

Особенности экспрессии генов ферментов метаболизма церамидов в жировых депо различной локализации при сердечно-сосудистых заболеваниях

Груздева О. В.^{1,2}, Белик Е. В.¹, Дылева Ю. А.¹, Учасова Е. Г.¹, Понасенко А. В.¹, Кутихин А. Г.¹, Маркова В. Е.¹, Горбатовская Е. Е.¹, Фанаскова Е. В.¹, Иванов С. В.¹, Стасев А. Н.¹, Зинец М. Г.¹, Слесарева Т. А.¹, Барбараш О. Л.^{1,2}

Цель. Выявить особенности экспрессии генов ферментов сфингомиелиназного пути биосинтеза церамидов и ферментов деградации церамидов в жировых депо различной локализации у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями.

Материал и методы. Обследовано 38 пациентов: 20 — с ишемической болезнью сердца (ИБС) и 18 — с аортальным стенозом/недостаточностью. Биоптаты подкожной, эпикардиальной, периваскулярной жировой ткани (ЖТ) (ПЖТ, ЭЖТ, ПВЖТ, соответственно) получены во время операции. Экспрессия генов ферментов сфингомиелиназного пути синтеза (кислой и нейтральной сфингомиелиназы *SMPD1* и *SMPD3*) и деградации церамидов (кислой церамидазы *ASAH1*; сфингомиелинсинтазы 1 и 2 *SGMS1* и *SGMS2*) оценена при помощи количественной полимеразной цепной реакции. Анализ уровня соответствующих белков проведен с использованием иммуноблоттинга (вестерн-блоттинг). Статистическая обработка выполнена в программе GraphPad Prism 8 (GraphPad Software).

Результаты. При ИБС максимальная экспрессия *SMPD1* наблюдалась в подкожных и эпикардиальных адипоцитах. У лиц с приобретенными пороками сердца (ППС) уровень мРНК *SMPD1* в ПЖТ был выше, чем в ПВЖТ. Экспрессия гена *SMPD1* в ЭЖТ пациентов с ИБС была более выражена по сравнению с пациентами с ППС. ПВЖТ отличалась минимальной экспрессией *SMPD1* независимо от нозологии. Экспрессия *SMPD3* не имела тканевых особенностей в исследуемых группах, ген *SMPD1* был более экспрессирован в адипоцитах ЖТ сердца, чем *SMPD3*. Экспрессия *ASAH1* в ЭЖТ при ИБС была максимальной относительно ЖТ других локализаций. Лица с ППС характеризовались высокой экспрессией *ASAH1* независимо от локализации ЖТ, превышающей показатели больных с ИБС. При ИБС уровень *SGMS1* в ЭЖТ был выше, чем в ПЖТ и ПВЖТ, у пациентов ППС тканевых особенностей не выявлено. Генная экспрессия *SGMS1* в ЭЖТ пациентов с ИБС была выше, чем в группе пороков сердца. Экспрессия *SGMS2* значительно превышала *SGMS1* в обеих исследуемых группах и была максимальной в адипоцитах ПЖТ и ПВЖТ по сравнению с ЭЖТ в группе ИБС и в ПВЖТ в группе ППС. Коронарогенная патология характеризовалась более высоким уровнем мРНК *SGMS2* в ПЖТ и ЭЖТ. Уровень ферментов метаболизма церамидов в адипоцитах ЖТ пациентов соответствовал экспрессии их генов.

Заключение. При коронарогенной патологии ЖТ сердца (преимущественно эпикардиальной локализации) характеризуется не только повышенной экспрессией генов ферментов синтеза церамидов по сфингомиелиназному пути, но и активацией утилизации церамидов с образованием сфингозина. Наблюдаемые изменения могут способствовать аккумуляции церамидов и сфингомиелина, ассоциированных с атеросклеротическими процессами в ЖТ данной локализации.

Ключевые слова: церамиды, гены ферментов, сфингомиелиназа, кислая церамидаза, сфингомиелинсинтаза, жировая ткань, ишемическая болезнь сердца.

Отношения и деятельность. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-15-20007 "Церамидный профиль локальных жировых депо сердца: клинико-патогенетическое значение и терапевтический потенциал" <https://rscf.ru/project/22-15-20007/> и средств Министерства науки и высшего образования Кузбасса.

¹ФГБНУ Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний, Кемерово; ²ФГБОУ ВО КемГМУ Минздрава, Кемерово, Россия.

Груздева О. В. — д.м.н., доцент, профессор РАН, зав. лабораторией исследований гомеостаза отдела экспериментальной медицины, ORCID: 0000-0002-7780-829X, Белик Е. В.* — к.м.н., н.с. лаборатории исследований гомеостаза отдела экспериментальной медицины, ORCID: 0000-0003-3996-3325, Дылева Ю. А. — к.м.н., с.н.с. лаборатории исследований гомеостаза отдела экспериментальной медицины, ORCID: 0000-0002-6890-3287, Учасова Е. Г. — к.м.н., с.н.с. лаборатории исследований гомеостаза отдела экспериментальной медицины, ORCID: 0000-0003-4321-8977, Понасенко А. В. — к.м.н., зав. лабораторией геномной медицины отдела экспериментальной медицины, ORCID: 0000-0002-3002-2863, Кутихин А. Г. — д.м.н., зав. лабораторией молекулярной, трансляционной и цифровой медицины, ORCID: 0000-0001-8679-4857, Маркова В. Е. — м.н.с. лаборатории молекулярной, трансляционной и цифровой медицины, ORCID: 0000-0002-5959-1699, Горбатовская Е. Е. — лаборант-исследователь лаборатории исследований гомеостаза отдела экспериментальной медицины, ORCID: 0000-0002-0500-2449, Фанаскова Е. В. — к.м.н., зав. трансфизиологическим кабинетом, ORCID: 0000-0003-2705-3252, Иванов С. В. — д.м.н., в.н.с. лаборатории реконструктивной хирургии мультифокального атеросклероза, ORCID: 0000-0002-9070-5527, Стасев А. Н. — к.м.н., н.с. лаборатории пороков сердца, ORCID: 0000-0003-1341-204X, Зинец М. Г. — врач-кардиохирург отделения кардиохирургии, лаборатория рентгендоваскулярной и реконструктивной хирургии сердца и сосудов, ORCID: 0000-0002-4761-4080, Слесарева Т. А. — врач клинической лабораторной диагностики, ORCID: 0000-0003-0749-4093, Барбараш О. Л. — д.м.н., профессор, академик РАН, директор, ORCID: 0000-0002-4642-3610.

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author): sionina.ev@mail.ru

ЖТ — жировая ткань, ИБС — ишемическая болезнь сердца, ИМ — инфаркт миокарда, ЛНП — липопротеиды низкой плотности, ПВЖТ — периваскулярная жировая ткань, ПЖТ — подкожная жировая ткань, ППС — приобретенный порок сердца, ССЗ — сердечно-сосудистые заболевания, ЭЖТ — эпикардиальная жировая ткань, ЭПР — эндоплазматический ретикулум, SM — сфингомиелин, SMS — сфингомиелинсинтаза, SMase — сфингомиелиназа, aSMase — кислая сфингомиелиназа, TLR — Toll-like рецепторы, *ASAH1* — ген кислой церамидазы, *SMPD1* — ген кислой сфингомиелиназы, *SMPD3* — ген нейтральной сфингомиелиназы, *SGMS1* и *SGMS2* — ген сфингомиелинсинтазы 1 и 2.

