

ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРОВ АНГИОТЕНЗИНПРЕВРАЩАЮЩЕГО ФЕРМЕНТА И БЕТА-АДРЕНОБЛОКАТОРОВ НА МЕХАНИЗМЫ РАЗВИТИЯ АПОПТОЗА ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

Л.Б. Ушкварок

Институт терапии им. А.Т. Малой АМН Украины, Харьков

Ключевые слова: хроническая сердечная недостаточность, эналаприл, «Метопролол», апоптоз, фактор некроза опухоли α , p53 и sCD95.

Важную роль в развитии и гомеостазе мультиклеточных организмов играет сбалансированный апоптоз [37]. Программируемая клеточная смерть является компонентом как нормального развития организма, так и различных патологических состояний [21]. Когда апоптотическая активность превышает физиологический лимит, она определяет и/или способствует патологическим состояниям, которые характеризуются потерей клеток и нарушением органной функции [23].

Апоптоз является стойким и важным маркером при многих формах кардиоваскулярных заболеваний. Как показало ультраструктурное исследование, апоптоз выявляется в кардиомиоцитах, фибробластах, эндотелиальных и гладкомышечных клетках сосудов при кардиоваскулярной патологии различной этиологии [22, 28].

Наряду с нейрогормонами важную роль в патогенезе хронической сердечной недостаточности (ХСН) играют провоспалительные цитокины и проапоптотические факторы [3, 7, 11, 17].

Ремоделирование миокарда с развитием гипертрофии, потерей кардиомиоцитов (апоптоз) и развитием интерстициального фиброза приводит к систолической и диастолической дисфункции левого желудочка [9, 22].

Последовательность действий провоспалительных цитокинов при ХСН состоит по крайней мере из четырех ключевых этапов: 1) отрицательное инотропное действие; 2) ремоделирование сердца (необратимая дилатация полостей и гипертрофия кардиомиоцитов); 3) нарушение эндотелийзависимой дилатации артериол; 4) усиление процесса апоптоза кардиомиоцитов и клеток периферической мускулатуры [8].

Независимым предиктором неблагоприятного прогноза больных с ХСН является фактор некроза опухо-

ли α (ФНО- α) [15, 33, 38, 39]. Его считают ответственным за индукцию апоптоза кардиомиоцитов [1, 2].

К представителям суперсемейства факторов некроза опухоли относится CD95 (APO-1/Fas). Он индуцирует апоптоз в различных органах и тканях, в том числе в кардиомиоцитах и клетках эндотелия [24, 32, 37]. CD95 наряду с индукцией апоптоза играет важную роль в стимуляции клеточной пролиферации и может служить маркером позитивной активации и гиперактивации клеток [12], что предполагает его участие в ремоделировании сердца.

Ген p53 был первым идентифицированным тумор-подавляющим геном, который инактивируется при многих канцерогенных заболеваниях человека. Белок p53 предупреждает распространение стрессированных клеток или инициирует их переход к программируемой клеточной смерти (апоптоз). Стрессовые факторы, активирующие p53, разнообразны — от ДНК повреждения до оксидативного стресса и гипоксии [41].

При таких патологических состояниях, как сердечная недостаточность и инфаркт миокарда, клеточная смерть далеко не всегда осуществляется по типично апоптотическому пути. Остается не до конца исследованным, как именно она происходит — апоптоз, некроз или неописанные механизмы комбинированных аспектов обоих типов клеточной смерти [20].

Клиническое применение ингибиторов каспаз может оказаться потенциальной терапевтической стратегией, влияющей на начало и прогрессирование желудочковой дисфункции в терминальную стадию СН [23].

В целом ряде исследований показано положительное влияние β -адреноблокаторов, ингибиторов АПФ и антагонистов рецепторов ангиотензина II на процессы апоптоза в миокарде [2, 5, 14].

Сегодня можно говорить о системном характере антицитокинового эффекта ингибиторов АПФ [11, 19, 27]. Однако влияние комбинации ингибиторов АПФ и β -адреноблокаторов на проапоптотические факторы на разных этапах развития и прогрессирования ХСН остается малоизученным.

