D. Maglione, V. Guerriero, G. Viglietto,

P. Delli-Bovi, M.G. Persico // Proc Natl Acad Sci U S A. – 1991. – № 88 (20). – P. 9267–9271.

242. Magnusson, M. Low plasma level of atrial natriuretic peptide predicts development of diabetes: the prospective Malmo Diet and Cancer study / M. Magnusson, A. Jujic, B. Hedblad, G. Engström, M. Persson, J. Struck, N.G. Morgenthaler, P. Nilsson [et al] // J Clin Endocrinol Metab. – 2012. – № 97 (2). P. – 638–645.

243. Majumdar, P. Leptin and endothelin-1 mediated increased extracellular matrix protein production and cardiomyocyte hypertrophy in diabetic heart disease / P. Majumdar, S. Chen, B. George, S. Sen, M. Karmazyn, S. Chakrabarti // Diabetes Metab Res Rev. – 2009. – 25 (5). – P.452–463.

244. Makarevich, P. Gene Therapy By VEGF and HGF: Stimulation of Angiogenesis and Inflammation Control / P. Makarevich, K. Dergilev, T. Kohegura [et al.] // Molecular Therapy. – 2014. – Vol. 22 (S1). – P. S232.

245. Margetic, S. Leptin: a review of its peripheral actions and interactions / S. Margetic, C. Gazzola, G.G. Pegg, R.A. Hill // Int J Obes Relat Metab Disord. – 2002. – № 26 (11). – P. 1407–1433.

246. Mariman, E.C. Adipocyte extracellular matrix composition, dynamics and role in obesity / E.C. Mariman, P. Wang // Cell Mol Life Sci. – 2010. – № 67 (8). – P.1277–1292.

247. Martin, S.S. Leptin and incident cardiovascular disease: the Multi-ethnic Study of Atherosclerosis (MESA) / S.S. Martin, M.J. Blaha, E.D. Muse, A.N. Qasim, M.P. Reilly, R.S. Blumenthal, K. Nasir, M.H. Criqui [et al] // Atherosclerosis. – 2015. – № 239 (1). – P. 67–72.

248. Mathers, C.D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030 / C.D. Mathers, D. Loncar // PLoS Med. – 2006. – № 3 (11). – P. e442.

249. Matsumoto, K. Hepatocyte growth factor: renotropic role and potential therapeutics for renal diseases / K. Matsumoto, T. Nakamura // *Kidney Int.* – 2001. № 59 (6). – P. 2023–2038.
250. McClelland, R.L. 10-Year Coronary Heart Disease Risk Prediction Using Coronary Artery Calcium and Traditional Risk Factors: Derivation in the MESA (Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis) With Validation in the HNR (Heinz Nixdorf Recall) Study and the DHS (Dallas Heart Study) / R.L. McClelland, N.W. Jorgensen, M. Budoff, M.J. Blaha, W.S. Post, R.A. Kronmal, D.E. Bild, S. Shea [et al] // *J Am Coll Cardiol.* – 2015. – № 15 – № 66 (15). – P. 1643–1653.
251. McClung, J.M. Muscle cell derived angiopoietin-1 contributes to both myogenesis and angiogenesis in the ischemic environment / J.M. McClung, J.L. Reinardy, S.B. Mueller, T.J. McCord, C.D. Kontos, D.A. Brown, S.N. Hussain, C.A. Schmidt [et al] // *Front Physiol.* – 2015. – № 6 – P.161.
252. McEwen, L.N. Risk factors for mortality among patients with diabetes: the Translating Research Into Action for Diabetes (TRIAD) Study / L.N. McEwen, C. Kim, A.J. Karter, M.N. Haan, D. Ghosh, P.M. Lantz, C.M. Mangione, T.J. Thompson [et al] // *Diabetes Care.* – 2007. – № 30 (7). – P. 1736–1741.
253. McGaffin, K.R. Leptin attenuates cardiac apoptosis after chronic ischaemic injury / K.R. McGaffin, B. Zou, C.F. McTiernan, C.P. O'Donnell // *Cardiovasc Res.* – 2009. – № 83 (2). – P. 313–324.
254. McKie, P.M. Amino-Terminal Pro-B-Type Natriuretic Peptide and B-Type Natriuretic Peptide. Biomarkers for Mortality in a Large Community-Based Cohort Free of Heart Failure / P.M. McKie, R.J. Rodeheffer, A. Cataliotti, F.L. Martin, L.H. Urban, D.W. Mahoney, S.J. Jacobsen, M.M. Redfield [et al] // *Hypertension.* – 2006. – № 47 (5). – P. 874–880.
255. McKinnon, H. Hepatocyte growth factor/scatter factor and MET are involved in arterial repair and atherogenesis / H. McKinnon, E. Gherardi, M. Reidy, D. Bowyer // *Am J Pathol.* – 2006. – № 168 (1). – P. 340–348.

256. McMurray, J.J. Plasma endothelin in chronic heart failure / J.J. McMurray, S.G. Ray, I. Abdullah, H.J. Dargie, J.J. Morton // *Circulation*. – 1992. № 85 (4). P. 1374–1379.
257. Medina, R.J. Endothelial Progenitors: A Consensus Statement on Nomenclature / R.J. Medina, C.L. Barber, F. Sabatier, F. Dignat-George, J.M. Melero-Martin, K. Khosrotehrani, O. Ohneda, A.M. Randi [et al] // *Stem Cells Transl Med*. – 2017. – № 6 (5). – P. 1316–1320
258. Mellado-Gil, J. Disruption of hepatocyte growth factor/c-Met signaling enhances pancreatic beta-cell death and accelerates the onset of diabetes / J. Mellado-Gil, T.C. Rosa, C. Demirci, J.A. Gonzalez-Pertusa., S. Velazquez-Garcia, S. Ernst, S. Valle, R.C. Vasavada [et al] // *Diabetes*. – 2011. – № 60 (2). – P. 525–536.
259. Minami, Y. Angiogenic potential of early and late outgrowth endothelial progenitor cells is dependent on the time of emergence / Y. Minami, T. Nakajima, M. Ikutomi [et al] // *Int J Cardiol*. – 2015. – № 186 – P. 305–314.
260. Mizuno, H. Concise review: Adipose-derived stem cells as a novel tool for future regenerative medicine / H. Mizuno, M. Tobita, A.C. Uysal // *Stem Cells*. – 2012. – № 30 (5). – P. 804–810.
261. Möbius-Winkler, S. Endothelial progenitor cells: implications for cardiovascular disease / S. Möbius-Winkler, R. Höllriegel, G. Schuler, V. Adams // *Cytometry A*. – 2009. – № 75 (1). – P. 25–37.
262. Mohammadi, K. Comparative effects of microvascular and macrovascular disease on the risk of major outcomes in patients with type 2 diabetes / K. Mohammadi, M. Woodward, M. Marre, S. Colagiuri, M. Cooper, S. Harrap, G. Mancia, N. Poulter [et al] // *Cardiovasc Diabetol*. – 2017. – № 16 (1). – P. 95.
263. Mohammadi, K. Presentations of major peripheral arterial disease and risk of major outcomes in patients with type 2 diabetes: results from the ADVANCE-ON study / K. Mohammadi, M. Woodward, Y. Hirakawa, S. Zoungas, S. Colagiuri, P. Hamet, S. Harrap, N. Poulter [et al] // *Cardiovasc Diabetol*. – 2016. – № 15 (1). – P 129.