Рукопись получена 03.03.2023

Рецензия получена 20.03.2023

Принята к публикации 31.03.2023



Для цитирования: Груздева О. В., Белик Е. В., Дылева Ю. А., Учасова Е. Г., Понасенко А. В., Кутихин А. Г., Маркова В. Е., Горбатовская Е. Е., Фанаскова Е. В., Иванов С. В., Стасев А. Н., Зинец М. Г., Слесарева Т. А., Барбараш О. Л. Особенности экспрессии генов ферментов метаболизма церамидов в жировых депо различной локализации при сердечно-сосудистых заболеваниях. *Российский кардиологический журнал*. 2023;28(4):5390. doi:10.15829/1560-4071-2023-5390. EDN KPZENV

Gene expression of ceramide metabolism enzymes in fat depots of different localization in cardiovascular diseases

Gruzdeva O. V.^{1,2}, Belik E. V.¹, Dyleva Yu. A.¹, Uchasova E. G.¹, Ponasenko A. V.¹, Kutikhin A. G.¹, Markova V. E.¹, Gorbatovskaya E. E.¹, Fanaskova E. V.¹, Ivanov S. V.¹, Stasev A. N.¹, Zinets M. G.¹, Slesareva T. A.¹, Barbarash O. L.^{1,2}

Aim. To assess gene expression of enzymes of the sphingomyelinase pathway of ceramide biosynthesis and degradation in fat depots of various localization in patients with cardiovascular diseases.

Material and methods. A total of 38 patients were examined: 20 with coronary artery disease (CAD) and 18 with aortic stenosis/insufficiency. Biopsies of subcutaneous, epicardial, perivascular adipose tissue (AT) (SAT, EAT, PVAT, respectively) were obtained during surgery. The gene expression of sphingomyelinase pathway enzymes (acid and neutral sphingomyelinase *SMPD1* and *SMPD3*) and the degradation of ceramides (acid ceramidase *ASAH1*; sphingomyelin synthase 1 and 2 *SGMS1* and *SGMS2*) was assessed using a quantitative polymerase chain reaction. Analysis of the level of corresponding proteins was carried out using immunoblotting (western blotting). Statistical processing was performed using GraphPad Prism 8 (GraphPad Software).

Results. In CAD, the maximum expression of *SMPD1* was observed in subcutaneous and epicardial adipocytes. In acquired heart defects (AHD), the level of *SMPD1* mRNA in the SAT was higher than in the PVAT. Expression of the *SMPD1* gene in the EAT of patients with CAD was more pronounced than in patients with heart defects. PVAT was characterized by minimal expression of *SMPD1* regardless of disease. Expression of *SMPD3* had no tissue features in studied groups, while *SMPD1* was more expressed in cardiac AT adipocytes than *SMPD3*. *ASAH1* in the EAT of patients with CAD was maximal relative to adipocytes of other localizations. Persons with AHD were characterized by a high expression of *ASAH1*, regardless of AT localization, exceeding the values of patients with CAD. In CAD, the level of *SGMS1* in EAT was higher than in SAT and PVAT, while no differences were found in patients with AHD depending on AT location. *SGMS1* gene expression in EAT of patients with CAD was higher than in the group of AHD. Expression of *SGMS2* significantly exceeded *SGMS1* in both study groups and was maximal in SAT and PVAT adipocytes compared to EAT in the CAD group and in PVAT in the AHD group. Coronary pathology was characterized by a higher level of *SGMS2* mRNA in SAT and EAT. The level of ceramide metabolism enzymes in AT of patients corresponded to the expression of their genes.

Conclusion. In coronarogenic disease, cardiac AT (mainly epicardial) is characterized not only by increased expression of gene ceramide synthesis enzymes via the sphingomyelinase pathway, but also by activation of ceramide utilization with sphingosine formation. The observed changes may contribute to the

accumulation of ceramides and sphingomyelin associated with atherosclerotic processes.

Keywords: ceramides, enzyme genes, sphingomyelinase, acid ceramidase, sphingomyelin synthase, adipose tissue, coronary artery disease.

Relationships and Activities. The study was supported by the grant of the Russian Science Foundation № 22-15-20007 "Ceramide profile of local heart fat depots: clinical and pathogenetic significance and therapeutic potential" <https://rscf.ru/project/22-15-20007/> and funds from the Ministry of Science and Higher Education of the Kuzbass.

¹Research Institute of Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo;

²Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russia.

Gruzdeva O. V. ORCID: 0000-0002-7780-829X, Belik E. V.* ORCID: 0000-0003-3996-3325, Dyleva Yu. A. ORCID: 0000-0002-6890-3287, Uchasova E. G. ORCID: 0000-0003-4321-8977, Ponasenko A. V. ORCID: 0000-0002-3002-2863, Kutikhin A. G. ORCID: 0000-0001-8679-4857, Markova V. E. ORCID: 0000-0002-5959-1699, Gorbatovskaya E. E. ORCID: 0000-0002-0500-2449, Fanaskova E. V. ORCID: 0000-0003-2705-3252, Ivanov S. V. ORCID: 0000-0002-9070-5527, Stasev A. N. ORCID: 0000-0003-1341-204X, Zinets M. G. ORCID: 0000-0002-4761-4080, Slesareva T. A. ORCID: 0000-0003-0749-4093, Barbarash O. L. ORCID: 0000-0002-4642-3610.

*Corresponding author: sionina.ev@mail.ru

Received: 03.03.2023 **Revision Received:** 20.03.2023 **Accepted:** 31.03.2023

For citation: Gruzdeva O. V., Belik E. V., Dyleva Yu. A., Uchasova E. G., Ponasenko A. V., Kutikhin A. G., Markova V. E., Gorbatovskaya E. E., Fanaskova E. V., Ivanov S. V., Stasev A. N., Zinets M. G., Slesareva T. A., Barbarash O. L. Gene expression of ceramide metabolism enzymes in fat depots of different localization in cardiovascular diseases. *Russian Journal of Cardiology*. 2023;28(4):5390. doi:10.15829/1560-4071-2023-5390. EDN KPZENB

Несмотря на проводимые профилактику и лечение, смертность от сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) остается высокой. Поэтому поиск новых диагностических подходов к оценке риска развития и прогрессирования ССЗ является актуальной задачей [1]. Появляется все больше данных о том, что церамиды играют важную роль в развитии атерогенных и неатерогенных заболеваний сердца [2].

Церамиды — это биоактивные липиды, которые не только являются структурными компонентами клеточных мембран, но и участвуют в передаче сигналов и в метаболизме, в реакциях на стресс, апоптозе, регулируют пролиферацию и гибель клеток, в т.ч. адипоцитов [3]. Считается, что накопление церамидов ассоциировано с неблагоприятными сердечно-сосудистыми событиями [4]. Ранее нами продемонстрировано, что коронарогенная патология жировой ткани (ЖТ) сердца характеризуется активацией синтеза церамидов *de novo*, преимущественно в эпикар-

диальной локализации, что может приводить к аккумуляции церамидов, потенцируя ряд патологических процессов, ассоциированных с атеросклерозом [5].

