

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА МОЛЕКУЛЯРНЫХ ЭФФЕКТОВ ЦИТОПРОТЕКТОРОВ В КОМПЛЕКСНОЙ ТЕРАПИИ ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ СЕРДЦА

Карташова Е.А.

Ростовский государственный медицинский университет, Ростов-на-Дону

Резюме

Изучены молекулярные эффекты триметазидина и милдроната у пациентов со стабильной стенокардией напряжения, I-III ФК. Сравнительная оценка молекулярных эффектов цитопротекторов выполнена на основе методов анализа активности и концентрации основных продуктов ЦТК, СРО и АОС, продуктов цитохимической активности в крови пациентов с ИБС, а также с помощью протеомных методов исследования. Установлена возможность применения триметазидина и милдроната в качестве кардиопротекторов для первичной и вторичной лекарственной профилактики ИБС I-III ФК.

Ключевые слова: ишемическая болезнь сердца, свободно-радикальное окисление, цитохимия, протеомика, триметазидин, милдронат.

Сегодня проблемы диагностики и лечения ишемической болезни сердца (ИБС) приобрели особую актуальность, т. к. ИБС продолжает оставаться лидером среди причин заболеваемости и смертности населения в Европе, Соединенных Штатах Америки и России, несмотря на очевидные достижения в области интервенционной кардиологии и появление новых лекарственных препаратов [1]. Около 2/3 смертей в России составляют смерти от ИБС, причем эта цифра в 3 раза выше, чем среднемировая. Поэтому совершенствование методов лечения больных с ИБС направлено на улучшение прогноза и качества жизни пациентов за счет уменьшения частоты возникновения, интенсивности и продолжительности ангинозных приступов [4].

Необходимость оптимизации ведения пациентов с различными формами ИБС на стационарном и амбулаторном этапах стала очевидной после завершения крупных, многоцентровых эпидемиологических исследований [6,7,8]. Все фармакологические группы антиангинальных лекарственных средств имеют доказанную эффективность при вторичной лекарственной профилактике различных форм ИБС.

Исследования последних лет показывают, что существует еще один элемент первичной и вторичной лекарственной профилактики ИБС с доказанной эффективностью, который можно обозначить как "цитопротекция" и рассматривать как оптимизацию метаболизма на уровне кардиомиоцитов в условиях ишемии миокарда [5].

К основным цитопротекторам в настоящее время относятся препараты триметазидин и милдронат, которые, несмотря на совершенно различные механизмы действия, обладают очевидным сходством по влиянию на ишемизированный миокард [2].

В России проблемы высокого уровня заболеваемости и смертности населения при ИБС обусловлены

отсутствием в клиниках высокотехнологических методов объективной оценки процессов энергообращения в миокарде в условиях ишемии и гипоксии на молекулярном уровне, а также современной системы оценки эффективности и безопасности применения новых лекарственных средств на уровне молекулярных звеньев, лежащих в основе ишемии и гипоксии в миокарде на разных стадиях прогрессирования ИБС [3,5].

В связи с этим настоящее клиническое исследование сравнительной оценки эффективности применения цитопротекторов нового поколения в комплексной терапии ИБС на основе комплекса современных инструментальных и молекулярных методов анализа является актуальным и своевременным.

Целью настоящей работы явилась сравнительная оценка молекулярных эффектов цитопротекторов — триметазидина и милдроната в комплексной терапии ИБС.

Для достижения цели были решены задачи анализа динамики показателей активности различных звеньев цикла трикарбоновых кислот (ЦТК) и сопряженных с ним реакций, про — и антиоксидантных систем крови у пациентов с ИБС на фоне приема стандартного режима терапии (СРТ) и цитопротекторов, а также динамики протеомного профиля крови пациентов на фоне оптимизации терапии ИБС милдронатом и триметазидином.