264. Moro, C. NH₂-terminal pro-brain natriuretic peptide and risk of diabetes / C. Moro, J. Jordan, A.L. Birkenfeld // *Diabetes*. – 2013. – № 62. – P. e28.
265. Mungunsukh, O. Hepatocyte Growth Factor Isoforms in Tissue Repair, Cancer, and Fibrotic Remodeling / O. Mungunsukh, E.A. McCart, R.M. Day // *Biomedicines*. – 2014. – № 4 (2). – P. 301–326.
266. Munzberg, H. Leptin receptor action and mechanisms of leptin resistance / H. Münzberg, M. Björnholm, S.H. Bates, M.G. Jr. Myers // *Cell Mol Life Sci*. – 2005. – № 62 (6). – P. 642–652.
267. Murohara, T. Autologous adiposederived regenerative cells for therapeutic angiogenesis / T. Murohara, S. Shintani, K. Kondo // *Curr. Pharm. Des.* – 2009. – № 15 (24). – P. 2784–2790.
268. Murray, I.R. Natural history of mesenchymal stem cells, from vessel walls to culture vessels / I.R. Murray, C.C. West, W.R. Hardy, A.W. James, T.S. Park, A. Nguyen, T. Tawonsawatruk, L. Lazzari [et al] // *Cell Mol Life Sci*. – 2014. – № 71 (8). – P. 1353–1374.
269. Nakamura, S. Hepatocyte growth factor as a potential index of complication in diabetes mellitus / S. Nakamura, R. Morishita, A. Moriguchi, Y. Yo, Y. Nakamura, S. Hayashi, K. Matsumoto, K. Matsumoto, T. Nakamura [et al] // *J Hypertens*. – 1998. – № 16 (12 Pt 2). – P. 2019–2026.
270. Nakata, M. Leptin promotes aggregation of human platelets via the long form of its receptor / M. Nakata, T. Yada, N. Soejima, I. Maruyama // *Diabetes*. – 1999. – № 48 (2). – P. 426–429.
271. Navedo, M.F. Elevated Ca²⁺ sparklet activity during acute hyperglycemia and diabetes in cerebral arterial smooth muscle cells / M.F. Navedo, Y. Takeda, M. Nieves-Cintrón, J.D. Molkentin, L.F. Santana // *Am. J. Physiol. Cell Physiol*. – 2010. – № 298 (2). – P. 211–220.
272. Nelson, T.J. SRF-dependent gene expression in isolated cardiomyocytes: regulation of genes involved in cardiac hypertrophy / T.J. Nelson, R. Jr. Balza, Q. Xiao, R.P. Misra // *J Mol Cell Cardiol*. – 2005. – № 39 (3). – P. 479–489.

273. Nevitt, C. Physiological levels of thrombospondin-1 decrease NO-dependent vasodilation in coronary microvessels from aged rats / C. Nevitt, G. McKenzie, K. Christian, J. Austin, S. Hencke [et al] // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* – 2016. – № 310 (11). – P. 1842-1850.

274. Newman, J.D. Primary Prevention of Cardiovascular Disease in Diabetes Mellitus / J.D. Newman, A.Z. Schwartzbard, H.S. Weintraub, I.J. Goldberg, J.S. Berger // *J Am Coll Cardiol.* – 2017. – № 70 (7). – P. 883–893.

275. Nian, M. Inflammatory cytokines and postmyocardial infarction remodeling / M. Nian, P. Lee, N. Khaper, P. Liu // *Circ Res.* – 2004. – № 94 (12). – P. 1543–1553.

276. Nieva-Vazquez, A. Serum resistin levels are associated with adiposity and insulin sensitivity in obese Hispanic subjects / A. Nieva-Vazquez, R. Pérez-Fuentes, E. Torres-Rasgado, J.G. López-López, J.R. Romero // *Metab Syndr Relat Disord.* – 2014. – № 12 (2). – P. 143–148.

277. Nishimura, M. Increased serum concentrations of human hepatocyte growth factor in proliferative diabetic retinopathy / M. Nishimura, K. Nakano, M. Ushiyama, A. Nanbu, K. Ohtsuka, H. Takahashi, M. Yoshimura // *J Clin Endocrinol Metab.* – 1998. – № 83 (1). P. 195–198.

278. Nitenberg, A. Vascular endothelium: a target organ for diabetes mellitus / A Nitenberg // *Ann Endocrinol.* – 2002. – № 63 (2 Pt 2). – P. 1S13-1S17.

279. Niu, M. Adiponectin induced AMP-activated protein kinase impairment mediates insulin resistance in Bama mini-pig fed high-fat and high-sucrose diet // M. Niu, L. Xiang, Y. Liu, Y. Zhao, J. Yuan, X. Dai, H. Chen // *Asian-Australas J Anim Sci.* – 2017. – № 30 (8). – P. 1190–1197.

280. Oikonomidis, D.L. Endothelin-B receptors and ventricular arrhythmogenesis in the rat model of acute myocardial infarction / D.L. Oikonomidis, D.G. Tsalikakis, G.G. Baltogiannis, A.T. Tzallas, X. Xourgia, M.G. Agelaki, A.J. Megalou, A. Fotopoulos [et al.] // *Basic Res Cardiol.* – 2010. – № 105 (2). – P. 235–245.

281. Ono, K. A. Endothelin antagonism with bosentan: current status and future perspectives / K. Ono, A. Matsumori // Cardiovasc Drug Rev. – 2002. – № 20 (1). – P. 1–18.

282. Padwal, R. The obesity paradox in heart failure patients with preserved versus reduced ejection fraction: a meta-analysis of individual patient data / R. Padwal, F.A. McAlister, J.J. McMurray, M.R. Cowie, M. Rich, S. Pocock, K. Swedberg, A. Maggioni [et al.] // Int J Obes. – 2014. – № 38 (8). – P. 1110–1114.

283. Palanivel, R. Distinct effects of short- and long-term leptin treatment on glucose and fatty acid uptake and metabolism in HL-1 cardiomyocytes / R. Palanivel, M. Eguchi, I. Shuralyova, I. Coe, G. Sweeney // Metabolism. – 2006. № 55 (8). – P. 1067–1075.

284. Paolisso, G. Plasma leptin level is associated with myocardial wall thickness in hypertensive insulin-resistant men / G. Paolisso, M.R. Tagliamonte, M. Galderisi, G.A. Zito, A. Petrocelli, C. Carella, O. de Divitiis, M. Varricchio // Hypertension. – 1999. – № 34 (5). – P. 1047–1052.

285. Park, A. Use of Statins to Augment Progenitor Cell Function in Preclinical and Clinical Studies of Regenerative Therapy: a Systematic Review / A. Park, J. Barrera-Ramirez, I. Ranasinghe, S. Pilon, R. Sy, D. Fergusson, D.S. Allan // Stem Cell Rev. – 2016. – № 12 (3). – P. 327–339.

286. Parker-Duffen, J.L. T-cadherin is essential for adiponectin-mediated revascularization / J.L. Parker-Duffen, K. Nakamura, M. Silver, R. Kikuchi, U. Tigges [et al.] // J Biol Chem. – 2013. – № 288 (34). – P. 24886–24897.

287. Parlato, M. Specific recruitment of circulating angiogenic cells using biomaterials as filters / M. Parlato, J. Molenda, W.L. Murphy // Acta Biomater. – 2017. – № 56. – P. 65–79.

288. Parry, H.M. Both high and low HbA1c predict incident heart failure in type 2 diabetes mellitus / H.M. Parry, H. Deshmukh, D. Levin, N. Van Zuydam, D.H. Elder [et al.] // Circ Heart Fail. – 2015. – № 8 (2). – P. 236–242.

289. Patel, H. Chen J., Das K.C., Kavdia M. Hyperglycemia induces differential change in oxidative stress at gene expression and functional levels in HUVEC and HMVEC. / H. Patel, J. Chen, K.C. Das, M. Kavdia // *Cardiovasc Diabetol.* – 2013. – № 142 (12). – P. 1–14.

290. Patel, J. V. Circulating biomarkers of angiogenesis as indicators of left ventricular systolic dysfunction amongst patients with coronary artery disease / J.V. Patel, A. Abraheem, J. Chackathayil, M. Gunning, J. Creamer [et al.] // *J Intern Med.* – 2009. – № 265 (5). – P. 562–567.

291. Patel, L. Resistin is expressed in human macrophages and directly regulated by PPAR gamma activators / L. Patel, A.C. Buckels, I.J. Kinghorn, P.R. Murdock, J.D. Holbrook [et al.] // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2003. – № 300 (2). – P. 472–476.

292. Perego, L. Circulating leptin correlates with left ventricular mass in morbid (grade III) obesity before and after weight loss induced by bariatric surgery: a potential role for leptin in mediating human left ventricular hypertrophy / L. Perego, P. Pizzocri, D. Corradi, F. Maisano, M. Paganelli [et al.] // *J Clin Endocrinol Metab.* – 2005. – № 90 (7). – P. 4087–4093.

293. Pinho, E.M. Higher BMI in heart failure patients is associated with longer survival only in the absence of diabetes / E.M. Pinho, P. Lourenço, S. Silva, O. Laszczyńska, A.B. Leite [et al.] // *J Cardiovasc Med (Hagerstown).* – 2015. – № 16 (8). – P. 576–582.

294. Preston, R.A. Effects of severe hypertension on endothelial and platelet microparticles / R.A. Preston, W. Jy, J.J. Jimenez, L.M. Mauro, L.L. Horstman [et al.] // *Hypertension.* – 2003. – № 41 (2). – P. 211–217.