Известно, что церамиды в ЖТ могут образовываться не только *de novo*, но и из сфингомиелина (SM) [6]. Этот путь реализуется при помощи сфингомиелиназ (SMase) и является быстрым временным механизмом, за счет которого уровень церамидов в адипоцитах может резко повышаться в несколько раз [3, 7]. Провоспалительные цитокины, высокий уровень которых ассоциирован с атеросклерозом (фактор некроза опухоли- α , интерлейкин-1 β и интерферон- γ), стимулируют активность SMase, повышая концентрацию церамидов в клетках, что, вероятно, может быть реализовано и в адипоцитах ЖТ сердца и коронарных артерий. Ранее нами была показана высокая экспрессия провоспалительных адипоцитокинов в эпикардиальной ЖТ (ЭЖТ) [8]. Наряду с активацией воспаления в ЭЖТ нами было

Ключевые моменты

- Выявлены особенности экспрессии генов ферментов сфингомиелиназного пути биосинтеза керамидов и их деградации в жировых депо различной локализации у пациентов с ишемической болезнью сердца и приобретенными пороками сердца.
- При коронарогенной патологии наблюдается активация биосинтеза керамидов по сфингомиелиназному пути в адипоцитах преимущественно эпикардиальной локализации.
- Помимо повышенной экспрессии генов ферментов синтеза керамидов из сфингомиелина, жировая ткань сердца и сосудов пациентов с ишемической болезнью сердца характеризуется активацией генов ферментов утилизации керамидов с образованием сфингозина.
- Наблюдаемые изменения могут способствовать аккумуляции керамидов и сфингомиелина, ассоциированных с атеросклеротическими процессами в жировой ткани эпикардиальной локализации.

Key messages

- Gene expression of enzymes of the sphingomyelinase pathway of ceramide biosynthesis and their degradation in fat depots of various location in patients with coronary artery disease and acquired heart defects was assessed.
- In case of coronarogenic pathology, activation of ceramide biosynthesis via sphingomyelinase pathway in adipocytes of predominantly epicardial location is observed.
- In addition to increased expression of genes for ceramide synthesis enzymes from sphingomyelin, cardiac adipose tissue and blood vessels of patients with coronary artery disease is characterized by the activation of genes for ceramide utilization enzymes with sphingosine formation.
- The observed changes may contribute to the accumulation of ceramides and sphingomyelin associated with atherosclerotic processes in epicardial adipose tissue.

обнаружено и увеличение размеров жирового депо этой локализации у пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС), что на фоне дислипидемии может приводить к локальной гипоксии и активации факторов, индуцируемых гипоксией, таких как, например, HIFs. В свою очередь, HIF-1 α в адипоцитах повышает экспрессию SMase, активируя тем самым синтез керамидов из SM.

Содержание керамидов в адипоцитах зависит от соотношения скорости их образования и утилизации, что особенно важно для ЭЖТ и периваскулярной ЖТ (ПВЖТ), локализованных в непосредственной близости от очага поражения при ССЗ [9]. Показано, что ингибирование синтеза либо ускорение деградации керамидов приводит к снижению их уровня в клетках и тканях и улучшает течение атеросклероза [10]. Деградация керамидов на сфингозин и свободные жирные кислоты в аппарате Гольджи опосредуется ферментом церамидазой. Идентифицировано 5 различных церамидаз в соответствии с оптимальным рН для их каталитической активности: кислая (*ASAH1*, рН=4,5), нейтральная (*ASAH2*, рН=7,5), щелочная церамидаза 1 (*ACER1*, рН=8,5), щелочная церамидаза 2 (*ACER2*, рН=9,0) и щелочная церамидаза 3 (*ACER3*, рН=9,5). В сердце экспрессируется кислая церамидаза *ASAH1*, сверхэкспрессия которой снижает гибель кардиомиоцитов и обеспечивает кардиопротекцию [11].

Церамиды являются субстратом для фермента сфингомиелинсинтазы (SMS), имеющей несколько

изоформ. SMS1 отвечает за синтез SM в аппарате Гольджи (*SGMS1*), SMS2 локализован в плазматической мембране (*SGMS2*). В результате этой реакции образуется SM, содержание которого в стенке аорты и плазме ассоциировано с атеросклерозом. Стратегия снижения/нормализации уровня керамидов при инфаркте миокарда (ИМ), артериальной гипертензии и атеросклерозе привлекает все больше внимания исследователей [12].

В настоящее время данных об особенностях экспрессии генов ферментов метаболизма в ЖТ недостаточно, практически все они ограничены результатами экспериментальных работ на моделях грызунов [13]. В то же время изменение их активности в ЖТ сердечной локализации может вызывать избыточный синтез и накопление керамидов не только в ЖТ, но и в кардиомиоцитах. Аккумуляция керамидов способна индуцировать целый ряд патологических процессов, ассоциированных с атерогенезом. Поэтому целью исследования явилось выявление особенностей экспрессии генов ферментов сфингомиелиназного пути биосинтеза керамидов и ферментов деградации керамидов в жировых депо различной локализации у пациентов с ССЗ.

Материал и методы

В исследование включено 38 пациентов, подписавших добровольное информированное согласие на участие, среди которых было 20 пациентов с ИБС в возрасте до 75 лет (основная группа). Группу сравнения составили 18 пациентов с некоронарогенными патологиями сердца — дегенеративные неревмати-

Таблица 1

Праймеры, используемые для оценки генной экспрессии ферментов синтеза и деградации церамидов

| Ген | Направленность | Последовательность (5'→3') | Длина праймера |
|-------|----------------|----------------------------|----------------|
| SMPD1 | Forward primer | ccgctggctctatgaagcgat | 21 |
| | Reverse primer | cggggtatgggaaagagcat | 21 |
| SMPD3 | Forward primer | gaaggacaacaaggtcccagt | 21 |
| | Reverse primer | caactccggctgtcaatgg | 20 |
| ASAH1 | Forward primer | ctgaaccgcaccagccaaga | 20 |
| | Reverse primer | ggcagtcgccaggttaagt | 21 |
| SGMS1 | Forward primer | ccagtgaacgtgacgacag | 20 |
| | Reverse primer | agtccacactcctcagtcgct | 22 |
| SGMS2 | Forward primer | acttacctgtcctggaatgc | 22 |
| | Reverse primer | tcagtgtagcgttaaccgtg | 21 |

Сокращения: ASAH1 — ген кислой церамидазы, SGMS1 — ген сфингомиелинсинтазы 1, SGMS2 — ген сфингомиелинсинтазы 2, SMPD1 — ген кислой сфингомиелиназы, SMPD3 — ген нейтральной сфингомиелиназы.