Материал и методы

Настоящее клиническое исследование выполнено в параллельных группах больных. Оценка эффективности режима лечения ИБС милдронатом и триметазидином представляла собой сравнительное проспективное исследование. В клиническое исследование было включено 90 пациентов со стенокардией напряжения I — III ФК (рекомендации Канадской ассоциации кардиологов).

Таблица 1

Динамика показателей работы звеньев ЦТК, цепи дыхательных ферментов, систем СРО-АОС у пациентов с ИБС на фоне терапии СРТ и цитопротекторами

Показатель	Контрольная группа (n=10) M±SEM	I группа (n=30) M±SEM		II группа (n=30) M±SEM		III группа (n=30) M±SEM	
		До лечения	После лечения	До лечения	После лечения	До лечения	После лечения
Каталаза, мкат/г Hb	2,8±0,5	2,06±0,14	2,1±0,1	1,7±0,4	2,2±0,3	1,92±0,32	2,7±0,3*
Лактат, мкмоль/мл	3,9±0,2	4,88±0,4	4,5±0,3	4,96±0,2	4,4±0,3	4,92±0,3	4,0±0,3
2,3-ДФГ, мкмоль/л	4,8±0,2	2,8±0,3	2,9±0,3	3,0±0,3	3,7±0,4	2,98±0,3	4,7±0,3**
ЦХО, мкмоль/мл	0,14±0,02	0,11±0,01	0,11±0,03	0,11±0,01	0,12±0,04	0,11±0,01	0,14±0,04
СДГ, мкмоль/мл	3,1±0,2	2,5±0,2	2,7±0,2	2,6±0,2	2,8±0,3	2,4±0,2	3,0±0,3
МДА, мкмоль/мл	0,16±0,01	0,42±0,03	0,4±0,03	0,48±0,04	0,33±0,04*	0,43±0,03	0,23±0,03**
СОД, усл.ед./г Hb	585,5±26,1	413,3±34,6	429,1±29,5	494,3±32,3	494,6±27,7	420,2±35,7	532,4±28,4**
ГР, мкмоль/г Hb	12,7±0,4	6,3±0,2	7,5±0,3	5,9±0,3	9,2±0,5**	5,7±0,2	11,2±0,4***
Глутатион, мкмоль/г Hb	6,0±0,3	3,9±0,1	4,2±0,2	3,1±0,1	4,5±0,2*	2,9±0,2	5,9±0,3**
ГПО, мкмоль/г Hb	2,2±0,3	5,1±0,5	4,1±0,4	4,8±0,4	3,9±0,3	5,2±0,6	2,6±0,4*

Примечания: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$; Hb – гемоглобин при сравнении показателей в I, II, III исследуемых группах до лечения и после лечения.

Критерии включения пациентов в исследование:

1. Диагноз: стабильная стенокардия напряжения, I-III ФК, АГ I-II степени;
2. Стационарные больные обоего пола от 45 до 65 лет;
3. Наличие добровольного информированного согласия пациента.

Критерии исключения пациентов из исследования:

1. Нестабильное течение ИБС, требующее неотложной реваскуляризации, рефрактерная к терапии АГ.
2. Сахарный диабет.
3. Постоянная форма мерцания и трепетания предсердий.
4. Наличием полной блокады левой ножки пучка Гиса, имплантированного электрокардиостимулятора, манифестирующего феномена WPW, постоянная АВБ II–III степени.

Все пациенты были разделены на 3 группы: I исследуемая группа (30 человек), получавшая в течение 24 недель стандартную антиангинальную терапию (иАПФ, ацетилсалициловая кислота, статины, β -адреноблокаторы или БМКК); II исследуемая группа (30 человек), получавшая дополнительно к стандартной антиангинальной терапии милдронат в фиксированной дозе 1,0 г/сут внутривенно капельно ежедневно в течение 2 недель, а затем по 1,0 г/сут перорально в течение 22 недель; III исследуемая группа (30 человек), получавшая дополнительно к стандартной антиангинальной терапии триметазидин по 70 мг/сут перорально в течение 24 недель. Сравнение средних значений основных показателей молекулярных эффектов лекарственных препаратов в исследовании проводился с контрольной группой (КГ) пациентов, которую составили практически здоровые лица (10 человек).