295. Psaltis, P.J. Characterization of a resident population of adventitial macrophage progenitor cells in postnatal vasculature. / P.J. Psaltis, A.S. Puranik, D.B. Spoon, C.D. Chue, S.J. Hoffman [et al.] // *Circ Res.* – 2014. – № 115 (3). – P. 364–375.

296. Psaltis, P.J. Vascular wall progenitor cells in health and disease. / P.J. Psaltis, R.D. Simari // *Circ Res.* – 2015. – № 116 (8). – P. 1392–1412.
297. Radenković, M. Therapeutic Approach in the Improvement of Endothelial Dysfunction: The Current State of the Art / M Radenković, M. Stojanović, T. Prostran, M. Potpara, // *Biomed Res Int.* – 2013. – № 2013. – P. 12.
298. Rajapurohitam, V. An autocrine role for leptin in mediating the cardiomyocyte hypertrophic effects of angiotensin II and endothelin-1 / V. Rajapurohitam, S. Javadov, D.M. Purdham, L.A. Kirshenbaum, M. Karmazyn // *J Mol Cell Cardiol.* – 2006. – № 41 (2). – P. 265–274.
299. Rajendran, P. The vascular endothelium and human diseases. / P Rajendran, T Rengarajan, J Thangavel, Y Nishigaki, D Sakthisekaran [et al.] // *Int J Biol Sci.* – 2013. – № 9 (10). – P. 1057–1069.
300. Rando, T.A. Stem cells, ageing and the quest for immortality / T.A. Rando // *Nature.* – 2006. – № 441 (7097). – P. 1080–1086.
301. Rehman, J. Obesity is associated with increased levels of circulating hepatocyte growth factor / J. Rehman, R.V. Considine, J.E. Bovenkerk, J. Li, C.A. Slavens [et al.] // *J Am Coll Cardiol.* – 2003. – № 41 (8). – P. 1408–1413.
302. Reinhard, H. NT-proBNP levels, atherosclerosis and vascular function in asymptomatic type 2 diabetic patients with microalbuminuria: peripheral reactive hyperaemia index but not NT-proBNP is an independent predictor of coronary atherosclerosis / H. Reinhard, N. Wiinberg, P.R. Hansen, A. Kjaer, C.L. Petersen [et al.] // *Cardiovasc Diabetol.* – 2011. – № 10. – P. 71.
303. Reiss, Y. Angiopoietins. / Y. Reiss // *Recent Results Cancer Res.* – 2010. – № 180. – P. 3–13.
304. Ren, X. Advanced glycation end-products decreases expression of endothelial nitric oxide synthase through oxidative stress in human coronary artery endothelial cells / X. Ren, L. Ren, Q. Wei, H. Shao, L. Chen [et al.] // *Cardiovasc Diabetol.* – 2017. – № 16 (1). – P. 52.

305. Rosenzweig, A. Endothelial progenitor cells / A Rosenzweig // N Engl J Med. – 2003. – № 348 (7). – P. 581–582.
306. Rothermund, L. Cardiac endothelin system impairs left ventricular function in renin-dependent hypertension via decreased sarcoplasmic reticulum Ca(2+) uptake / L. Rothermund, Y.M. Pinto, B. Hoher, R. Vetter, S. Leggewie [et al.] // Circulation. – 2000. – № 102 (13). – P. 1582–1588.
307. Roy, H. Adenovirus-mediated gene transfer of placental growth factor to perivascular tissue induces angiogenesis via upregulation of the expression of endogenous vascular endothelial growth factor-A / H. Roy, S. Bhardwaj, M. Babu, S. Jauhiainen, K.H. Herzig [et al.] // Hum Gene Ther. – 2005. – № 16 (12). – P. 1422–1428.
308. Rubina, K. Adipose stromal cells stimulate angiogenesis via promoting progenitor cell differentiation, secretion of angiogenic factors, and enhancing vessel maturation / K. Rubina, N. Kalinina, A. Efimenko, T. Lopatina, V. Melikhova [et al.] // Tissue Eng Part A. – 2009. – № 15 (8). – P. 2039–2050.
309. Rychli, K. Hepatocyte growth factor is a strong predictor of mortality in patients with advanced heart failure / K. Rychli, B. Richter, P.J. Hohensinner, A. Kariem Mahdy, S. Neuhold [et al.] // Heart. – 2011. – № 97 (14). – P. 1158–1163.
310. Saboor, M. Functional status of vascular endothelium in diabetes mellitus / M. Saboor, Moinuddin, M. Ajmal, S. Ilyas // J Ayub Med Coll Abbottabad. – 2014. – № 26 (2). – P. 239–243.
311. Sahin, E. Linking functional decline of telomeres, mitochondria and stem cells during ageing / E. Sahin, R.A. Depinho // Nature. – 2010. – № 464 (7288). – P. 520–528.
312. Satani, K. Clinical significance of circulating hepatocyte growth factor, a new risk marker of carotid atherosclerosis in patients with Type 2 diabetes / K. Satani, H. Konya, T. Hamaguchi, A. Umehara, T. Katsuno [et al.] // Diabet Med. – 2006. – № 23 (6). – P. 617–622.

313. Sato, T. Prognostic value of serum hepatocyte growth factor in patients with acute coronary syndromes / T. Sato, T. Yoshinouchi, T. Sugimoto, T. Sakamoto, H. Fujieda [et al.] // *Jpn Circ J.* – 1999. – № 63 (8). – P. 583–588.
314. Schipper, B.M. Regional anatomic and age effects on cell function of human adipose-derived stem cells / B.M. Schipper, K.G. Marra, W. Zhang, A.D. Donnenberg, J.P. Rubin // *Ann Plast Surg.* – 2008. – № 60 (5). – P. 538–544.
315. Schmidt-Lucke, C. Improvement of endothelial damage and regeneration indexes in patients with coronary artery disease after 4 weeks of statin therapy / C. Schmidt-Lucke, S. Fichtlscherer, L. Rössig, U. Kämper, S. Dimmeler // *Atherosclerosis.* – 2010. – № 211 (1). – C. 249–254.
316. Schmitt, A. Characterization of advanced glycation end products for biochemical studies: side chain modifications and fluorescence characteristics / A. Schmitt, J. Schmitt, G. Münch, J. Gasic-Milencovic // *Anal. Biochem.* – 2005. – № 338 (2). – P. 201–215.
317. Schöttker, B. Prognostic association of HbA1c and fasting plasma glucose with reduced kidney function in subjects with and without diabetes mellitus. Results from a population-based cohort study from Germany. / B. Schöttker, H. Brenner, W. Koenig, H. Müller, D. Rothenbacher // *Prev Med.* – 2013. – № 57 (5). – P. 596–600.
318. Sethe, S. Aging of mesenchymal stem cells / S. Sethe, A. Scutt, A. Stolzing // *Ageing Res Rev.* – 2006. – № 5 (1). – P. 91–116.
319. Shantsila, E. Monocyte-derived and CD34+/KDR+ endothelial progenitor cells in heart failure / E. Shantsila, B.J. Wrigley, A. Shantsila, L.D. Tapp, P.S. Gill, G.Y. Lip // *J Thromb Haemost.* – 2012. – № 10 (7). – P. 1252–1261.
320. Shao, L. MiRNA-Sequence Indicates That Mesenchymal Stem Cells and Exosomes Have Similar Mechanism to Enhance Cardiac Repair / L. Shao, Y. Zhang, B. Lan, J. Wang, Z. Zhang [et al.] // *Biomed Res Int.* – 2017. – № 2017. – P. 1–9.
321. Shek, E.W. Chronic leptin infusion increases arterial pressure / E.W. Shek, M.W. Brands, J.E. Hall // *Hypertension.* – 1998. – № 31. – P. 409–414.