ческие приобретенные пороки сердца (ППС) (аортальный стеноз/недостаточность) и показаниями для проведения открытой операции на клапанах сердца, сопоставимых по полу и возрасту с основной группой. Все пациенты имели показания для проведения открытого вмешательства на сердце — прямой реваскуляризации миокарда методом коронарного шунтирования или операции на клапанах сердца. В исследование не включали пациентов старше 75 лет, с наличием клинически значимой сопутствующей патологии (сахарный диабет 1 и 2 типа, ИМ, анемия, почечная и печеночная недостаточность, онкологические и инфекционно-воспалительные заболевания в период обострения, аутоиммунные заболевания). На госпитальном этапе все пациенты получали стандартную медикаментозную терапию в соответствии с рекомендациями Минздрава России (2020) и Европейского общества кардиологов (2020). Подробная клиничко-анамнестическая характеристика и методы исследования представлены ранее [5]. Во время оперативного вмешательства (коронарное шунтирование или коррекции пороков сердца) были получены образцы ЖТ подкожной (ПЖТ), ЭЖТ и ПВЖТ локализации (3-5 г), которые подвергались криогенной заморозке жидким азотом с последующим хранением при температуре -150° С. Источником ПЖТ служила подкожная клетчатка нижнего угла средостенной раны, ЭЖТ — правые отделы сердца (правое предсердие и правый желудочек), ПВЖТ — область правой коронарной артерии.

Оценка генной экспрессии. Для измерения экспрессии генов ферментов синтеза и деградации церамидов использовался метод количественной полимеразной цепной реакции с праймерами, синтезированными ЗАО "Евроген" (г. Москва, Россия), на амплификаторе ViiA 7 (Applied Biosystems, США). Структура праймеров представлена в таблице 1.

Анализ ферментов метаболизма церамидов в адипоцитах ЖТ различной локализации у пациентов с ССЗ

методом вестерн-блотт. Анализ уровня ферментов синтеза и деградации церамидов в адипоцитах ЖТ пациентов исследуемых групп был проведен методом иммуноблоттинга (вестерн-блоттинг) с использованием соответствующих наборов (ARY005B, R&D Systems; ab193655, Abcam) в соответствии с протоколами производителя. Хемилюминесцентная детекция проводилась посредством цифрового сканера блоттов C-DiGit (LI-COR Biosciences) в высокочувствительном режиме (12-мин сканирование). Для иммуноблоттинга использовались антитела кролика фирмы Cusabio (Китай) к ферментам синтеза и деградации церамидов, антитела козы к бета-тубулину (контроль загрузки, ab21057, 1:1000, Abcam) и конъюгированные с пероксидазой хрена вторичные антитела козы против кролика (Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody #7074, Cell Signaling Technology). Инкубация с антителами выполнялась с применением набора iBind Flex (SLF2020, Invitrogen), карточек iBind Flex (SLF2010, Invitrogen) и прибора iBind Flex Western Device (SLF2000, Invitrogen) в течение 3 ч в соответствии с протоколами производителя. Хемилюминесцентная детекция проводилась с использованием субстрата SuperSignal West Pico PLUS (34580, Thermo Scientific) и цифрового сканера блотов C-DiGit (LI-COR Biosciences) в высокочувствительном режиме (12-мин сканирование). Изображение сканировали и анализировали при помощи программ обработки изображений Empiria Studio и Image Studio.

Денситометрию выполняли с использованием программы ImageJ (National Institutes of Health) по стандартному алгоритму (последовательный выбор и графическое представление полос в виде пиков с измерением их площади и последующей поправкой на контроль загрузки (β-tubulin) и группу сравнения (пациенты с ППС).

Статистический анализ. Статистический анализ полученных результатов проводили в программе

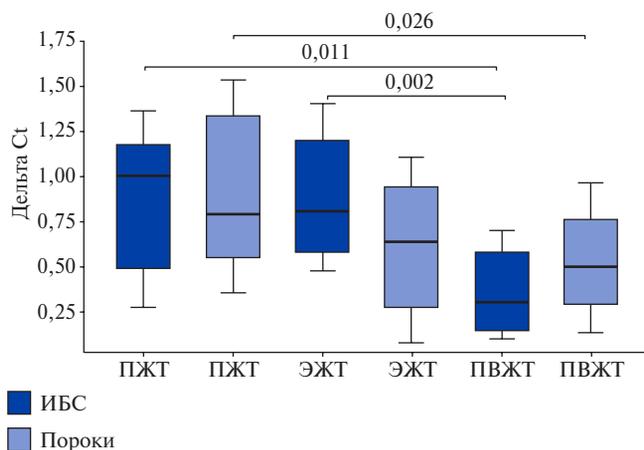


Рис. 1. Экспрессия гена aSMase (*SMPD1*) в адипоцитах ЖТ сердца и сосудов пациентов с ССЗ.

Сокращения: ИБС — ишемическая болезнь сердца, ПВЖТ — периваскулярная жировая ткань, ПЖТ — подкожная жировая ткань, ЭЖТ — эпикардиальная жировая ткань.

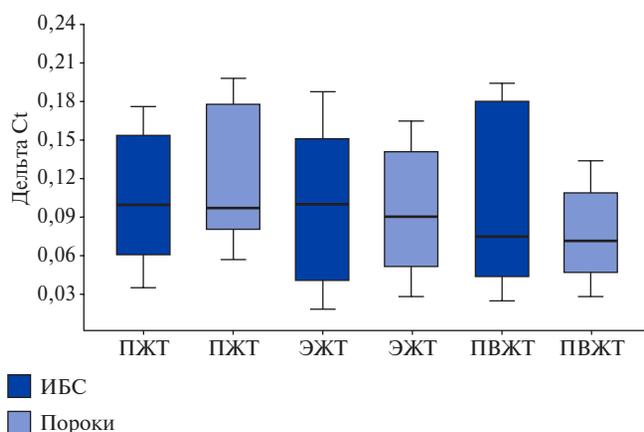


Рис. 2. Экспрессия генов нейтральной SMase (*SMPD3*) в адипоцитах ЖТ сердца и сосудов пациентов с ССЗ.

Сокращения: ИБС — ишемическая болезнь сердца, ПВЖТ — периваскулярная жировая ткань, ПЖТ — подкожная жировая ткань, ЭЖТ — эпикардиальная жировая ткань.

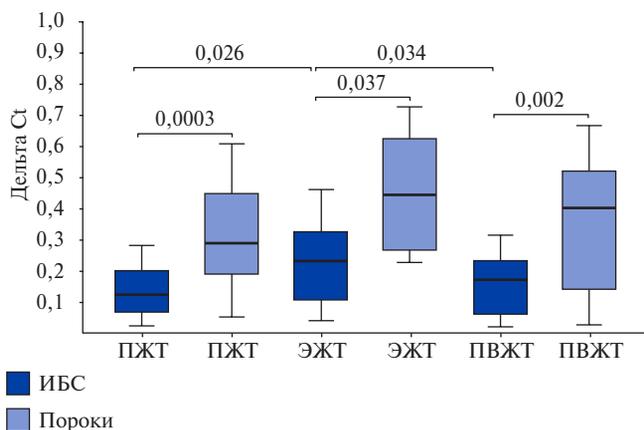


Рис. 3. Экспрессия гена кислой церамидазы (*ASAH1*) в ЖТ сердца и сосудов пациентов с ССЗ.

Сокращения: ИБС — ишемическая болезнь сердца, ПВЖТ — периваскулярная жировая ткань, ПЖТ — подкожная жировая ткань, ЭЖТ — эпикардиальная жировая ткань.