На момент включения пациентов в исследование и через 24 недели после приема СРТ и цитопротекто-

ров оценивались следующие показатели активности и концентрации молекулярных маркеров в крови и эритроцитах, отражающие эффекты милдроната и триметазидина на системном и клеточном уровнях: сукционатдегидрогеназа (СДГ) (цитохимический метод, анализатор “Pentra”, США), цитохромоксидаза (ЦХО, метод спектрофотометрии, анализатор “Thermo Electron Evolution”, США), каталаза (метод спектрофотометрии, прибор “Thermo Electron Evolution”, США), СОД (по степени ингибирования восстановления НСТ), глутатионпероксидаза (ГПО, метод В.М. Моина, метод спектрофотометрии, прибор “Thermo Electron Evolution”, США), ГР в крови и эритроцитах (метод Hosoda и Nakamura), лактат (ферментативный метод), МДА (по реакции с тиобарбитуровой кислотой), глутатион (микрометод И.А.Шевчука и соавт.), 2,3-дифосфоглицерат (2,3-ДФГ, колориметрический метод, адаптированный на основе метода Grisolia et al.). Формирование молекулярной карты плазмы крови на фоне приема триметазидина и милдроната осуществлялось на основе протеомных методов анализа белков плазмы крови пациентов (метод MALDI-TOF-масс-спектрометрии, прибор Ultraflex II, Bruker, США). Первичную и вторичную статистическую обработку материала клинического исследования проводили с помощью пакета статистических программ для биомедицинских исследований “Statistica 6.0” (StatSoft, США).

Результаты и обсуждение

Рассмотрим динамику содержания основных продуктов ЦТК, СРО и АОС, продуктов цитохимической активности в крови пациентов с ИБС в условиях СРТ и его модификации цитопротекторами, представленную в табл. 1.

На момент включения в исследование у пациентов всех исследуемых групп отмечены следующие закономерные изменения в концентрации продуктов

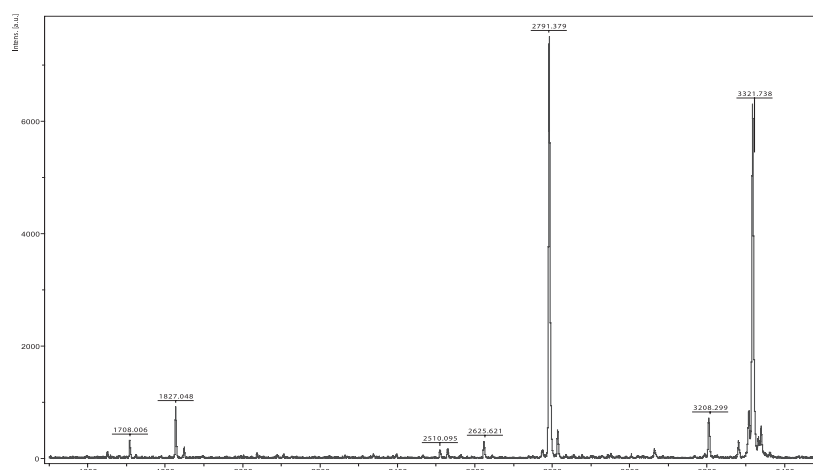


Рис. 1. Фрагмент масс-спектрограммы пептидных фрагментов белков плазмы крови здорового человека (диапазон M_r = 800Да-4 кДа)

ЦТК, СРО, ферментов АОС и цитохимической активности клеток: достоверное снижение концентрации каталазы, 2,3-ДФГ, ЦХО, СДГ, глутатиона, ГР, СОД при статистически значимом увеличении концентрации лактата, МДА, ГПО в крови пациентов.

