

УДК 616.13-004.6:616.718:577.1

## МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ КЛЕТочНОЙ ЗАЩИТЫ В РЕКОНСТРУКТИВНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНОЙ ХИРУРГИИ МАГИСТРАЛЬНЫХ АРТЕРИЙ

*Р.Е. Калинин, А.С. Пшениников, И.А. Сучков*

Рязанский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова  
(390026, г. Рязань, ул. Высоковольная, 9)

**Ключевые слова:** оксид азота, белки теплового шока, фактор роста эндотелия сосудов, белки Bcl-2.

### MOLECULAR MECHANISMS OF CELLULAR PROTECTION IN RECONSTRUCTIVE-REGENERATIVE SURGERY OF THE MAIN ARTERIES

R.E. Kalinin, A.S. Pshennikov, I.A. Suchkov  
*Ryazan State Medical University named by academician I.P. Pavlov  
(9 Vysokovoltnaya St. Ryazan 390026 Russian Federation)*

**Background.** At the existing tendency to morbidity growth and increase of prevalence of risk factors of the obliterating atherosclerosis of the lower limbs the improving of conservative methods of treatment is more and more actual. As the important components of this direction are the correction of the endothelial dysfunction and stimulation of the neoangiogenesis.

**Methods.** 40 patients with acute and chronic ischemia of the lower limbs due to the obliterating atherosclerosis were examined. The stress-induced system indicators – nitrogen oxide, thermal shock proteins, endothelial factor of growth, Bcl-2 proteins – after reconstructive-regenerative surgeries on the main arteries and without them (control group) – were studied.

**Results.** The level of the thermal shock proteins and the nitrogen oxide metabolites in patients' blood after the surgical treatment has decreased. The pilot studying of neoangiogenesis markers has shown the significant change of the endothelial growth factor comparing with the control group.

**Conclusions.** The revealed authentic tendencies in change of stress-inducible system indicators prove their direct influence on the mechanisms of immediate and long-term adaptation to ischemic stress and reperfusion answer in the postoperative period.

**Keywords:** nitrogen oxide, thermal shock proteins, the growth factor of the vessels endothelium, Bcl-2 proteins.

Pacific Medical Journal, 2014, No. 3, p. 52–55.

Методом выбора для лечения пациентов с облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей (ОААНК) является хирургическая реваскуляризация, но она применима лишь у порядка 60 % пациентов и к тому же не дает полной гарантии излечения: лишь в 40–90 % случаев пациенту не требуется дополнительного (либо повторного) хирургического вмешательства в течение последующего года жизни [6, 12]. Во всех случаях, когда нет возможности достигнуть адекватной компенсации кровообращения реконструктивными операциями, с целью улучшения кровообращения возможно использование консервативных методов. Консервативная терапия необходима на всех стадиях ОААНК, она используется вне зависимости от вида лечения и назначается пожизненно [6, 12]. При существующей тенденции к росту заболеваемости и повышению распространенности факторов риска ОААНК все

более актуальным становится совершенствование консервативных методов лечения пациентов. Как важные составляющие этого направления рассматриваются коррекция эндотелиальной дисфункции и стимуляция неоангиогенеза [1, 3, 8]. Однако исследования данных разделов фармакотерапии и их сопряжений единичны и обладают низким доказательным уровнем.

Большое значение в развитии эндотелиальной дисфункции отводится блокаде физиологических путей образования оксида азота. Суммарная оценка нитратов и нитритов – общепринятый метод оценки общего синтеза этого соединения в биологических средах [2, 5]. Поскольку оксид азота является «короткоживущей» молекулой, многие его защитные свойства связаны не только с прямым действием, но и с нитроксидактивируемыми эндогенными протекторными системами, в частности – с активацией синтеза стресс-белков теплового шока – Heat Shock Proteins (HSP).