Цель исследования — изучить влияние эналаприла в комбинации с «Метопрололом» на ФНО- α , p53 и sCD95 у больных с хронической сердечной недостаточностью.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Было обследовано 48 больных с ХСН I—II Б стадии II—IV функционального класса (ФК) по критериям Нью-Йоркской ассоциации кардиологов (NYHA) в возрасте от 38 до 72 лет. У всех больных ХСН была обусловлена хроническими формами ишемической болезни сердца (ИБС) (диффузным или постинфарктным кардиосклерозом), а у 26 из них — в сочетании с артериальной гипертензией (АГ). Функциональный класс ХСН был диагностирован на основе данных клинического обследования и теста 6-минутной ходьбы. Сердечная недостаточность II ФК зафиксирована у 21 больного, III ФК — у 18 и IV ФК — у 9 больных. Все больные получали эналаприл в суточной дозе 10—20 мг и «Метопролол» в суточной дозе 25—100 мг. Контрольную группу составили 25 сопоставимых по полу и возрасту практически здоровых лиц без признаков патологии сердечно-сосудистой системы.

Количественное определение уровней ФНО- α , p53 и sCD95 в сыворотке крови проводили с использованием твердофазного иммуноферментного метода при помощи набора реагентов ProCon TNF α (производства «Протеиновый контур», Россия), p53 ELISA KIT и sCD95 (APO1/Fas) ELISA KIT (производства «Diaclone research», Франция) на иммуноферментном анализаторе Stat Fax-303 Plus.

Полученные результаты обработаны методом вариационной статистики с использованием критерия Стьюдента. Значимыми считали различия при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

У больных с ХСН отмечалось повышение уровней ФНО- α , p53 и sCD95 (табл. 1). Так, уровни исс-

ледуемых показателей у больных III—IV ФК превышали таковые у больных II ФК ($P < 0,01$) и контрольной группы ($P < 0,001$). Следует отметить, что у больных II ФК уровни ФНО- α и sCD95 имели лишь тенденцию к повышению по сравнению с контрольной группой ($P > 0,05$), тогда как уровни p53 были достоверно выше ($P < 0,05$).

Была выявлена сильная положительная корреляционная взаимосвязь между изучаемыми показателями ($P < 0,05$). Так, для p53 и sCD95 $r = 0,83$, для p53 и ФНО- α $r = 0,85$, для sCD95 и ФНО- α $r = 0,72$.

В 1990 г. В. Levine и соавт. [26] впервые показали, что уровень ФНО- α в сыворотке больных с тяжелой сердечной недостаточностью (III—IV ФК NYHA) на порядок выше, чем у здоровых лиц. Причем повышение активности ФНО- α было более выраженным у пациентов с более тяжелыми клиническими проявлениями декомпенсации, большей степенью кахексии (массой тела 82% от идеальной) и повышенной активностью ренин-ангиотензин-альдостероновой системы.

В дальнейшем в целом ряде исследований была показана тесная корреляционная связь уровня ФНО- α с тяжестью клинических проявлений [1, 16] и активностью нейрогуморального фона больных с ХСН [29, 34].

При проведении анализа зависимости изучаемых показателей от наличия АГ была выявлена тенденция к повышению уровней ФНО- α , p53 и sCD95 у больных с сочетанием АГ и ХСН по сравнению с больными с ХСН с нормальным давлением, что предполагает участие ФНО- α , p53 и sCD95 в ремоделировании миокарда при АГ [9, 12, 22] ($P > 0,05$).

При изучении зависимости показателей ФНО- α , p53 и sCD95 от формы ИБС было показано, что у больных с постинфарктным кардиосклерозом уровни ФНО- α , p53 и sCD95 были достоверно выше, чем у больных с диффузным кардиосклерозом, а у последних изучаемые показатели превышали таковые в контрольной группе ($P < 0,05$; табл. 2).

Перенесенный инфаркт миокарда вызывает резкую активацию индукторов апоптоза [4, 23], который в дальнейшем прогрессирует в постинфарктном периоде и принимает активное участие в развитии ишемической кардиомиопатии и желудочковой дилатации [23].