В I исследуемой группе пациентов с ИБС на 24 неделе исследования зарегистрированы следующие изменения в концентрации продуктов ЦТК, СРО, ферментов АОС и цитохимической активности клеток: недостоверная тенденция к увеличению содержания каталазы, 2,3-ДФГ, СДГ, СОД, ГР, глутатиона в крови и статистически недостоверная тенденция к снижению концентрации ГПО, лактата, МДА при отсутствии динамики уровня ЦХО в крови пациентов.

Во II исследуемой группе пациентов с ИБС на 24 неделе исследования отмечены следующие изменения в метаболическом профиле крови и показателях цитохимической активности клеток: статистически достоверное увеличение содержания ГР, глутатиона в крови при недостоверной тенденции к повышению концентрации каталазы, 2,3-ДФГ, СДГ, СОД, ЦХО, статисти-

чески достоверное снижение концентрации ГПО, МДА при недостоверной тенденции к уменьшению концентрации лактата в крови пациентов. Показатели концентрации ГР, глутатиона, ГПО, МДА в крови пациентов с ИБС, принимавших дополнительно к СРТ милдронат, не достигали значений концентраций аналогичных показателей в КГ здоровых лиц.

В III исследуемой группе пациентов с ИБС на 24 неделе исследования выявлены следующие изменения в метаболическом профиле крови и показателях цитохимической активности клеток: статистически достоверное увеличение содержания каталазы, 2,3-ДФГ, СДГ, СОД, ЦХО, ГР, глутатиона при статистически значимом снижении концентрации ГПО, МДА, лактата в крови пациентов. Показатели концентрации всех вышеперечисленных показателей активности систем СРО – АОС, ЦТК и цитохимической активности клеток у пациентов с ИБС, принимавших дополнительно к СРТ триметазидин, не отличались от значений концентраций аналогичных показателей в КГ здоровых лиц.

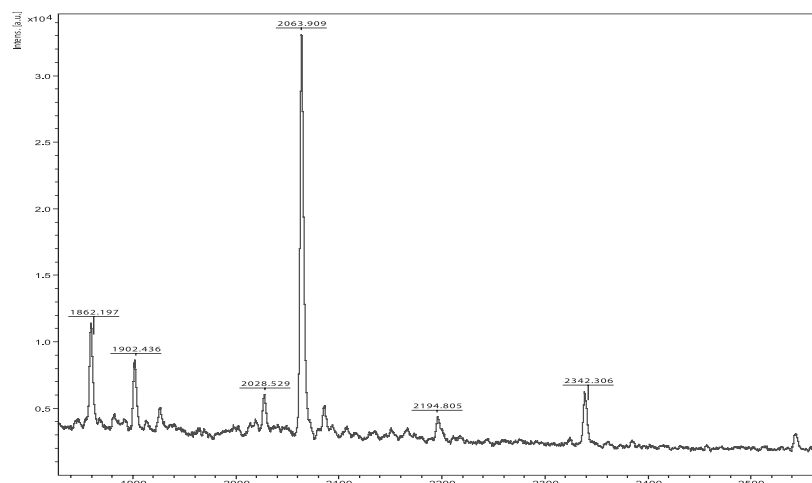


Рис. 2. Фрагмент масс-спектрограммы пептидных фрагментов белков-маркеров плазмы крови пациента с ИБС в I исследуемой группе на 24 неделе исследования (диапазон M_r = 1кДа-3 кДа)