Система белков теплового шока играет основную роль в феномене адаптационной стабилизации клеточных структур, в реализации реакции ишемического стресса. Эта система представляет собой важное звено клеточной системы репарации, действие которой направлено на защиту синтеза и структурной целостности поврежденной клетки. Защитное действие HSP реализуется через их способность диссоциировать аномальные белок-белковые агрегаты, облегчать ренатурацию денатурированных белков, ограничивать продукцию оксида азота и препятствовать передаче апоптотического сигнала с экстраклеточных рецепторов и митохондрий. В исследовании цитопротективной роли HSP в процессе повреждения сердечно-сосудистой системы наиболее ранние работы принадлежат R.W. Currie (1990). Были получены данные, свидетельствующие об увеличении синтеза HSP массой 70 кДа при ишемическом повреждении [10].

Недостаток сыворотки стимулирует сильную экспрессию HSP70, совпадающую с исчезновением маркеров апоптоза. Стимуляция в культуре сывороткой приводит к гиперплазии, апоптозу и ингибированию экспрессии этих белков. Понижающая регуляция HSP70 разрешает апоптоз и ремоделирование сосудистой стенки [9].

Следующий «долгосрочный» путь адаптации тканей к ишемии – это неоангиогенез, активность которого во многом определяется эндотелиальным фактором роста – Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF).

Калинин Роман Евгеньевич – д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой ангиологии, сосудистой, оперативной хирургии и топографической анатомии РязГМУ; e-mail: kalinin-re@ya.ru

VEGF избирательно стимулирует пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток, их предшественников и моноцитов, экспрессирующих рецепторы к нему, увеличивает сосудистую проницаемость, способствуя пропотеванию белков плазмы в околососудистое пространство (что необходимо для миграции эндотелиоцитов). Он индуцирует экспрессию эндотелиальной нитроксидсинтазы и образование оксида азота, что способствует вазодилатации, и стимулирует экспрессию протеаз, разрушающих связи между эндотелием и внеклеточным матриксом. Это необходимо для направленной миграции клеток. VEGF также стимулирует экспрессию антиапоптотических белков Bcl-2 в сосудистом эндотелии [13]. Белки Bcl-2 принадлежат к постоянно увеличивающемуся семейству регулирующих апоптоз генных производных, которые могут быть как антагонистами, так и агонистами клеточной смерти. Доказано, что эти белки блокируют апоптоз, не вызывая при том клеточной пролиферации. Однако механизмы, участвующие в контроле факторов роста над стимуляцией или угнетением пролиферации эндотелиальных клеток, до сих пор плохо описаны. Таким образом, эти белки являются новым целевым направлением воздействия VEGF.

Процесс адаптации тканей к ишемии при ОААНК – сложный, многокомпонентный, включающий клеточный (тканый) механизм, способ формирования коллатерального русла (неоангиогенез), во многом зависящий от функционального состояния эндотелия сосудов и выраженности эндотелиальной дисфункции, а также от степени ишемии. Сопряженное изучение всех этих процессов, возможно, позволит по-новому взглянуть на адаптационные резервы при острой и хронической артериальной недостаточности.

**Материал и методы.** По дизайну исследование открытое, рандомизированное, проспективное, в параллельных группах включало в себя 40 пациентов: 36 мужчин и 4 женщины, средний возраст 63,8 года. В зависимости от степени ишемии нижних конечностей (по классификации Fontaine) и оперативной тактики все пациенты с ОААНК разделены на четыре группы:

1-я группа – 10 пациентов с ишемией IIб–III ст. (бифуркационное аорто-бедренное шунтирование – 5, бедренно-подколенное шунтирование/протезирование – 3, тромбэктомия из общей и поверхностной бедренных артерий – 2 наблюдения);

2-я группа – 10 пациентов с ишемией IV ст. (бифуркационное аорто-бедренное шунтирование – 4, бедренно-подколенное шунтирование/протезирование – 4, аутовенозный шунт *in situ* – 2 наблюдения);

3-я группа – 10 пациентов, которым в экстренном порядке проведены тромбэмболэктомии при кардиогенной неклапанной эмболии артерий нижних конечностей;

4-я группа (контрольная) – 10 пациентов со IIб ст. ишемии, которым оперативное лечение не проводили ввиду неудовлетворительного состояния периферического русла либо отказа от операции.