Таблица 1. Динамика уровней ФНО- α , p53 и sCD95 у больных с ХСН под влиянием эналаприла в комбинации с «Метопрололом»

Показатель	ФК	До лечения	После лечения	Контроль
ФНО- α , пкг/мл	II	142,3 \pm 43,4	84,6 \pm 21,2	52,8 \pm 17,2
	III—IV	696,7 \pm 152,8	290,8 \pm 82,3*	
p53, ЕД/мл	II	3,61 \pm 0,45	2,86 \pm 0,81	2,45 \pm 0,19
	III—IV	8,53 \pm 1,22	4,28 \pm 1,24*	
sCD95, пкг/мл	II	132,6 \pm 47,6	115,2 \pm 32,8	67,8 \pm 12,3
	III—IV	396,5 \pm 38,4	248,4 \pm 54,6*	

Примечание: * $P < 0,05$ по сравнению с показателями до лечения.

Таким образом, апоптоз клеток сердца является универсальным механизмом ремоделирования миокарда и прогрессирования сердечной недостаточности [5].

Большой объем экспериментальных данных подтверждает наличие апоптоза в сердце при сердечной недостаточности. Экспозиция цитотоксических цитокинов и повреждающих агентов вызывает апоптоз во многих типах клеток. Цитотоксические цитокины, такие как ФНО- α и FasL, связываясь со своими рецепторами, активируют каспазу-8, тогда как повреждающие агенты вызывают митохондриальное освобождение цитохрома C, который инициирует активацию каспазы-9. Каспаза-8 или каспаза-9 активирует каскад каспаз. Наличие протеина p53 является обязательным для апоптоза, индуцированного повреждающими агентами. Дисбаланс про- и антиапоптотических (семейство bcl-2) факторов вызывает активацию каспаз. Экспериментальные данные *in vivo* показали, что апоптоз не влияет, если контролируется активность ФНО- α , FasL, p53 или снижается уровень bcl-2. Исследования *in vitro* и *in vivo* показали, какое важное значение имеют митохондриальный путь и активация каспаз для клеточной смерти, выявляемой в сердце при ХСН. Оксиданты, чрезмерное образование оксида азота, ангиотензин II и катехоламины являются триггером апоптотической смерти в кардиомиоцитах. Элиминация этих индукторов уменьшает апоптоз и реверсирует потерю контрактильной функции во многих случаях, что свидетельствует о возможной фармакологической коррекции антиоксидантами, ингибиторами NO-синтетазы, ингибиторами АПФ, антагонистами рецепторов ангиотензина II и β -адреноблокаторами [14, 31].

В нашем исследовании в динамике терапии комбинацией эналаприла и «Метопролола» уровни ФНО- α , p53 и sCD95 достоверно ($P < 0,05$) снижались у больных III—IV ФК, тогда как у больных с ХСН II ФК изменения носили характер тенденции ($P > 0,05$).

Под влиянием терапии сила корреляционной взаимосвязи уровней ФНО- α , p53 и sCD95 незначительно уменьшилась. Так, для p53 и sCD95 $r = 0,64$, для p53 и ФНО- α $r = 0,74$, для sCD95 и ФНО- α $r = 0,68$ ($P < 0,05$).

Следует отметить, что динамика изменений уровня sCD95 под влиянием терапии имела отрицательную корреляционную взаимосвязь с частотой сердечных сокращений (ЧСС) до лечения ($r = -0,37$), тогда как динамика изменений содер-

жания p53 и ФНО- α имела отрицательную корреляционную взаимосвязь с уровнем диастолического АД до лечения. То есть, у больных с высокими исходными значениями ЧСС и диастолического АД снижение уровня проапоптотических факторов под влиянием эналаприла в комбинации с «Метопрололом» происходило гораздо медленнее, чем у больных с нормальными значениями ЧСС и диастолического АД.

Во многих клинических исследованиях была доказана высокая эффективность ингибиторов АПФ относительно влияния на частоту осложнений и смертность у больных с ХСН [6, 13, 30, 38]. В зависимости от степени выраженности ХСН, снижение смертности при лечении ингибиторами АПФ составляет 8—27%, а β -адреноблокаторами — 10—65% [30].

Ингибиторы АПФ обладают свойством не только блокировать активность ренин-ангиотензин-альдостероновой системы, но и оказывают сбалансированное нейромодулирующее действие [6].