322. Shi, Q. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells / Q. Shi, S. Rafii, M.H. Wu, E.S. Wijelath, C. Yu [et al.] // *Blood*. – 1998. № 92 (2). – P. 362–367.
323. Shi, X. Vascular precursor cells in tissue injury repair / X. Shi, W. Zhang, L. Yin, W.M. Chilian, J. Krieger, P. Zhang // *Transl Res*. – 2017. – № 184. – P. 77–100.
324. Shibata, R. Adiponectin protects against myocardial ischemia-reperfusion injury through AMPK- and COX-2-dependent mechanisms / R. Shibata, K. Sato, D.R. Pimentel, Y. Takemura, S. Kihara [et al.] // *Nat Med*. – 2005. – № 11 (10). – P. 1096–1103.
325. Shibata, R. Adiponectin protects against the development of systolic dysfunction following myocardial infarction / R. Shibata, Y. Izumiya, K. Sato, K. Papanicolaou, S. Kihara [et al.] // *J Mol Cell Cardiol*. – 2007. – № 42 (6). – P. 1065–1074.
326. Shin, E.J. Leptin attenuates hypoxia/reoxygenation-induced activation of the intrinsic pathway of apoptosis in rat H9c2 cells / E.J. Shin, K. Schram, X.L. Zheng, G. Sweeney // *J Cell Physiol*. – 2009. – № 221 (2). – P. 490–497.
327. Short, J.D. Dyslipidemic Diet-Induced Monocyte "Priming" and Dysfunction in Non-Human Primates Is Triggered by Elevated Plasma Cholesterol and Accompanied by Altered Histone Acetylation / J.D. Short, S. Tavakoli, H.N. Nguyen, A. Carrera, C. Farnen [et al.] // *Front Immunol*. – 2017. – № 8. – P. 958.
328. Siegel, G. Phenotype, donor age and gender affect function of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells / G. Siegel, T. Kluba, U. Hermanutz-Klein, K. Bieback, H. Northoff, R. Schäfer // *BMC Med*. – 2013. – № 11. – P. 146.
329. Siegel-Axel, D.I. Platelets and endothelial cells / D.I. Siegel-Axel, M. Gawaz // *Semin Thromb Hemost*. – 2007. – № 33 (2). – P. 128–135.

330. Singh, A. Mesenchymal stem cells in cardiac regeneration: a detailed progress report of the last 6 years (2010-2015). / A. Singh, A. Singh, D. Sen // *Stem Cell Res Ther.* – 2016. – № 7 (1). – P. 82.
331. Singh, M. Changes in erythrocyte aggregation and deformability in diabetes mellitus: a brief review / M. Singh, S. Shin // *Indian J Exp Biol.* – 2009. – № 47 (1). – P. 7–15.
332. Smadja, D.M. Endothelial progenitor cells: characterization, in vitro expansion, and prospects for autologous cell therapy / D.M. Smadja, A. Cornet, J. Emmerich, M. Aiach, P. Gaussem // *Cell Biol Toxicol.* – 2007. – № 23 (4). – P. 223–239.
333. Smith, C.C. Leptin, the obesity-associated hormone, exhibits direct cardioprotective effects / C.C. Smith, M.M. Mocanu, S.M. Davidson, A.M. Wynne, J.C. Simpkin, D.M. Yellon // *Br J Pharmacol.* – 2006. – №149 (1). – P. 5–13.
334. Souza, L.E. Mesenchymal Stem Cells and Pericytes: To What Extent Are They Related? / L.E. Souza, T.M. Malta, S. Kashima Haddad, D.T. Covas // *Stem Cells Dev.* – 2016. – № 25 (24). P. 1843–1852.
335. Spinetti, G. Diabetes and vessel wall remodelling: from mechanistic insights to regenerative therapies / G. Spinetti, N. Kraenkel, C. Emanuelli, P. Madeddu // *Cardiovasc. Res.* – 2008. – № 78 (2). – P. 265–273.
336. Squillaro, T. Clinical Trials With Mesenchymal Stem Cells: An Update. / T. Squillaro, G. Peluso, U. Galderisi // *Cell Transplant.* – 2016. – № 25 (5). – P. 829–848.
337. Stein, J.H. Use of carotid ultrasound to identify subclinical vascular disease and evaluate cardiovascular disease risk: a consensus statement from the American Society of Echocardiography Carotid Intima-Media Thickness Task Force. Endorsed by the Society for Vascular Medicine / J.H. Stein, C.E. Korcarz, R.T. Hurst, E. Lonn, C.B. Kendall [et al.] // *J Am Soc Echocardiogr.* – 2008. – № 21 (2). – P. 93–111.

338. Stepien, M. New obesity indices and adipokines in normotensive patients and patients with hypertension: comparative pilot analysis / M. Stepien, A. Stepien, M. Banach, R.N. Wlazel, M. Paradowski [et al.] // *Angiology*. – 2014. – № 65 (4). – P. 333–342.
339. Steppan, C.M. The hormone resistin links obesity to diabetes / C.M. Steppan, S.T. Bailey, S. Bhat, E.J. Brown, R.R. Banerjee [et al.] // *Nature*. – 2001. – № 409 (6818). – P. 307–312.
340. Stolzing, A. Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: consequences for cell therapies / A. Stolzing, E. Jones, D. McGonagle, A. Scutt // *Mech Ageing Dev*. – 2008. № 129 (3). – P. 163–173.
341. Strehlow, K. Estrogen increases bone marrow-derived endothelial progenitor cell production and diminishes neointima formation / K. Strehlow, N. Werner, J. Berweiler, A. Link, U. Dirnagl [et al.] // *Circulation*. – 2003. – № 107 (24). – P. 3059–3065.
342. Sun, K. Combined transplantation of mesenchymal stem cells and endothelial progenitor cells for tissue engineering: a systematic review and meta-analysis / K. Sun, Z. Zhou, X. Ju, Y. Zhou, J. Lan [et al.] // *Stem Cell Res Ther*. – 2016. – № 7 (1). – P. 151.
343. Swedberg K. [и др.]. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic heart failure: executive summary (update 2005): The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Chronic Heart Failure of the European Society of Cardiology / K. Swedberg, J. Cleland, H. Dargie, H. Drexler, F. Follath [et al.] // *Eur Heart J*. – 2005. – № 26 (11). – P. 1115–1140.
344. Sweeney G. Cardiovascular effects of leptin / G. Sweeney // *Nat Rev Cardiol*. – 2010. – № 7 (1). – P. 22–29.
345. Symons, J.D. Lipotoxicity contributes to endothelial dysfunction: a focus on the contribution from ceramide / J.D. Symons, E.D. Abel // *Rev Endocr Metab Disord*. – 2013. – № 14 (1). – P. 59–68.

346. Szabo, T. Increased catabolic activity in adipose tissue of patients with chronic heart failure / T. Szabo, E. Postrach, A. Mahler, T. Kung, G. Turhan [et al.] // *Eur J Heart Fail.* – 2013. – № 15 (10). – P. 1131–1137.

347. Szabo, T. Plasma adiponectin in heart failure with and without cachexia: catabolic signal linking catabolism, symptomatic status, and prognosis / T. Szabo, N. Scherbakov, A. Sandek, T. Kung, S. von Haehling [et al.] // *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* – 2014. – № 24 (1). – P. 50–56.

348. Tajmir, P. Leptin increases cardiomyocyte hyperplasia via extracellular signal-regulated kinase- and phosphatidylinositol 3-kinase-dependent signaling pathways / P. Tajmir, R.B. Ceddia, R.K. Li, I.R. Coe, G. Sweeney // *Endocrinology.* – 2004. – № 145 (4). – P. 1550–1555.

349. Takeuchi, T. Adiponectin receptors, with special focus on the role of the third receptor, T-cadherin, in vascular disease / T Takeuchi, Y Adachi, Y Ohtsuki, M Furihata // *Med Mol Morphol.* – 2007. – № 40 (3). – P. 115–120.

350. Tang, W.H. Clinical significance of endogenous vasoactive neurohormones in chronic systolic heart failure / W.H. Tang, K. Shrestha, M.G. Martin, A.G. Borowski, S. Jasper [et al.] // *J Card Fail.* – 2010. – № 16 (8). – P. 635–640.

351. Targher, G. Prognostic impact of in-hospital hyperglycemia in hospitalized patients with acute heart failure: Results of the IN-HF (Italian Network on Heart Failure) Outcome registry. / Targher G, Dauriz M, Tavazzi L, Temporelli PL, Lucci D [et al.] // *Int J Cardiol.* – 2016. – № 203. – P. 587–93.

352. Tarkowski, A. Resistin competes with lipopolysaccharide for binding to toll-like receptor 4 / A. Tarkowski, J. Bjersing, A. Shestakov, M.I. Bokarewa // *J Cell Mol Med.* – 2010. – № 14 (6B). – C. 1419–1431.

353. Tarnow L., Astrup A.S., Parving H.H. Elevated placental growth factor (PlGF) predicts cardiovascular morbidity and mortality in type 1 diabetic patients with diabetic nephropathy / L. Tarnow, A.S. Astrup, H.H. Parving // *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* – 2005. – № 240. – P. 73–79.