Группы были сопоставимы по клинико-лабораторным параметрам. Из сопутствующих заболеваний в группах наблюдения примерно с одинаковой частотой диагностировались ишемическая болезнь сердца (47,5%), гипертоническая болезнь (75%) и хронический бронхит (45%).

Абсолютный критерий включения пациентов в исследование – одномоментная хирургическая коррекция магистрального русла, с компенсацией кровообращения в раннем послеоперационном периоде. Повторных госпитализаций в течение трех месяцев вследствие тромбоза шунта либо прогрессирования заболевания не зарегистрировано. Все пациенты получали традиционную консервативную терапию, согласно «Национальным рекомендациям по ведению пациентов с заболеваниями артерий нижних конечностей» (Москва, 2013), пациенты 3-й группы – антикоагулянтную терапию по шкале CHA<sub>2</sub>DS<sub>2</sub>-VASc.

В крови путем иммуноферментного анализа определяли содержание HSP70, оксида азота, VEGF и Bcl-2 (анализаторы EKS 715, BMS 244, KHG 0111, реактив Грисса). Уровни HSP70 и оксида азота оценивали до оперативного вмешательства и после него: через 1, 2, 10 суток, 1, 3 месяца (в контроле – в те же сроки после госпитализации). Концентрации VEGF и Bcl-2 определяли исходно и через 3 месяца.

Статистическая обработка данных осуществлялась посредством вычисления средней арифметической и ее ошибки. Определение различий между двумя независимыми выборками проводили по U-критерию Вилкоксона–Манна–Уитни. Наличие связи между явлениями устанавливали с помощью коэффициента ранговой корреляции Спирмена ( $r_s$ ).

**Результаты исследования.** Исходный уровень HSP70 в 1–3-й группах статистически значимо отличался от контрольного. Динамика изменения показателя после операции оказалась сходной во всех группах: прирост к 1-м суткам и тенденция к равномерному снижению в последующем. К 10-м суткам уровень HSP70 был ниже исходного во всех наблюдениях после оперативного лечения. В 4-й группе статистически значимых изменений в динамике не выявлено (табл. 1).

Таблица 1  
Динамика концентраций HSP70 в крови при ОААНК (M±m)

Группа	Уровень HSP70, нг/мл*					
	исходно	через 1 сут.	через 2 сут.	через 10 сут.	через 1 мес.	через 3 мес.
1-я	0,79±0,06	1,13±0,05	0,80±0,08	0,77±0,07	0,55±0,06	0,42±0,03
2-я	0,65±0,04	0,98±0,06	0,88±0,07	0,39±0,05	0,42±0,05	0,43±0,02
3-я	1,12±0,14	1,21±0,09	0,90±0,18	0,82±0,09	0,80±0,08	0,38±0,03
4-я	0,58±0,06	0,61±0,07	0,60±0,05	0,59±0,05	0,67±0,05	0,48±0,06

\* Разница с контролем во все сроки наблюдения статистически значима.

Анализируя тенденцию изменений концентраций HSP70, надо отметить, что тренды изучаемых групп представляли собой параллельные линии с исходного уровня до 1-го месяца после операции, а уже к 3-му месяцу показатели приближаются к исходным значениям (рис. 1).

Другая тенденция прослеживалась в изменении уровней оксида азота, которые снижались после оперативного лечения и оставались стабильными в контроле (табл. 2, рис. 2). Парадоксальный результат был получен у 2 пациентов 2-й группы, которым выполнялось аутовенозное шунтирование *in situ*. Повышение уровня оксида азота на 12 % было отмечено на 1-е сутки: прирост составил от 33,4 до 43,8 мкм/мл, что превышало 30 %.

Пилотное изучение маркеров неангиогенеза VEGF и Vcl-2 показало значимое различие с контролем для 2-й и 3-й групп по содержанию в крови эндотелиального фактора роста (табл. 3).