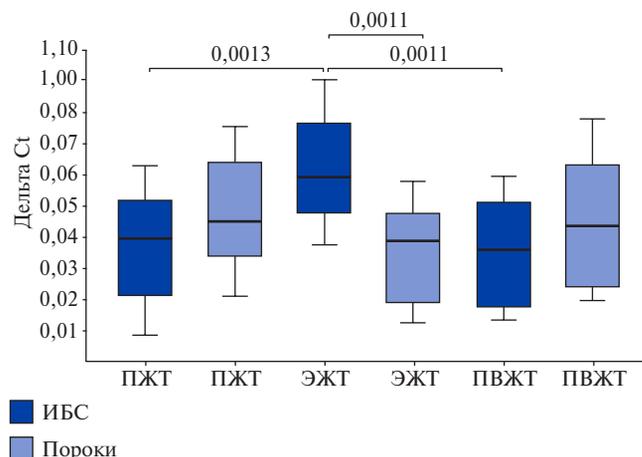


Рис. 4. Экспрессия гена SMS1 (*SGMS1*) в ЖТ сердца и сосудов пациентов с ССЗ.

Сокращения: ИБС — ишемическая болезнь сердца, ПВЖТ — периваскулярная жировая ткань, ПЖТ — подкожная жировая ткань, ЭЖТ — эпикардиальная жировая ткань.

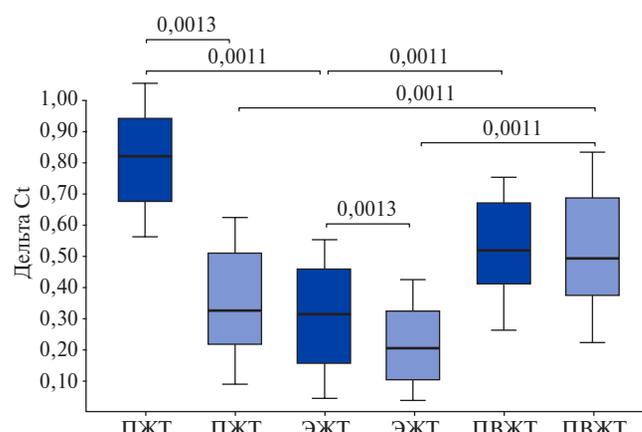


Рис. 5. Экспрессия гена SMS2 (*SGMS2*) в ЖТ сердца и сосудов пациентов с ССЗ.

Сокращения: ИБС — ишемическая болезнь сердца, ПВЖТ — периваскулярная жировая ткань, ПЖТ — подкожная жировая ткань, ЭЖТ — эпикардиальная жировая ткань.

GraphPad Prism 8 (GraphPad Software). Данные представлены в виде медианы, 25-го и 75-го процентилей. Для анализа межгрупповых различий использовали непараметрические критерии. Сравнение двух независимых групп проводили с использованием U-критерия Манна-Уитни. Категориальные переменные, выраженные в процентах, сравнивали с использованием критерия хи-квадрат или точного критерия Фишера. Значения $p < 0,05$ считались статистически значимыми.

Результаты

Экспрессия генов ферментов сфингомиелиназного пути синтеза церамидов. Получено, что в ЖТ сердечной локализации в большей степени экспрессива-

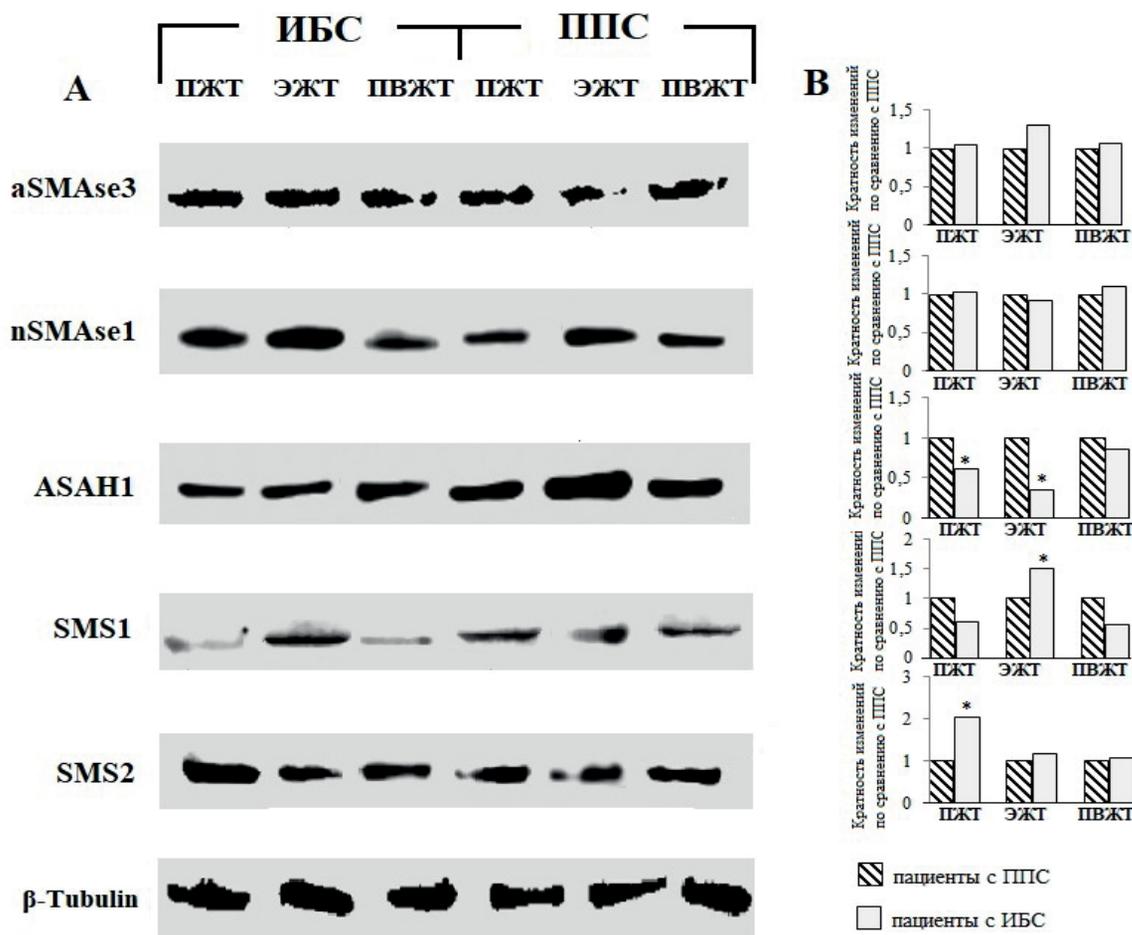


Рис. 6. Изменение экспрессии ферментов метаболизма церамидов в сравнении с экспрессией белка "домашнего хозяйства" (β -Tubulin в качестве контроля внутренней загрузки) в ЖТ сердца и сосудов пациентов с ССЗ.

Примечание: А — вестерн-блоттинг, В — денситометрическое количественное определение уровня ферментов. За единицу была взята группа сравнения (пациенты с ППС). * — $p < 0,05$ — уровень статистической значимости между двумя группами.

Сокращения: ИБС — ишемическая болезнь сердца, ПВЖТ — периваскулярная жировая ткань, ПЖТ — подкожная жировая ткань, ППС — приобретенный порок сердца, ЭЖТ — эпикардиальная жировая ткань, ASAH1 — кислая церамидаза, SMS — сфингомиелинсинтаза, aSMase — кислая сфингомиелиназа, nSMase — плазматической мембраны сфингомиелиназа.