Следует отметить, что одним из механизмов действия ингибиторов АПФ при ХСН является их способность воздействовать на синтез цитокинов [3]. Ингибиторы АПФ способны снижать уровень ФНО- α не только благодаря гемодинамической разгрузке миокарда и снижению диастолического стресса, но и вследствие подавления препаратом синтеза провоспалительных цитокинов как в кардиомиоцитах, так и в других источниках [27]. Антицитокиновый и антиапоптотический эффекты ингибиторов АПФ скорее всего опосредованы снижением синтеза ангиотензина II — нейрогормона, стимулирующего выработку ФНО- α [35] и p53 [40].

Тот факт, что гиперактивация симпатно-адреналовой системы приводит к дисфункции и гибели кардиомиоцитов (некроз, апоптоз) [10], предполагает, что наблюдаемое нами снижение уровней проапоптотических факторов в динамике лечения обусловлено применением не только ингибитора АПФ — эналаприла, но и β -адреноблокатора — «Метопролола».

Показано, что повышение уровня норадреналина способствует увеличению экспрессии ФНО- α [25], что также говорит об уместности применения β -адреноблокаторов как препаратов с антицитокиновой активностью.

В отдельных исследованиях [18] показано, что норадреналин индуцирует апоптоз в эндотелиальных клетках. Применение β -адреноблокаторов может быть полезным для предупреждения и управления норадреналинопосредованным апоптозом при ХСН.

Таблица 2. Зависимость уровней ФНО- α , p53 и sCD95 от формы ИБС у больных с ХСН

Показатель	Диффузный кардиосклероз	Постинфарктный кардиосклероз	Контроль
ФНО- α , пкг/мл	240,5 \pm 68,4	723,4 \pm 49,6***	52,8 \pm 17,2
p53, ЕД/мл	4,31 \pm 0,82	7,92 \pm 1,34*	2,45 \pm 0,19
sCD95, пкг/мл	178,8 \pm 43,2	420,5 \pm 52,4**	67,8 \pm 12,3

Примечание: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ и *** $P < 0,001$ по сравнению с группой «диффузный кардиосклероз».

25. Koller-Strametz J., Pacher R., Fery B. et al. Circulating tumor necrosis factor levels in chronic heart failure: relation to its soluble receptor II, interleukin-6 and neurohumoral variables // *J. Heart, Lung Transplant.*— 1998.— Vol. 17.— P. 356—362.
26. Levine B., Kalman J., Mayer L. et al. Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure // *N. Engl. J. Med.*— 1990.— Vol. 323.— P. 236—241.
27. Liu L., Zhao S.-P. The changes of circulating tumor necrosis factor levels in patients with congestive heart failure influenced by therapy // *Intern. J. Cardiol.*— 1999.— Vol. 69.— P. 77—82.
28. Lockshin R.A., Facey C.O., Zakeri Z. Cell death in the heart // *Cardiol. Clin.*— 2001.— Vol. 19, N 1.— P. 1—11.
29. MacGowan G., Mann D.L., Kormos R.L. et al. Circulating interleukin-6 in severe congestive heart failure // *Am. J. Cardiol.*— 1997.— Vol. 79.— P. 1128—1131.
30. McMurray J., Pfefer M. New therapeutic options in congestive heart failure // *Circulation.*— 2002.— Vol. 105.— P. 2099—2106.
31. Milhas D., Cu villier O., Therville N. et al. Caspase-10 triggers bid cleavage and caspase cascade activation in Fas-L-induced apoptosis // *J. Biol. Chem.*— 2005.— Vol. 280, N 20.— P. 19836—19842.
32. Peter M.E., Krammer P.H. The CD95 (APO-1/Fas) DISC and beyond // *Cell Death & Differentiation.*— 2003.— Vol. 10, N 1.— P. 26—35.
33. Rauchhaus M., Dohner W., Koloczek V. et al. Systemically measured cytokines are independently predictive for increased mortality in patients with chronic heart failure // *J. Am. Coll. Cardiol.*— 2000.— Vol. 35 (Suppl. A).— P. 1183.
34. Rauchhaus M., Koloczek V., Florea V. et al. The relationship between tumor necrosis factor- α and natriuretic peptides in patients with chronic heart failure // *Eur. J. Heart Failure.*— 1999.— Vol. 1 (Suppl).— P. 203.
35. Sadoshima J. Cytokine actions of angiotensin II // *Circ. Res.*— 2000.— Vol. 86.— P. 1187—1189.
36. Schultz D.R., Harrington W.J.Jr. Apoptosis: programmed cell death at a molecular level // *Semin Arthritis Rheum.*— 2003.— Vol. 32, N 6.— P. 345—369.
37. Smyth L.A., Brady H.J.M. cMet and Fas receptor interaction inhibits death-inducing signaling complex formation in endothelial cells // *Hypertension.*— 2005.— Vol. 46, N 1.— P. 100—106.
38. Torre-Amione G., Kapadia S., Benedict C. et al. Proinflammatory cytokine levels in patients with depressed left ventricular ejection fraction: a report from the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD) // *J. Am. Coll. Cardiol.*— 1996.— Vol. 27, N 5.— P. 1201—1206.
39. Von Haehling S., Jankowska E.A., Anker S.D. Tumour necrosis factor- α and the failing heart pathophysiology and therapeutic implications // *Basic Res. Cardiology.*— 2004.— Vol. 99, N 1.— P. 18—28.
40. Williams B. Angiotensin II and pathophysiology of cardiovascular remodeling // *Am. J. Cardiol.*— 2001.— Vol. 87.— P. 8A: 10C — 17C.
41. Yahagi N., Shimano H., Matsuzaka T. et al. P53 involvement in the pathogenesis of fatty liver disease // *J. Biol. Chem.*— 2004.— Vol. 279, Issue 20.— P. 20571—20575.