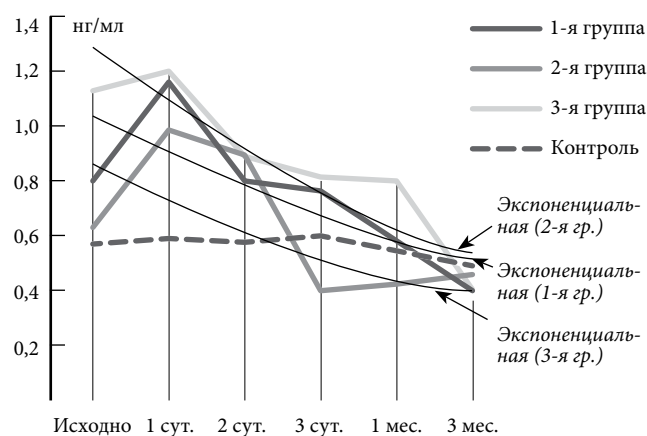


Рис. 1. Диаграмма концентраций HSP70 в крови.

Динамика концентраций оксида азота в крови при ОААНК ( $M \pm m$ )

Группа	Уровень оксида азота, мкм/мл					
	исходно	через 1 сут.	через 2 сут.	через 10 сут.	через 1 мес.	через 3 мес.
1-я	67,0±1,1*	63,1±1,0*	63,8±2,2*	59,3±1,1	62,2±2,5*	55,2±1,1
2-я	61,7±2,3*	67,2±3,0	56,6±1,7*	52,3±1,0	59,1±1,5	57,4±2,2
3-я	69,5±1,1*	49,5±2,2*	56,4±2,1*	54,7±1,9	54,7±1,7	55,6±2,0
4-я	56,0±2,4	53,9±1,3	52,5±1,5	55,4±2,0	53,8±2,0	59,6±2,0

\* Разница с контролем статистически значима.

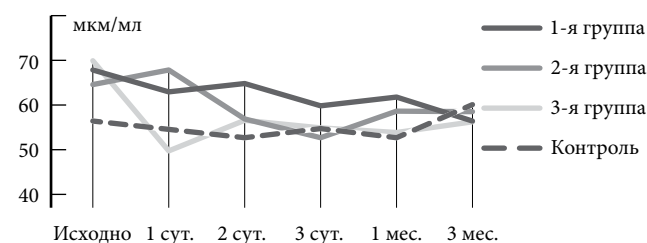


Рис. 2. Диаграмма концентраций оксида азота в крови.

**Обсуждение полученных данных.** Реакция клеточной адаптации на острую ишемию превосходила таковую при хронической ишемии, что подтверждается статистически достоверным превосходством гиперпродукции HSP70 в 3-й группе уже с момента

Таблица 3

Динамика концентраций VEGF и Vcl-2 в крови при ОААНК ( $M \pm m$ )

Группа	Уровень VEGF, пк/мл		Уровень Vcl-2, нг/мл	
	исходно	через 3 мес.	исходно	через 3 мес.
1-я	142,4±3,3	129,5±4,4	4,9±0,3	7,1±0,4
2-я	128,6±3,3*	127,4±2,2*	6,9±0,3	8,5±0,1
3-я	120,8±4,1*	133,3±3,9*	5,5±0,2	6,1±0,9
4-я	144,1±3,4	124,6±4,2	7,2±0,2	4,9±0,2

\* Разница с контролем статистически значима.

госпитализации. Сниженная секреция HSP70 у пациентов с IV стадией заболевания, возможно, предполагает истощение адаптационных клеточных резервов и, как следствие, некротические изменения дистальных отделов конечностей, определяя сильную корреляционную связь между количеством HSP70 и устойчивостью ткани к повреждению.

У 80 % пациентов хирургических групп реперфузионный ответ был направлен на повышение образования HSP70. Вместе с тем клиническое подтверждение реперфузионного и постишемического синдромов, носивших только местный характер, выявлено лишь в 30 % наблюдений. Восстановление механизмов клеточной адаптации к ишемическому и реперфузионному стрессу происходило к 3-му месяцу после реконструктивно-восстановительных операций на магистральных артериях, приближаясь к равномерному значению во всех операционных группах и группе контроля.