лась кислая SMase (aSMase) *SMPD1*, чем нейтральная *SMPD3*. При ИБС уровень мРНК *SMPD1* был максимальным в подкожных ($p=0,011$) и эпикардиальных адипоцитах ($p=0,002$) (рис. 1). При пороках сердца экспрессия *SMPD1* в подкожных адипоцитах была выше, чем в периваскулярных ($p=0,026$) (рис. 1). Экспрессия *SMPD3* не различалась в зависимости от нозологии и локализации жирового депо (рис. 2).

Учитывая, что экспрессия гена *SMPD1* в ЭЖТ при ИБС была более выражена, чем у пациентов с пороками сердца, можно предположить, что в ЖТ данной локализации при коронарогенной патологии активируется гидролиз SM, а церамиды, синтезируемые aSMase в ЖТ, могут участвовать в атерогенезе.

Экспрессия генов ферментов деградации церамидов. Недостаток ферментов катаболизма также может приводить к накоплению церамидов в клетке,

поэтому была оценена экспрессия генов ферментов деградации церамидов. Показано, что уровень мРНК *ASAH1* в ЭЖТ пациентов с ИБС был максимальным относительно ЖТ других локализаций ($p=0,026$, $p=0,034$) (рис. 3). В группе ППС наблюдалась высокая экспрессия *ASAH1* во всех типах ЖТ. При этом у лиц с пороками сердца уровни мРНК *ASAH1* в ПЖТ ($p=0,0003$), ЭЖТ ($p=0,037$) и ПВЖТ ($p=0,002$) значительно превышали аналогичные показатели пациентов с ИБС (рис. 3).

Церамиды являются субстратом для образования более сложного сфинголипида — SM под действием фермента SMS. У SMS существует несколько изоформ, в настоящем исследовании определяли экспрессию генов SMS1 и -2 (*SGMS1* и *SGMS2*).

При ИБС экспрессия *SGMS1* в ЭЖТ была выше, чем в ПЖТ ($p=0,0013$) и ПВЖТ ($p=0,0011$), в отличие от группы ППС (рис. 4). Генная экспрессия *SGMS1*

в ЭЖТ пациентов с ИБС была выше, чем у лиц с пороками сердца ($p=0,0011$). Уровень мРНК *SGMS2* значимо превышал *SGMS1* у пациентов обеих групп и был максимальным в адипоцитах ПЖТ и ПВЖТ по сравнению с ЭЖТ ($p=0,0011$, $p=0,0011$) в группе ИБС и в ПВЖТ ($p=0,0011$, $p=0,0011$) в группе ППС (рис. 5). При этом при наличии коронарогенной патологии отмечалась высокая экспрессия *SGMS2* в подкожных ($p=0,013$) и эпикардиальных ($p=0,0013$) адипоцитах.

Определение уровня белков, кодируемых генами ферментов сфингомиелиназного пути синтеза керамидов и их деградации в ЖТ различной локализации (ПЖТ, ЭЖТ, ПВЖТ) у пациентов с ССЗ. Для получения информации об особенностях белковой экспрессии ферментов синтеза керамидов из SM были оценены уровни aSMase1 и nSMase3 с использованием иммуноблоттинга (вестерн-блоттинг). Обнаружено, что уровни изучаемых белков статистически значимо не различались между группами. Кроме того, были изучены ферменты утилизации керамидов. У пациентов с ИБС экспрессия фермента ASAH1 значительно ниже в сравнении с пороками сердца в подкожных и эпикардиальных адипоцитах ($p<0,05$). Пациенты с ИБС характеризовались более высоким уровнем активности SMS1 в ЭЖТ, чем лица с пороками сердца. Экспрессия SMS2 также была значительно выше при ИБС в адипоцитах ПЖТ ($p<0,05$). Анализ уровня ферментов метаболизма керамидов в адипоцитах ЖТ пациентов с ССЗ показал сходную картину, полученную при изучении экспрессии генов с использованием количественной полимеразной цепной реакции (рис. 6).

Таким образом, коронарогенная патология ЖТ сердца (преимущественно эпикардиальной локализации) характеризуется не только повышенной экспрессией ферментов синтеза керамидов из SM, но и активацией утилизации керамидов по пути образования сфингозина, что, в свою очередь, может способствовать еще большей аккумуляции керамидов и SM, который ассоциирован с атеросклеротическими процессами.

Обсуждение

Ранее проведенные клинические и экспериментальные исследования продемонстрировали роль керамидов в развитии атеросклероза [14, 15]. Недавно была показана важная роль SMase в физиологии и патофизиологии сердечно-сосудистой системы [3]. Их активация в различных типах клеток сердечно-сосудистой системы, а именно в кардиомиоцитах, эндотелиальных и гладкомышечных клетках сосудов приводит к высвобождению керамидов и других биоактивных липидов (сфингозин и сфингозин-1-фосфат), обладающих специфической сигнальной способностью. ЭЖТ и ПВЖТ, расположенные в непосредственной близо-

сти к очагу поражения, являются активными источниками керамидов и представляет собой специфический липидомный признак ИБС, демонстрируя повышенное содержание атерогенных керамидов [16].

Сфингомиелиназный путь образования керамидов протекает преимущественно в плазматической мембране, но ферменты идентифицированы в лизосомах и эндоплазматическом ретикулеуме (ЭПР) [17]. Сфингомиелиназный путь образования керамидов включает в себя один субстрат — SM и единственный фермент — SMase, гидролизующий фосфоэфирную связь SM с образованием керамида и фосфохолина [7]. Существует три основных типа SMase в соответствии с их оптимальным pH: aSMase (лизосомальная и плазматическая), нейтральная SMase ЭПР/ядра и плазматической мембраны (nSMase) и щелочная SMase (alk-SMase), присутствующая в желудочно-кишечном тракте и желчи, поэтому она в данном исследовании не оценивалась. SMase локализованы в адипоцитах, макрофагах, но экспрессия их генов (*SMPD1* и *SMPD3*) наиболее выражена в кровеносных сосудах и внеклеточных областях, окружающих сосуды в ЖТ [3]. Показано, что ингибирование синтеза керамидов у мышей предотвращает атеросклероз и развитие сердечной недостаточности [18].

В проведенном исследовании уровень мРНК aSMase (*SMPD1*) в эпикардиальных адипоцитах пациентов с ИБС был выше по сравнению с адипоцитами ПЖТ, ПВЖТ и аналогичными показателями лиц с пороками сердца. В связи с чем можно предположить, что в ЖТ эпикардиальной локализации активируется сфингомиелиназный путь биосинтеза керамидов, которые могут участвовать в атерогенезе. Аналогичные данные о повышенной экспрессии SMase *SMPD1* в висцеральной ЖТ относительно ПЖТ у пациентов с ожирением показали Kolak M, et al. (2012) [19].