ВПЛИВ ІНГІБИТОРІВ АНГІОТЕНЗИНПЕРЕТВОРЮВАЛЬНОГО ФЕРМЕНТУ І БЕТА-АДРЕНОБЛОКАТОРІВ НА МЕХАНІЗМИ РОЗВИТКУ АПОПТОЗУ У РАЗІ ХРОНІЧНОЇ СЕРЦЕВОЇ НЕДОСТАТНОСТІ

Л.Б. Ушкварок

Було обстежено 48 хворих з хронічною серцевою недостатністю (ХСН) I—II Б стадії II—IV функціонального класу віком від 38 до 72 років. Усі хворі отримували еналаприл у добовій дозі 10—20 мг і «Метопролол» у добовій дозі 25—100 мг. Кількісні визначення рівнів ФНП- α , p53 і sCD95 у сироватці крові проводили з використанням твердофазного імуноферментного методу. Було показано, що ХСН характеризується підвищенням рівнів ФНП- α , p53 і sCD95, активність яких зростає в міру прогресування серцевої недостатності. Активація імунозапальних і проапоптотичних чинників у хворих з постінфарктним кардіосклерозом вірогідно перевищує таку в хворих з дифузним кардіосклерозом. Наявність артеріальної гіпертонії у хворих з ішемічною хворобою серця, що ускладнилася розвитком ХСН, сприяє додатковій імунозапальній і проапоптотичній активності. Застосування еналаприлу в комбінації з «Метопрололом» пригнічує розвиток апоптозу в хворих з ХСН.

INFLUENCE OF ANGIOTENSIN-CONVERTING ENZYME INHIBITORS AND BETA-ADRENOBLOCKERS ON MECHANISMS OF APOPTOSIS DEVELOPMENT IN CHRONIC HEART FAILURE

L.B. Ushkvarok

Purpose — to study influence of enalapril in combination with metoprolol on TNF- α , p53 and sCD95 in patients with chronic heart failure.

There were examined 48 patients with chronic heart failure (CHF) of I—II B stage II—IV functional class aged 38 to 72 years. All patients received enalapril in a daily dose of 10—20 mg and metoprolol in a daily dose of 25—100 mg. Quantitative determinations of TNF- α , p53 and sCD95 levels were conducted with use of solid phase immuno-enzyme assay.

It has been shown, that CHF is characterized by increase of TNF- α , p53 and sCD95 levels which activity accrues in process of progressing heart failure. Activation of immunoinflammation and proapoptotic factors at the patients with postinfarction cardiosclerosis authentically exceeds those at the patients with diffusion cardiosclerosis. Presence of arterial hypertension at the patients with ischemic heart disease which complicated by development of CHF promotes additional immunoinflammatory and proapoptotic activation. Application of enalapril in combination with metoprolol renders beneficial effect on mechanisms of development of apoptosis at the patients with CHF.