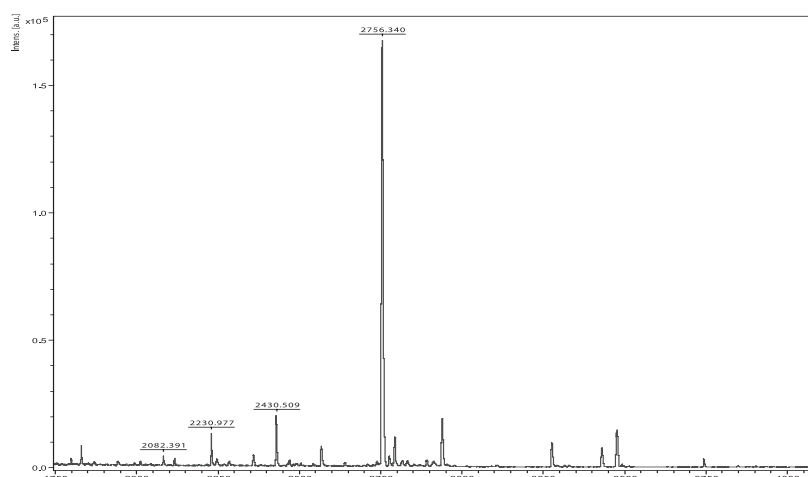


Рис. 3. Фрагмент масс-спектрограммы пептидных фрагментов белков-маркеров плазмы крови пациента с ИБС во II исследуемой группе на 24 неделе исследования (диапазон M_r = 1 кДа-4 кДа)

Примеры масс-спектрограмм пептидных фрагментов белков плазмы крови здорового человека и белков — маркеров пациентов с ИБС на фоне приема СРТ и милдроната или триметазидина представлены на рис. 1, 2, 3, 4.

Анализ результатов MALDI-TOF-масс-спектрометрии белков плазмы крови в контрольной группе и белков — маркеров плазмы крови пациентов с ИБС исследуемых групп выявил динамику количественной идентификации белков-маркеров ишемических процессов в миокарде на фоне приема СРТ и милдроната или триметазидина.

Качественный состав спектра белков плазмы крови лиц КГ совпадал с качественным составом спектра белков плазмы крови трех исследуемых групп и включал следующие белки: мозговая форма спектрина, белок С, белок GCN5, легкая цепь миозинкиназы, дигидролипоамид — S- ацетилтрансфераза, миозин X, дельта-5 десатураза, неприлизин, гамма — бутиробетаин гидроксилаза, растворимая форма рецептора к эндотелиальному фактору роста сосудов, белок 2, регулирующий ишемическое preconditioning

в миокарде, аполипопротеин D, фосфомевалонаткиназа, НАДН-убихинон оксидоредуктаза, каспаза-10, эндотелиальная липаза, активатор морфогенеза 1, домен-содержащая гексокиназа 1, цАМФ-зависимая протеинкиназа A, CpG — связывающий белок. Исключением являются белки арилсульфотрансфераза 2 и фосфодиэстераза 3B, которые не идентифицированы в плазме крови пациентов с ИБС всех исследуемых групп.

Отмечены следующие достоверные изменения в количестве пациентов трех исследуемых групп с повторяющимся спектром белков на фоне СРТ: снизилось количество пациентов с наличием мозговой формы спектрина ($p < 0,05$), белка С ($p < 0,01$), дигидролипоамид — S- ацетилтрансферазы ($p < 0,01$), линеоил — КоА — десатуразы ($p < 0,01$), миозина X ($p < 0,05$), дельта-5 десатуразы ($p < 0,01$), гамма-бутиробетаин — гидроксилазы ($p < 0,05$), белка 2, регулирующего ишемическое preconditioning в миокарде ($p < 0,05$), аполипопротеина D ($p < 0,05$), НАДН-убихинон — оксидоредуктазы ($p < 0,05$), каспазы -10 ($p < 0,05$), эндотелиальной липазы ($p < 0,01$), активато-