Активаторами SMase в эндотелиальных клетках сосудов, пораженных атеросклерозом, являются ишемический/реперфузионный стресс и провоспалительные цитокины, высокий уровень которых ассоциирован с атеросклерозом (фактор некроза опухоли- α , интерлейкин- 1β и интерферон- γ). В результате повышается уровень керамидов в клетках, что, вероятно, может быть реализовано и в адипоцитах ЖТ сердца и коронарных артерий [3]. Увеличение уровня мРНК провоспалительных адипоцитокинов в ЭЖТ было продемонстрировано в ранее проведенных исследованиях [8]. Усиленный биосинтез керамидов под действием aSMase может быть опосредован Toll-like рецепторами (TLR) 4. Так, активация TLR4 экзогенным С2 керамидом способствует гидролизу SM с образованием керамидов [20]. Помимо инициации воспаления нами было выявлено увеличение размеров ЭЖТ у пациентов с ИБС, что при дислипидемии

может вызывать локальную гипоксию и активацию факторов, индуцируемых гипоксией, таких как HIFs [8]. Показано, что HIF-1 α в адипоцитах повышает экспрессию SMase, стимулируя образование керамидов из SM, ассоциированных с развитием и прогрессированием атеросклероза [21].

Активность aSMase, который является геном "домашнего хозяйства" в лизосомах, обнаруживается во всех тканях сердца крыс, мышей и людей. Экспериментально показано, что применение ингибитора aSMase перед ишемическим повреждением снижает индуцированную ишемией гибель клеток [22]. У мышей, крыс и кроликов продемонстрировано увеличение уровня керамидов при ишемии/реперфузии, aSMase и nSMase в зоне ИМ, а у пациентов с острым коронарным синдромом выявлена связь с дестабилизацией атеросклеротических бляшек [23].

Для поддержания клеточного гомеостаза и функциональной активности клетки, в т.ч. адипоцита, необходим баланс ферментов синтеза и утилизации керамидов. Дефицит ферментов катаболизма может приводить к накоплению керамидов в клетке. Усиление деградации керамидов обладает благоприятными кардиометаболическими эффектами, что важно для профилактики и лечения ССЗ [4, 24]. Поэтому нами было проведено изучение уровня ферментов катаболизма керамидов.

Согласно полученным результатам, при ИБС максимальный уровень мРНК *ASAH1* наблюдался в ЭЖТ, в то время как при ППС экспрессия *ASAH1* была значимо выше в ЭЖТ и ПВЖТ. В лизосомах активность *ASAH1* зависит от небольшого белка, сапозина D [25]. Дефицит сапозина D вызывает накопление керамидов в тканях, т.е. сапозин D является положительным модулятором *ASAH1*. Учитывая, что экспрессия керамидазы в адипоцитах ЖТ сердца и сосудов пациентов с пороками сердца значительно превышала таковую лиц с ИБС, можно высказать предположение, что при некоронарогенной патологии сердца наблюдается не только активация ферментов синтеза керамидов, но и ферментов утилизации, например, лизосомальной керамидазы. Лизосомальная керамидаза деацилирует керамиды, образующиеся при деградации сфинголипидов плазматической мембраны. *ASAH1* гидролизует в основном ненасыщенные коротко- и длинноцепочечные керамиды [26]. Несмотря на сниженную по сравнению с ППС экспрессию *ASAH1*, этот путь катаболизма керамидов реализуется и в ЭЖТ пациентов с ИБС. Таким образом, фермент наилучшим образом работает в ЖТ пациентов с пороками сердца. Высокая экспрессия фермента кислой керамидазы в ЭЖТ лиц с коронарогенной патологией может свидетельствовать о том, что керамиды, накапливаемые в результате сфингомиелиназного пути в ЭЖТ, утилизируются за счет активности фермента кислой

керамидазы. Образующийся сфингозин может фосфорилироваться сфингозинкиназой в сфингозин-1-фосфат, обладающий свойствами, противоположными керамидам. В то же время сфингозин является субстратом для CERS и может повторно включаться в биосинтез керамидов *de novo* [27].

Керамиды являются субстратом для образования SM, который обнаруживается в атеросклеротических бляшках людей [2]. SM является основным сфинголипидом в атерогенных апоВ-содержащих липопротеинах, таких как липопротеиды очень низкой плотности, липопротеиды низкой плотности (ЛНП) и хиломикроны. При этом ЛНП бляшек содержат намного больше SM, чем ЛНП плазмы [28]. Показано, что содержание SM в стенке аорты и в плазме ассоциировано с атеросклерозом, поскольку SM накапливается в атеромах людей. Плазменный уровень SM считается независимым фактором риска ИБС и ассоциирован с риском развития ИМ [29]. Имеются сведения, что содержание SM в атеросклеротических бляшках гораздо больше, чем ЛНП плазмы. Сочетание дефицита SMS1+2 с нокаутом ApoE или рецептора ЛНП уменьшает атеросклеротические проявления [28].

Синтез SM в клетках протекает при участии фермента SMS, имеющей несколько изоформ: SMS1 локализована в аппарате Гольджи, SMS2 — преимущественно в плазматической мембране. Керамиды, образуемые в ЭПР, посредством везикулярного и не-везикулярного транспорта переносятся в аппарат Гольджи, где метаболизируются в сложные сфинголипиды, в т.ч. в SM [26].

Согласно полученным нами данным, высокая экспрессия *SMS1* в ЭЖТ пациентов с ИБС сочеталась с максимальной экспрессией *SMS2* в ПЖТ и ПВЖТ, превышающими аналогичные показатели лиц с ППС. Вероятно, при коронарогенной патологии активированы пути синтеза SM не только внутри адипоцита, но и в большей степени в плазматической мембране адипоцита.

Ограничения исследования. Исследование имеет определенные ограничения. Во-первых, это одноцентровое исследование, во-вторых, размер выборки небольшой. В-третьих, необходимо липидомное профилирование жировых депо сердца и коронарных сосудов больных с ССЗ, что является частью плана дальнейшей работы.

Заключение

Таким образом, при коронарогенной патологии в ЖТ сердца (преимущественно эпикардиальной локализации) отмечается усиление экспрессии ферментов синтеза керамидов по сфингомиелиназному пути. Эти изменения могут способствовать аккумуляции керамидов, запуская многие патологические процессы, ассоциированные с атеросклерозом. Наблюдаемое увеличение экспрессии генов ферментов может быть

обусловлено рядом причин: избыток жирных кислот, гипоксия, воспаление, активация TLR4-рецепторов на адипоцитах. Кроме повышенной экспрессии ферментов биосинтеза церамидов, в ЭЖТ пациентов с ИБС выявлено увеличение уровня мРНК ферментов катаболизма церамидов. Регуляция метаболизма за счет экспрессии ферментов их синтеза и распада представляет собой привлекательную терапевтическую стратегию уменьшения уровня церамидов в плазме и периферических тканях, в т.ч. в сердце и сосудах, и имеет

огромные перспективы для лечения широкого спектра сердечно-сосудистых патологий.

Отношения и деятельность. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-15-20007 "Церамидный профиль локальных жировых депо сердца: клинико-патогенетическое значение и терапевтический потенциал" <https://rscf.ru/project/22-15-20007/> и средств Министерства науки и высшего образования Кузбасса.