Изменения метаболизма оксида азота на фоне оперативного лечения нельзя считать однозначным. Заметное снижение уровней метаболитов этого соединения в 1-й и 3-й группах, очевидно, связано с интрооперационной травмой эндотелия магистральной артерии. Необратимое повреждение эндотелия приводит к нарушению его функции и, как следствие, усугублению эндотелиальной дисфункции, которая прослеживалась в течение 3-месячного послеоперационного периода.

Парадоксальный ответ у 2 пациентов 2-й группы после аутовенозного шунтирования – повышение уровня оксида азота в крови более чем на 30 %, – возможен, обусловлен особенностями строения эндотелиоцитов венозной системы и их функционированием в условиях артериального кровотока. Представленные изменения нельзя назвать системными, а динамику внутри группы статистически достоверной. У остальных пациентов этой группы реакция на операционную травму была сопоставимой с представителями других групп (незначительное снижение на 1-е сутки).

Низкий уровень VEGF определялся у лиц с критической ишемией во 2-й группе до операции и через 3 месяца после нее, что характеризовало усиление катаболических процессов на фоне депрессии ангиогенеза [11]. Подобные изменения носили стойкий,

часто необратимый характер. Они свидетельствовали об угнетении микроциркуляции, что можно объединить понятием «микроциркуляторная дисфункция». Микроциркуляторная дисфункция с ее яркими морфофункциональными изменениями при хронической ишемии, вызванной ОААНК, наряду с изменением концентрации VEGF и нарушением функционального состояния эндотелия, является важным показателем тяжести поражения. На это указывала и тесная корреляционная связь между концентрациями VEGF и NO ( $r_s=0,69$ ) и VEGF и HSP70 ( $r_s=0,74$ ) во 2-й группе.

В 1-й, 2-й и 4-й группах отмечена тенденция к снижению уровня VEGF к 3-му месяцу (на 9,1 и 13,6%, соответственно), что может свидетельствовать в пользу угнетения гуморальных факторов регуляции неоангиогенеза на фоне компенсации кровообращения (после артериальной реконструкции либо консервативной терапии) – проявление «отрицательной обратной связи».

Наиболее низкая концентрация VEGF выявлена у лиц с острой ишемией (3-я группа). Выступая в роли «долгосрочного» механизма адаптации, этот фактор не успевал реагировать в короткие сроки (за 12–16 часов до восстановления кровотока). Однако через три месяца наблюдения в данной группе показатель достоверно превосходил исходный уровень и уровень у всех пациентов с хронической ишемией, несмотря на удовлетворительный операционный результат. По шкале  $CHA_2DS_2-VASc$ , пациентам 3-й группы был присвоен высокий риск повторного тромбоэмболизма (4–6 баллов), что послужило основанием для назначения антикоагулянтов, являющихся косвенными ингибиторами ангиогенеза [4, 7]. Гиперпродукция VEGF здесь, возможно, была направлена на обратную активацию процессов ангиогенеза.

Однозначное «поведение» белков Bcl-2 отмечено у пациентов с острой и хронической ишемией. Повышение их уровня на 44,8, 23,2 и 10,9% отмечено, соответственно, в 1–3-й группах, что не зарегистрировано в контроле. Сильная связь выявлена между показателями Bcl-2 и VEGF у лиц с хронической ишемией (1-я и 2-я группы:  $r_s=-0,78$  и  $r_s=-0,61$ ). Таким образом, Bcl-2 можно считать новым целевым направлением воздействия VEGF: блокада апоптоза эндотелия (ответ на операционную травму эндотелия) без клеточной пролиферации и миоинтимальной гиперплазии.

#### Заключение

Прогресс медицины неразрывно связан с научными достижениями в области молекулярной биологии. Стресс-индуцибельные системы оксида азота и HSP формируют своеобразный щит, своевременно ограничивая действие повреждающих факторов (ишемия, реперфузия). Вектор формирования долгосрочной адаптации у пациентов с хронической ишемией нижних конечностей после реконструктивно-восстановительных вмешательств на магистральных артериях направлен на стимуляцию процессов ангиогенеза, во многом определяемых VEGF, и профилактику миоинтимальной гиперплазии в зоне анастомоза (экспрессия Bcl-2).