354. Taubert, D. Acute effects of glucose and insulin on vascular endothelium / D Taubert, A Rosenkranz, R Berkels, R Roesen, E Schömig // *Diabetologia*. – 2004. – № 47 (12). – P. 2059–2071.
355. Taylor, J.A. B-type natriuretic peptide and N-terminal pro B-type natriuretic peptide are depressed in obesity despite higher left ventricular end diastolic pressures / J.A. Taylor, R.H. Christenson, K. Rao, M. Jorge, S.S. Gottlieb // *Am Heart J*. – 2006. – № 152 (6). – P. 1071–1076.
356. Tepper, O.M. Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures / O.M. Tepper , R.D. Galiano , J.M. Capla , C. Kalka , P.J. Gagne [et al.] // *Circulation*. – 2002. – № 106 (22). – P. 2781–2786.
357. Tian, D.Y. Notch Signaling in Endothelial Cells: Is It the Therapeutic Target for Vascular Neointimal Hyperplasia? / D.Y. Tian, X.R. Jin, X. Zeng, Y. Wang // *Int J Mol Sci*. – 2017. – № 18 (8). – P. pii: E1615.
358. Tomas, E. Enhanced muscle fat oxidation and glucose transport by ACRP30 globular domain: acetyl-CoA carboxylase inhibition and AMP-activated protein kinase activation / E. Tomas, T.S. Tsao, A.K. Saha, H.E. Murrey, C.C. Zhang [et al.] // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2002. № 99 (25). – P. 16309–16313.
359. Torán, J.L. CXCL6 is an important paracrine factor in the pro-angiogenic human cardiac progenitor-like cell secretome / J.L. Torán, S. Aguilar, J.A. López, C. Torroja, J.A. Quintana [et al.] // *Sci Rep*. – 2017. – № 7 (1). – P. 12490.
360. Trullas, J.C. Difficulties in the diagnosis of heart failure in patients with comorbidities / J.C. Trullas, J. Casado, J.L. Morales-Rull // *Rev Clin Esp*. – 2016. – № 216 (5). – P. 276–285.
361. Urbich, C. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology / C. Urbich, S. Dimmeler // *Circ Res*. – 2004. – № 95 (4). – P. 343–353.

362. Uslu, S. Relationship between adipocytokines and cardiovascular risk factors in patients with type 2 diabetes mellitus / S. Uslu, N. Kebapçı, M. Kara, C. Bal // *Exp Ther Med.* – 2012. – № 4 (1). – P. 113–120.

363. Valgimigli, M. CD34+ and endothelial progenitor cells in patients with various degrees of congestive heart failure. / M. Valgimigli, G.M. Rigolin, A. Fucili, M.D. Porta, O. Soukhomovskaia [et al.] // *Circulation.* – 2004. – № 110 (10). – P. 1209–1212.

364. van der Wal, H.H. Comorbidities in Heart Failure. / H.H. van der Wal, V.M. van Deursen, P. van der Meer, A.A. Voors // *Handb Exp Pharmacol.* – 2017. – № 243. – P. 35–66.

365. van Deursen, V.M. Co-morbidities in patients with heart failure: an analysis of the European Heart Failure Pilot Survey / V.M. van Deursen, R. Urso, C. Laroche, K. Damman, U. Dahlström [et al.] // *Eur J Heart Fail.* – 2014. – № 16 (1). – P. 103–111.

366. van Harmelen, V. Effect of BMI and age on adipose tissue cellularity and differentiation capacity in women / V. van Harmelen, T. Skurk, K. Röhrig, Y.M. Lee, M. Halbleib [et al.] // *Int J Obes Relat Metab Disord.* – 2003. № 27 (8). – P. 889–895.

367. van Weel, C., Comorbidity and guidelines: conflicting interests / C. van Weel, F.G. Schellevis // *Lancet.* – 2006. № 367 (9510). – P. 550–551.

368. Vardeny, O. Insulin resistance and incident heart failure the ARIC study (Atherosclerosis Risk in Communities) // O Vardeny, D.K. Gupta, B. Claggett, S. Burke, A. Shah [et al.] // *JACC Heart Fail.* – 2013. – № 6 (1). – P. 531–536.

369. Vasa, M. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease / M. Vasa, S. Fichtlscherer, A. Aicher, K. Adler, C. Urbich [et al.] // *Circ Res.* – 2001. – № 1 (89). – P. E1-7.

370. Velloso, M.W. Endothelial nitric oxide synthase Glu298Asp gene polymorphism in a multi-ethnic population with heart failure and controls / M.W.

Velloso, S.B. Pereira, L. Gouveia, S. Chermont, O.M. Tardin [et al.] // Nitric Oxide. – 2010. – № 3 (22). – P. 220–225.

371. von Bibra, H. Cardiometabolic Syndrome and Increased Risk of Heart Failure / H von Bibra, W. Paulus, St John Sutton M. // Curr Heart Fail Rep. – 2016. – № 5 (13). – P. 219–229.

372. von Bibra, H. Dietary therapy in heart failure with preserved ejection fraction and/or left ventricular diastolic dysfunction in patients with metabolic syndrome. / H von Bibra, A. Ströhle, St John Sutton M., N. Worm // Int J Cardiol. – 2017. – № 234. – P. 7–15.

373. von Haehling, S. Revisiting the obesity paradox in heart failure: new insights? / S. von Haehling, W. Doehner, S.D. Anker // Eur J Heart Fail. – 2011. – № 2 (13). – P. 130–132.

374. von Haehling, S. Tipping the scale: heart failure, body mass index, and prognosis / S. von Haehling, T.B. Horwich, G.C. Fonarow, S.D. Anker // Circulation. – 2007. – № 6 (116). – P. 588–590.

375. Walker, A.M. Diabetes mellitus is associated with adverse structural and functional cardiac remodelling in chronic heart failure with reduced ejection / A.M. Walker, P.A. Patel, A. Rajwani, D. Groves, C. Denby [et al.] // Diab Vasc Dis Res. – 2016. – № 5 (13). – P. 331–340.

376. Walter, D.H. Endothelial progenitor cells: regulation and contribution to adult neovascularization / D.H. Walter, S. Dimmeler // Herz. – 2002. – № 7 (27). – P. 579–588.

377. Wang, Y Prediction of heart failure in patients with type 2 diabetes mellitus- a systematic review and meta-analysis / Y. Wang, T. Negishi, K. Negishi, T.H. Marwick // Diabetes Res Clin Pract. – 2015. – № 1 (108). – P. 55–66.

378. Wang, C. DNA damage response and cellular senescence in tissues of aging mice / C. Wang, D. Jurk, M. Maddick, G. Nelson, C. Martin-Ruiz [et al.] // Aging Cell. – 2009. – № 8. – P. 311–323.

379. Wang, H. Endothelial nitric oxide synthase decreases beta-adrenergic responsiveness via inhibition of the L-type Ca^{2+} current / H. Wang, M.J. Kohr, D.G. Wheeler, M.T. Ziolo // *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. – 2008. – № 294. – P. H1473-80.
380. Wang, H. Mesenchymal stem cells microvesicles stabilize endothelial barrier function partly mediated by hepatocyte growth factor (HGF). / H. Wang, R. Zheng, Q. Chen, J. Shao, J. Yu [et al.] // *Stem Cell Res Ther*. – 2017. – № 1 (8). – P. 211.
381. Wang, J. Vitreous and plasma VEGF levels as predictive factors in the progression of proliferative diabetic retinopathy after vitrectomy / J Wang, S Chen, F Jiang, C You, C Mao [et al.] // *PLoS One*. – 2014. – № 9. – P. e110531.
382. Wang, P. Perivascular adipose tissue-derived visfatin is a vascular smooth muscle cell growth factor: role of nicotinamide mononucleotide / P. Wang, T.Y. Xu, Y.F. Guan, D.F. Su, G.R. Fan, C.Y. Miao // *Cardiovasc Res*. – 2009. – № 81. – P. 370–380.
383. Wassmann, S. Improvement of endothelial function by systemic transfusion of vascular progenitor cells / S. Wassmann, N. Werner, T. Czech, G. Nickenig // *Circ Res*. – 2006. – № 99. – P. e74-83.
384. Watt, J. The relationship between oxidised LDL, endothelial progenitor cells and coronary endothelial function in patients with CHD / J. Watt, S. Kennedy, N. Ahmed, J. Hayhurst, J.D. McClure [et al.] // *Open Heart*. – 2016. – № 3. – P. e000342.
385. Wei, Z.Z. Priming of the Cells: Hypoxic Preconditioning for Stem Cell Therapy / Z.Z. Wei, Y.B. Zhu, J.Y. Zhang, M.R. McCrary, S. Wang [et al.] // *Chin Med J (Engl)*. – 2017. – № 19 (130). – P. 2361–2374.
386. Werner, N. Bone marrow-derived progenitor cells modulate vascular reendothelialization and neointimal formation: effect of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibition / N. Werner, J. Priller, U. Laufs, M. Endres, M. Böhm [et al.] // *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. – 2002. – № 22. – P. 1567–1572.