Литература/Reference

- Brel NK, Gruzdeva OV, Kokov AN, et al. Relationship of coronary calcinosis and local fat deposits in patients with coronary artery disease. *Complex Issues of Cardiovascular Diseases*. 2022;11(3):51-63. (In Russ.) Брель Н.К., Груздева О.В., Кокков А.Н. и др. Взаимосвязь кальциноза коронарных артерий и локальных жировых депо у пациентов с ишемической болезнью сердца. Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. 2022;11(3):51-63. doi:10.17802/2306-1278-2022-11-3-51-6.
- Zietzer A, Düsing P, Reese L, et al. Ceramide Metabolism in Cardiovascular Disease: A Network With High Therapeutic Potential. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2022;42(10). doi:10.1161/ATVBAHA.122.318048.
- Pavoine C, Pecker F. Sphingomyelinases: their regulation and roles in cardiovascular pathophysiology. *Cardiovasc Res*. 2009;82(2):175-83. doi:10.1093/cvr/cvp030.
- Shu H, Peng Y, Hang W, et al. Emerging Roles of Ceramide in Cardiovascular Diseases. *Aging Dis*. 2022;13(1):232-45. doi:10.14336/AD.2021.07.10.
- Gruzdeva OV, Dyleva YuA, Belik EV, et al. Comparative evaluation of the expression of enzymes of the ceramide *de novo* synthesis pathway in cardiac adipose tissue and blood vessels of cardiovascular patients. *Russian Journal of Cardiology*. 2022;27(12):5281. (In Russ.) Груздева О.В., Дылева Ю.А., Белик Е.В. и др. Сравнительная оценка экспрессии ферментов пути синтеза церамидов *de novo* в жировой ткани сердца и сосудов пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями. Российский кардиологический журнал. 2022;27(12):5281. doi:10.15829/1560-4071-2022-5281.
- Tippetts TS, Holland WL, Summers SA. Cholesterol — the devil you know; ceramide — the devil you don't. *Trends Pharmacol Sci*. 2021;42(12):1082-95. doi:10.1016/j.tips.2021.10.001.
- Ying L, Tippetts TS, Chaurasia B. Ceramide dependent lipotoxicity in metabolic diseases. *Nutrition and Healthy Aging*. 2019;5(1):1-12. doi:10.3233/NHA-170032.
- Gruzdeva OV, Dyleva YA, Belik EV, et al. Relationship between Epicardial and Coronary Adipose Tissue and the Expression of Adiponectin, Leptin, and Interleukin 6 in Patients with Coronary Artery Disease. *J Pers Med*. 2022;12(2):129. doi:10.3390/jpm12020129.
- Iacobellis G. Epicardial adipose tissue in contemporary cardiology. *Nat Rev Cardiol*. 2022;19(9):593-606. doi:10.1038/s41569-022-00679-9.
- Chaurasia B, Tippetts TS, Monibas RM, et al. Targeting a ceramide double bond improves insulin resistance and hepatic steatosis. *Science*. 2019;365:386-92. doi:10.1126/science.aav3722.
- Hadas Y, Vincek AS, Youssef E, et al. Altering Sphingolipid Metabolism Attenuates Cell Death and Inflammatory Response After Myocardial Infarction. *Circulation*. 2020;141:916-30. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.119.041882.
- Yu Z, Peng Q, Huang Y. Potential therapeutic targets for atherosclerosis in sphingolipid metabolism. *Clin Sci (Lond)*. 2019;133(6):763-76. doi:10.1042/CS20180911.
- van Eijk M, Aten J, Bijl N, et al. Reducing glycosphingolipid content in adipose tissue of obese mice restores insulin sensitivity, adipogenesis and reduces inflammation. *PLoS One*. 2009;4(3):e4723. doi:10.1371/journal.pone.0004723.
- Hammerschmidt P, Brüning JC. Contribution of specific ceramides to obesity-associated metabolic diseases. *Cell Mol Life Sci*. 2022;79(8):395. doi:10.1007/s00018-022-04401-3.
- Park TS, Panek RL, Rekhter MD, et al. Modulation of lipoprotein metabolism by inhibition of sphingomyelin synthesis in ApoE knockout mice. *Atherosclerosis*. 2006;189(2):264-72. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2005.12.029.
- Barchuk M, Ancel P, Miksztovcz V, et al. Epicardial Adipose Tissue Ceramides Are Related to Lipoprotein Lipase Activity in Coronary Artery Disease: Unfolding a Missing Link. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2022;42(8):e242-e251. doi:10.1161/ATVBAHA.122.317840.
- Hussain MM, Jin W, Jiang XC. Mechanisms involved in cellular ceramide homeostasis. *Nutr Metab (Lond)*. 2012;9(1):71. doi:10.1186/1743-7075-9-71.
- Park T-S, Rosebury W, Kindt EK, et al. Serine palmitoyltransferase inhibitor myriocin induces the regression of atherosclerotic plaques in hyperlipidemic ApoE-deficient mice. *Pharmacol Res*. 2008;58:45-51. doi:10.1016/j.phrs.2008.06.005.
- Kolak M, Gertow J, Westerbacka J, et al. Expression of ceramide-metabolising enzymes in subcutaneous and intra-abdominal human adipose tissue. *Lipids Health Dis*. 2012;11:115. doi:10.1186/1476-511X-11-115.
- Cuschieri J, Bulger E, Billgrin J, et al. Acid sphingomyelinase is required for lipid Raft TLR4 complex formation. *Surg Infect (Larchmt)*. 2007;8(1):91-106. doi:10.1089/sur.2006.050.
- Wang P, Zeng G, Yan Y, et al. Disruption of adipocyte HIF-1 α improves atherosclerosis through the inhibition of ceramide generation. *Acta Pharm Sin B*. 2022;12(4):1899-912. doi:10.1016/j.apsb.2021.10.001.
- Argaud L, Prigent AF, Chalabreysse L, et al. Ceramide in the antiapoptotic effect of ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;286(1):H246-51. doi:10.1152/ajpheart.00638.2003.
- Pan W, Yu J, Shi R, et al. Elevation of ceramide and activation of secretory acid sphingomyelinase in patients with acute coronary syndromes. *Coron Artery Dis*. 2014;25(3):230-5. doi:10.1097/MCA.0000000000000079.
- Li Y, Talbot CL, Chaurasia B. Ceramides in Adipose Tissue. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020;11:407. doi:10.3389/fendo.2020.00407.
- Parveen F, Bender D, Law SH, et al. Role of Ceramidases in Sphingolipid Metabolism and Human Diseases. *Cells*. 2019;8(12):1573. doi:10.3390/cells8121573.
- Gault CR, Obeid LM, Hannun YA. An overview of sphingolipid metabolism: from synthesis to breakdown. *Adv Exp Med Biol*. 2010;688:1-23. doi:10.1007/978-1-4419-6741-1_1.
- Choi RH, Tatum SM, Symons JD, et al. Ceramides and other sphingolipids as drivers of cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol*. 2021;18(10):701-11. doi:10.1038/s41569-021-00536-1.
- Li Z, Chiang YP, He M, et al. Effect of liver total sphingomyelin synthase deficiency on plasma lipid metabolism. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2021;1866(5):158898. doi:10.1016/j.bbalip.2021.158898.
- Park JY, Lee SH, Shin MJ, et al. Alteration in metabolic signature and lipid metabolism in patients with angina pectoris and myocardial infarction. *PLoS One*. 2015;10(8):e0135228. doi:10.1371/journal.pone.0135228.