Проблема изучения регуляции синтеза представленных метаболитов очень быстро из фундаментальной, академической сферы перешла в область теоретической и практической медицины. В целом стратегия, направленная на использование препаратов, влияющих на их содержание, является чрезвычайно многообещающей и активно разрабатывается в современной клинике.

*Исследование выполнено в рамках работы над грантом Президента РФ МК-1878.2014.7.*

#### References:

1. Kalinin R.E. Comprehensive assessment of endothelium functional condition in patients with arteriosclerosis obliterans of lower limb in different methods of surgical treatment: thesis, MD. Ryazan, 2008. P. 250.
2. Kalinin R.E., Zvyagina V.I., Pshennikov A.S. [et al.]. Photocolometric method of nitrogen oxide metabolites level detection in blood plasma // Astrakhan Medical. 2010. Vol. 5, No. 1. P. 188–189.
3. Kirichuk V.F., Glybochko P.V., Ponomareva A.I. Endothelium dysfunction. Saratov: Publishing house of Saratov Medical University, 2008. P. 129.
4. Clinical angiology: guidance in 2 vol. / edited by A.V. Pokrovskiy. M.: Medicine, 2004.
5. Metelskaya V.P., Chumanova N.G. Screening - a method of nitrogen oxide metabolites level detection in blood plasma // Clinical laboratory diagnostics. 2005. No. 6. P. 15–18.
6. National suggestions on case management of patients with diseases of lower limb arteries. M., 2013. P. 74.
7. Paltsev M.A., Ivanov A.A., Severin S.E. // Intercellular correlation. M.: Medicine, 2003. P. 288.
8. Pshennikov A.S. Endothelium active therapy in a combined treatment of arteriosclerosis obliterans of lower limb: thesis, PhD. Ryazan, 2012. P. 142.
9. Alcocer F., Whitley D., Salazar J. [et al.] Mutual exclusion of apoptosis and hsp70 in human vein intimal hyperplasia in vitro // J. Surg. Res. 2001. Vol. 96, No. 1. P. 75–80.
10. Currie R.W., Ross B.M., Davis T.A. Induction of the heat shock response in rats modulates heart rate, creatine kinase and protein synthesis after a subsequent hyperthermic treatment // Cardiovasc. Res. 1990. Vol. 24, No. 2. P. 87–93.
11. Fraisl P., Mazzone M., Schmidt T. [et al.] Regulation of angiogenesis by oxygen and metabolism // Dev. Cell. 2009. Vol. 16, No. 2. P. 167–179.
12. The Trans-Atlantic Inter-Society Consensus // Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg. 2007. Vol. 33 (Suppl. 1).
13. Zhang Y., Yang H., Barnie P.A. [et al.] The expression of Toll-like receptor 8 and its relationship with VEGF and Bcl-2 in cervical cancer // Int. J. Med. Sci. 2014. Vol. 11, No. 6. P. 608–613.

*Поступила в редакцию 22.07.2014.*

#### Молекулярные механизмы клеточной защиты в реконструктивно-восстановительной хирургии магистральных артерий

Р.Е.Калинин, А.С. Пшенников, И.А.Сучков

*Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова (390026, г. Рязань, ул. Высоковольтная, 9)*

**Резюме.** Проведено изучение показателей стресс-индуцибельной системы – оксида азота, белков теплового шока, эндотелиального фактора роста, белков Bcl-2 – у пациентов после реконструктивно-восстановительных операций на магистральных артериях на фоне острой и хронической ишемии нижних конечностей. Выявленные достоверные тенденции в изменении изучаемых показателей доказывают их непосредственное влияние на механизмы немедленной и долгосрочной адаптации к ишемическому стрессу и реперфузионному ответу в послеоперационном периоде.

**Ключевые слова:** оксид азота, белки теплового шока, фактор роста эндотелия сосудов, белки Bcl-2.