387. Werner, N. Endothelial progenitor cells correlate with endothelial function in patients with coronary artery disease / N. Werner, S. Wassmann, P. Ahlers, T. Schiegl, S. Kosiol [et al.] // *Basic Res Cardiol.* – 2007. – № 102. – P. 565–571.
388. Widyantoro, B. Endothelial cell-derived endothelin-1 promotes cardiac fibrosis in diabetic hearts through stimulation of endothelial-to-mesenchymal transition / B. Widyantoro, N. Emoto, K. Nakayama, D.W. Anggrahini, S. Adiarto [et al.] // *Circulation.* – 2010. – № 121. – P. 2407–2418.
389. Wils, J. Modulating putative endothelial progenitor cells for the treatment of endothelial dysfunction and cardiovascular complications in diabetes / J. Wils, J. Favre, J. Bellien // *Pharmacol Ther.* – 2017. № 170. – P. 98–115.
390. Wolk, R. Plasma leptin and prognosis in patients with established coronary atherosclerosis / R. Wolk, P. Berger, R.J. Lennon, E.S. Brilakis, B.D. Johnson, V.K. Somers // *J Am Coll Cardiol.* – 2004. – № 44. – P. 1819–1824.
391. Woodman, R.J. Mechanisms, significance and treatment of vascular dysfunction in type 2 diabetes mellitus: focus on lipid-regulating therapy / R.J. Woodman, G.T. Chew, G.F. Watts // *Drugs.* – 2005. – № 1 (65). – P. 31–74.
392. Wróbel, K. Novel analytical approach to monitoring advanced glycosylation end products in human serum with on-line spectrophotometric and spectrofluorometric detection in a flow system / K. Wróbel, K. Wróbel, M.E. Garay-Sevilla, L.E. Nava, J.M. Malacara // *Clin. Chem.* – 1997. – № 43. – P. 1563–1569.
393. Wu H., Li R., Wei Z.H., Zhang X.L., Chen J.Z., Dai Q, Xie J X.B. Diabetes-Induced Oxidative Stress in Endothelial Progenitor Cells May Be Sustained by a Positive Feedback Loop Involving High Mobility Group Box-1 / H. Wu, R. Li, Z.H. Wei, X.L. Zhang, J.Z. Chen [et al.] // *Oxid Med Cell Longev.* – 2016. – № 2016. – P. 1–9.
394. Wu, Y. Risk factors contributing to type 2 diabetes and recent advances in the treatment and prevention / Y. Wu , Y. Ding , Y. Tanaka , W. Zhang // *Int J Med Sci.* – 2014. – № 11 (11). – P. 1185–1200.

395. Xu, F.P. Leptin induces hypertrophy via endothelin-1-reactive oxygen species pathway in cultured neonatal rat cardiomyocytes / F.P. Xu, M.S. Chen, Y.Z. Wang, Q. Yi, S.B. Lin [et al.] // *Circulation*. – 2004. № 110 (10). – P. 1269–1275.
396. Xu, J. Endothelial-like cells differentiated from mesenchymal stem cells attenuate neointimal hyperplasia after vascular injury. / J. Xu, D. Wu, Y. Yang, K. Ji, P. Gao // *Mol Med Rep*. – 2016. – № 5 (14). – P. 4830–4836.
397. Yamamoto, K. Contribution of Bcl-2, but not Bcl-xL and Bax, to antiapoptotic actions of hepatocyte growth factor in hypoxia-conditioned human endothelial cells / K. Yamamoto, R. Morishita, S. Hayashi, H. Matsushita, H. Nakagami [et al.] // *Hypertension*. – 2001. – № 37. – P. 1341–1348.
398. Yamauchi, T. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase / T. Yamauchi, J. Kamon, Y. Minokoshi, Y. Ito, H. Waki [et al.] // *Nat Med*. – 2002. – № 8 (11). – P. 1288–1295.
399. Yamauchi, T. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects / T. Yamauchi, J. Kamon, Y. Ito, A. Tsuchida, T. Yokomizo [et al.] // *Nature*. – 2003. – № 423 (6941). – P. 762–769.
400. Yamauchi, T. Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions / T. Yamauchi, Y. Nio, T. Maki, M. Kobayashi, T. Takazawa [et al.] // *Nat Med*. – 2007. – №13 (3). – P. 332–339.
401. Yamawaki, H. Omentin, a novel adipocytokine inhibits TNF-induced vascular inflammation in human endothelial cells / H. Yamawaki, J. Kuramoto, S. Kameshima, T. Usui, M. Okada, Y. Hara // *Biochem Biophys Res Commun*. – 2011. – № 408 (2). – P. 339–343.
402. Yanagisawa, M. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells / M. Yanagisawa, H. Kurihara, S. Kimura, Y. Tomobe, M. Kobayashi [et al.] // *Nature*. – 1988. – № 332 (6163). – P. 411–415.

403. Yang O., Li J., Kong J. The Endothelium as a Target for the Treatment of Heart Failure / O. Yang, J. Li, J. Kong // *Cell Biochem Biophys.* – 2015. – № 3 (72). – P. 751–756.
404. Yang, C. Enhancement of neovascularization with cord blood CD133+ cell-derived endothelial progenitor cell transplantation / C. Yang, Z.H. Zhang, Z.J. Li, R.C. Yang, G.Q. Qian, Z.C. Han // *Thromb Haemost.* – 2004. – № 6 (91). – P. 1202–1212.
405. Yasuda, S. Angiotensin-converting enzyme inhibition restores hepatocyte growth factor production in patients with congestive heart failure / S. Yasuda, Y. Goto, H. Sumida, T. Noguchi, T. Baba [et al.] // *Hypertension.* – 1999. – № 6 (33). – P. 1374–8.
406. Yousef, Z.R. Postinfarction left ventricular remodelling: where are the theories and trials leading us? / Z.R. Yousef, S.R. Redwood, M.S. Marber // *Heart.* – 2000. – № 1 (83). – P. 76–80.
407. Yu, J. Endothelium derived nitric oxide synthase negatively regulates the PDGF-survivin pathway during flow-dependent vascular remodeling. / J. Yu, Y. Zhang, X. Zhang, R.D. Rudic, P.M. Bauer [et al.] // *PLoS One.* – 2012. – № 2 (7). – P. e31495.
408. Yuan, J.S. Statistical analysis of real-time PCR data / J.S. Yuan, A. Reed, F. Chen, C.N. Stewart Jr. // *BMC Bioinformatics.* – 2006. № 7. – P. 85.
409. Zarnegar, R. The many faces of hepatocyte growth factor: from hepatopoiesis to hematopoiesis / R. Zarnegar, G.K. Michalopoulos // *J Cell Biol.* – 1995. – № 129. – P. 1177–1180.
410. Zeidan A., Javadov S., Karmazyn M. Essential role of Rho/ROCK-dependent processes and actin dynamics in mediating leptin-induced hypertrophy in rat neonatal ventricular myocytes / A. Zeidan, S. Javadov, M. Karmazyn // *Cardiovasc Res.* – 2006. – № 72. – P. 101–111.

411. Zethelius, B. Use of multiple biomarkers to improve the prediction of death from cardiovascular causes / B. Zethelius, L. Berglund, J. Sundström, E. Ingelsson, S. Basu [et al.] // *N Engl J Med.* – 2008. – № 358. – P. 2107–2116.
412. Zhang, H. The link between metabolic abnormalities and endothelial dysfunction in type 2 diabetes: an update / H. Zhang, K.C. Dellsperger, C. Zhang // *Basic Res Cardiol.* – 2012. – № 107 (1). – P. 237.
413. Zhang, Q. oxLDL induces injury and defenestration of human liver sinusoidal endothelial cells via LOX1. / Q. Zhang, J. Liu, J. Liu, W. Huang, L. Tian [et al.] // *J Mol Endocrinol.* – 2014. – № 2 (53). – C. 281–93.
414. Zhao, W. Effect of TGF- β 1 on the Migration and Recruitment of Mesenchymal Stem Cells after Vascular Balloon Injury: Involvement of Matrix Metalloproteinase-14. / W. Zhao, C. Wang, R. Liu, C. Wei, J. Duan [et al.] // *Sci Rep.* – 2016. – № 6 (16).
415. Zhu, X.Y. Transplantation of adipose-derived stem cells overexpressing hHGF into cardiac tissue / X.Y. Zhu, X.Z. Zhang, L. Xu, X.Y. Zhong, Q. Ding, Y.X. Chen // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2009. – № 379. – P. 1084–1090.
416. Zinman B, Wanner C, Lachin JM et al. Empagliflozin, Cardiovascular Outcomes, and Mortality in Type 2 Diabetes / B. Zinman, C. Wanner, J.M. Lachin, D. Fitchett, E. Bluhmki [et al.] // *N Engl J Med.* – 2015. – № 22 (373). – P. 2117–2128.

ПРИЛОЖЕНИЯ

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2531947

СПОСОБ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ РИСКА СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ ЛЕТАЛЬНОСТИ У БОЛЬНЫХ С ХРОНИЧЕСКОЙ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ ИШЕМИЧЕСКОЙ ЭТИОЛОГИИ, СОЧЕТАЮЩЕЙСЯ С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2 ТИПА

Патентообладатель(ли): *Федеральное государственное бюджетное учреждение "Российский кардиологический научно-производственный комплекс" Министерства здравоохранения Российской Федерации (RU)*

Автор(ы): *с.м. на обороте*

Заявка № 2013129365

Приоритет изобретения **27 июня 2013 г.**

Зарегистрировано в Государственном реестре изобретений Российской Федерации **02 сентября 2014 г.**

Срок действия патента истекает **27 июня 2033 г.**

Врио руководителя Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

Л.Л. Кирий



РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2620167

**СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ СРЕДСТВА ДЛЯ СТИМУЛЯЦИИ
РЕГЕНЕРАЦИИ НА ОСНОВЕ ПРОДУКТОВ СЕКРЕЦИИ
МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ
СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА**

Патентообладатель: *Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
"Московский государственный университет имени М.В.
Ломоносова" (МГУ) (RU)*

Авторы: *см. на обороте*

Заявка № 2015154800

Приоритет изобретения 21 декабря 2015 г.

Дата государственной регистрации в

Государственном реестре изобретений

Российской Федерации 23 мая 2017 г.

Срок действия исключительного права

на изобретение истекает 21 декабря 2035 г.

Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

Г.П. Ивлиев



РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2574017

**СРЕДСТВО ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ОЖОГОВ И РАН НА ОСНОВЕ
ЦИТОКИНОВ И ФАКТОРОВ РОСТА, СЕКРЕТИРУЕМЫХ
МЕЗЕНХИМНЫМИ КЛЕТКАМИ ЧЕЛОВЕКА, СПОСОБ
ПОЛУЧЕНИЯ СРЕДСТВА И СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ ОЖОГОВ
И РАН**

Патентообладатель(ли): *Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
"Московский государственный университет имени
М.В. Ломоносова" (МГУ) (RU)*

Автор(ы): *см. на обороте*

Заявка № 2014139540

Приоритет изобретения 30 сентября 2014 г.

Зарегистрировано в Государственном реестре
изобретений Российской Федерации 23 декабря 2015 г.

Срок действия патента истекает 30 сентября 2034 г.

Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

Г.П. Ивлиев Г.П. Ивлиев



РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

(19) RU (11) **2 548 801** (13) C2



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(51) МПК

[C12N 5/071 \(2010.01\)](#)

[C12N 5/075 \(2010.01\)](#)

[C12Q 1/68 \(2006.01\)](#)

[A61K 48/00 \(2006.01\)](#)

[A61P 9/10 \(2006.01\)](#)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

Статус: действует (последнее изменение статуса: 27.06.2017)
Пошлина: учтена за 7 год с 07.12.2017 по 06.12.2018

(21)(22) Заявка: [2011149376/10](#), 06.12.2011

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
06.12.2011

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 06.12.2011

(43) Дата публикации заявки: 20.06.2013 Бюл. № 17

(45) Опубликовано: [20.04.2015](#) Бюл. № 11

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: EFIMENKO A. et al., Angiogenic properties of aged adipose derived mesenchymal stem cells after hypoxic conditioning, Journ. of Translat. Medicine, 2011, v.9, n.10, p. 1-13. RUBINA K. et al., Adipose Stromal Cells Stimulate Angiogenesis via Promoting Progenitor Cell Differentiation, Secretion of Angiogenic Factors, and Enhancing Vessel Maturation,

Tiss.Engin:Part A, 2009, v.15, n.8, p.2039-2050. US 20110151016 A1, 23.06.2011. RU 2332223 C2, 27.08.2008. YAMAGUCHI T. et al., Therapeutic Angiogenesis Induced by Injecting Hepatocyte Growth Factor in Ischemic Canine Hearts, Surg Today, 2005, v.35, p.855-860

Адрес для переписки:

119991, Москва ГСП 1 Ленинские горы, 1
МГУ, Центр трансфера
технологий, Дьяченко О.Г.

(72) Автор(ы):

Ефименко Анастасия Юрьевна (RU),
Джояшвили Инна Александровна (RU),
Старостина Екатерина Евгеньевна (RU),
Кочегура Татьяна Николаевна (RU),
Акопян Жанна Алексеевна (RU),
Поколасва Зоя Ивановна (RU),
Рубина Ксения Андреевна (RU),
Сыгоева Вероника Юрьевна (RU),
Калинина Наталья Игоревна (RU),
Парфенова Елена Викторовна (RU),
Гкачук Всеволод Арсеньевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Российская Федерация, от имени которой выступает Министерство образования и науки Российской Федерации, RU (RU),
Федеральное государственное бюджетное учреждение "Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии имени В.А.Алмазова" Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации, RU (RU),
Федеральное государственное бюджетное учреждение "Российский кардиологический научно-производственный комплекс" Минздравсопразвития РФ (RU),
Государственное учебно-научное учреждение Факультет фундаментальной медицины Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова (RU)

(54) СПОСОБ ОЦЕНКИ АНГИОГЕНЕПОГО ПОТЕНЦИАЛА ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК У БОЛЬНЫХ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



(19) **RU** (11) **2 620 342** (13) **C1**

(51) МПК
A61K 8/14 (2006.01)
A61K 8/98 (2006.01)
A61Q 19/00 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) **ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

(21)(22) Заявка: 2016118245, 11.05.2016
(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
11.05.2016
Дата регистрации:
24.05.2017
Приоритет(ы):
(22) Дата подачи заявки: 11.05.2016
(45) Опубликовано: 24.05.2017 Бюл. № 15
Адрес для переписки:
129323, Москва, а/я 30, для Куприяновой О.И.

(72) Автор(ы):
Ткачук Виссолод Арсеньевич (RU),
Акопян Жанна Алексеевна (RU),
Ефименко Анастасия Юрьевна (RU),
Григорьева Ольга Александровна (RU),
Калинина Наталья Игорьевна (RU),
Кочегура Татьяна Николаевна (RU),
Мякаревич Павел Игоревич (RU),
Сагарадзе Георгий Дмитриевич (RU),
Сысоева Вероника Юрьевна (RU),
Тарасова Елена Владимировна (RU),
Чапленко Александр Андреевич (RU),
Широкова Галина Васильевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):
ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ
ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ "ГЕННАЯ И
КЛЕТОЧНАЯ ТЕРАПИЯ" (ООО
"ГЕННАЯ И КЛЕТОЧНАЯ ТЕРАПИЯ")
(RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2574017 C1, 27.01.2016. RU
2341270 C2, 20.12.2008. RU 2455354 C1,
10.07.2012. UA 86816 U, 10.01.2014. WO0069449
A2, 23.11.2000.

(54) КОСМЕТИЧЕСКОЕ СРЕДСТВО НА ОСНОВЕ ПРОДУКТОВ СЕКРЕЦИИ МЕЗЕНХИМНЫХ
СТВОЛОВЫХ/СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЖИРОВОЙ ТКАНИ ЧЕЛОВЕКА И СПОСОБ ЕГО
ПОЛУЧЕНИЯ

0 3 4 2 C 1

RU 2 6 2 0 3 4 2 C 1

УТВЕРЖДАЮ

Проректор - начальник Управления
научной политики и организации
научных исследований
федерального государственного
бюджетного образовательного
учреждения высшего образования
"Московский государственный
университет имени М.В. Ломоносова"



А.И. Федянин
профессор Федянин Андрей Анатольевич

" 9 " *сентября* 2017 г.

Акт
о внедрении в учебный процесс

Полученные результаты и выводы диссертационного исследования старшего научного сотрудника, к.м.н. медицинского научно-образовательного центра ФГБОУ ВО "Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова" Т.Н. Кочегуры на тему: Молекулярные и клеточные механизмы влияния сопутствующего сахарного диабета 2 типа на течение сердечной недостаточности" внедрены в курс лекций и семинарских занятий кафедры физиологии и общей патологии ФГБОУ ВО "Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова".

Заведующий кафедрой физиологии и общей патологии
факультета фундаментальной медицины
ФГБОУ ВО "Московский государственный
университет имени М.В. Ломоносова",
д.б.н., профессор

В.Б. Кошелев

В.Б. Кошелев

Доцент кафедры физиологии и общей патологии,
факультета фундаментальной медицины
ФГБОУ ВО "Московский государственный
университет имени М.В. Ломоносова", к.м.н.

Н.М. Гайфуллин

Н.М. Гайфуллин

Подписи В.Б. Кошелева и



Н.М. Гайфуллина

С.Е. Ю. Яковлева

УТВЕРЖДАЮ

Проректор - начальник Управления
научной политики и организации
научных исследований
федерального государственного
бюджетного образовательного
учреждения высшего образования
"Московский государственный
университет имени М.В. Ломоносова"



А.А. Федянин
профессор Федянин Андрей Анатольевич

" 9 " *января* 2017 г.

Акт
о внедрении в учебный процесс

Полученные результаты и выводы диссертационного исследования старшего научного сотрудника, к.м.н. медицинского научно-образовательного центра ФГБОУ ВО "Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова" Т.Н. Кочегуры на тему: Молекулярные и клеточные механизмы влияния сопутствующего сахарного диабета 2 типа на течение сердечной недостаточности" внедрены в курс лекций и семинарских занятий кафедры биохимии и молекулярной медицины ФГБОУ ВО "Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова".

Заведующий кафедрой биохимии и молекулярной медицины,
декан факультета фундаментальной медицины
ФГБОУ ВО "Московский государственный
университет имени М.В. Ломоносова",
академик РАН, д.б.н., профессор

В.А. Ткачук
В.А. Ткачук

Доцент факультета фундаментальной медицины
ФГБОУ ВО "Московский государственный
университет имени М.В. Ломоносова", к.м.н.

Ж.А. Акопян
Ж.А. Акопян

Согласен В.А. Ткачук



СПЕЦИАЛИСТ ПО КАДРАМ *Е.Ю. Яковлева*

"УТВЕРЖДАЮ"

Проректор - начальник Управления
научной политики и организации
научных исследований
федерального государственного
бюджетного образовательного
учреждения высшего образования
"Московский государственный
университет имени М.В. Ломоносова"



профессор Федянин Андрей Анатольевич

" 7 " февраля 2017 г.

Акт

о внедрении в лабораторную практику

1. Наименование предложения для внедрения "Клиническое значение циркулирующих прогениторных клеток для пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями и сопутствующими метаболическими нарушениями".
2. Кем и когда предложено: старший научный сотрудник, к.м.н., медицинского научно-образовательного центра ФГБОУ ВО "Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова", Кочегура Т.Н., 2014-2017 г.г.
3. Источники информации:
 - Влияние сопутствующего сахарного диабета 2 типа на количество циркулирующих прогениторных клеток у больных с ишемической кардиомиопатией / Т.Н. Кочегура, Ж.А. Акопян, Г.В. Шаронов [и др.] // Сахарный диабет. – 2011. – № 3. – С. 36-43.
 - Изучение количества циркулирующих прогениторных клеток эндотелия у больных сахарным диабетом 1 типа. // А.В. Соколова, Т.Н. Кочегура, Е.В. Парфёнова, М.В. Шестакова // Сахарный диабет. – 2015. – № 3. – С. 5-10.
 - Патент №2531947 С1. Способ прогнозирования риска сердечно-сосудистой летальности у больных с хронической сердечной недостаточностью ишемической этиологии, сочетающейся с сахарным диабетом 2 типа / Е.В. Парфенова, Т.Н. Кочегура, Г.В. Шаронов, Л.В. Жигунова, А.Г. Овчинников, В.А. Ткачук, Ф.Т. Агеев; патентообладатели: Федеральное государственное бюджетное учреждение "Российский кардиологический научно-производственный комплекс" Министерства здравоохранения Российской Федерации; заявка 2013129365/15, 27.06.2013; опубликовано 27.10.2014; Бюл. № 30. - 14 с.
4. Где и когда внедрено: Отдел лабораторной диагностики медицинского научно-образовательного центра ФГБОУ ВО "Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова", г. Москва, Ломоносовский пр-т, д 27., к.10.
5. Внедрено в лабораторную практику с 2014 г. как дополнительное исследование к стандартному протоколу обследования пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями и сопутствующими метаболическими нарушениями.
6. Эффективность внедрения: обоснован дифференцированный подход к лабораторному обследованию пациентов с заболеваниями сердечно-сосудистой системы и сопутствующими метаболическими нарушениями и дана научно-обоснованная оценка возможности прогнозирования исхода заболевания в зависимости от количества циркулирующих прогениторных клеток.
7. Ответственные за внедрение: старший научный сотрудник, к.м.н Кочегура Т.Н.

Руководитель
отдела лабораторной диагностики
МНОЦ ФГБОУ ВО "Московский государственный
университет имени М.В. Ломоносова",
к.м.н., доцент



Лариса Михайловна Самоходская

Подпись Самоходской Л.М. удостоверяю. Начальник

"УТВЕРЖДАЮ"

Проректор - начальник Управления
научной политики и организации
научных исследований
федерального государственного
бюджетного образовательного
учреждения высшего образования
"Московский государственный
университет имени М.В. Ломоносова"



Федянин
профессор Федянин Андрей Анатольевич

"9" февраля 2017 г.

Акт о внедрении в лабораторную практику

1. Наименование предложения для внедрения "Клиническое значение циркулирующих молекулярных факторов для пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями и сопутствующими метаболическими нарушениями".
2. Кем и когда предложено: старший научный сотрудник, к.м.н. медицинского научно-образовательного центра ФГБОУ ВО "Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова", Кочегура Т.Н., 2014-2017 г.г.
3. Источники информации:
 - Циркулирующий фактор роста гепатоцитов (HGF) у больных с хронической сердечной недостаточностью, сочетающейся с сахарным диабетом 2 типа и нарушением жирового обмена / Т.Н. Кочегура, П.И. Макаревич, А.Г. Овчинников [и др.] // Сахарный диабет. — 2013. — № 2. — С. 17-25.
 - Циркулирующие факторы, ассоциированные с метаболическими нарушениями у пациентов с постинфарктной сердечной недостаточностью / Т.Н. Кочегура, П.И. Макаревич, А.Г. Овчинников [и др.] // Сердечная недостаточность. — 2013. — Т. 14. — № 4(78). — С. 191-199.
4. Где и когда внедрено: Отдел лабораторной диагностики медицинского научно-образовательного центра ФГБОУ ВО "Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова", г. Москва, Ломоносовский пр-т, д 27., к.10.
5. Внедрено в лабораторную практику с 2014 г. как дополнительное исследование к стандартному протоколу обследования пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями и сопутствующими метаболическими нарушениями.
6. Эффективность внедрения: обоснован дифференцированный подход к лабораторному обследованию пациентов с заболеваниями сердечно-сосудистой системы и метаболическими нарушениями и дана научно-обоснованная оценка возможности диагностики тяжести сердечной недостаточности и исхода ишемической болезни в зависимости от концентрации циркулирующих ангиогенных факторов роста, адипоцитокинов, натрийуретических пептидов и эндотелина-1в периферической крови пациентов.
7. Ответственные за внедрение: старший научный сотрудник, к.м.н Кочегура Т.Н.

Руководитель
отдела лабораторной диагностики
медицинского научно-образовательного центра
ФГБОУ ВО "Московский государственный
университет имени М.В. Ломоносова",
к.м.н., доцент

Самохвалова
Лариса Михайловна Самохвалская



Подпись Самохваловой Л.М. Удостоверено. Нач. отд. Кочегура Т.Н.