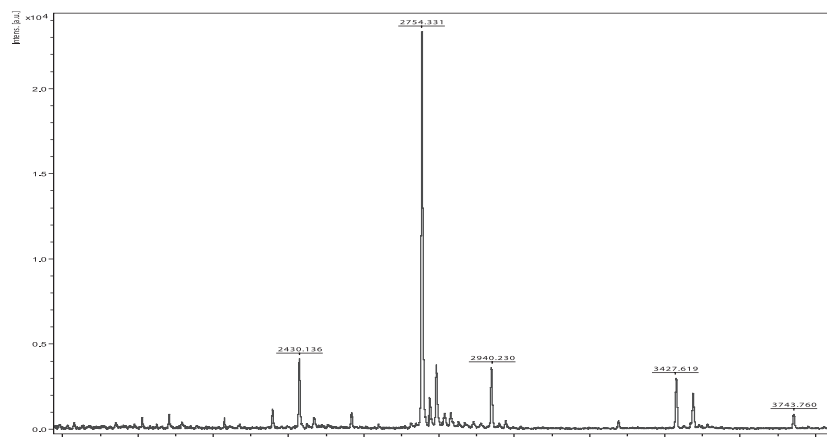


Рис. 4. Фрагмент масс-спектрограммы пептидных фрагментов белков-маркеров плазмы крови пациента с ИБС в III исследуемой группе на 24 неделе исследования (диапазон M_r = 1 кДа-4 кДа)

ра морфогенеза 1 ($p < 0,01$), домен-содержащей гексокиназы 1 ($p < 0,05$), цАМФ-зависимой протеинкиназы А ($p < 0,05$) по сравнению с количеством здоровых лиц КГ с аналогичным спектром белков. Одновременно показано достоверное увеличение количества пациентов с ИБС трех исследуемых групп с наличием в плазме крови экспрессии белка GCN5 ($p < 0,01$), легкой цепи миозинкиназы ($p < 0,01$), неприлизина ($p < 0,01$), растворимой формы рецептора к эндотелиальному фактору роста сосудов ($p < 0,05$), фосфомевалонаткиназы ($p < 0,05$), CpG — связывающего белка ($p < 0,01$) на фоне СРТ по сравнению с количеством здоровых лиц КГ с аналогичным спектром белков.

Добавление милдроната и триметазидина к СРТ ИБС во II и III исследуемых группах пациентов сопровождалось следующими достоверными изменениями в количестве пациентов с повторяющимся спектром белков по сравнению с количеством здоровых лиц: отмечено увеличение количества пациентов с экспрессией мозговой формы спектрина ($p < 0,05$), белка С, дигидролипоамид — S- ацетилтрансферазы ($p < 0,01$), линеол — КоА — десатуразы ($p < 0,05$), миозина X, гамма-бутирбетаин — гидроксилазы ($p < 0,05$), белка 2, регулирующего ишемическое preconditionирование в миокарде ($p < 0,05$), аполипопротеина D ($p < 0,01$), НАДН — убихинон — оксидоредуктазы ($p < 0,05$), каспазы-10 ($p < 0,01$), эндотелиальной липазы ($p < 0,05$), активатора морфогенеза 1 ($p < 0,01$), домен-содержащей гексокиназы 1 ($p < 0,05$), белка GCN5 ($p < 0,05$), легкой цепи миозинкиназы ($p < 0,05$), неприлизина ($p < 0,05$), растворимой формы рецептора к эндотелиальному фактору роста сосудов ($p < 0,05$), фосфомевалонаткиназы ($p < 0,01$), CpG — связывающего белка ($p < 0,05$). При этом в обеих группах выявлено статистически значимое уменьшение количества пациентов с экспрессией дельта-5 десатуразы ($p < 0,01$) и цАМФ-зависимой протеинкиназы А ($p < 0,01$) в плазме крови по сравнению с количеством лиц КГ с аналогичным спектром белков.

Нами показано, что в III исследуемой группе все изменения в количестве больных с экспрессируемым спектром белков плазмы крови имели наибольшую степень выраженности по сравнению с аналогичными изменениями во II исследуемой группе, за исключением таких белков, как гамма-бутирбетаин — гидроксилаза, рецептор к эндотелиальному фактору роста сосудов, в связи с чем у милдроната появляются новые звенья в механизме действия, связанные с развитием коллатералей в миокарде и блокадой бета-окисления жирных кислот.

Следовательно, у пациентов с ИБС вместе с нарушением метаболических процессов в кардиомиоцитах происходит интенсификация процессов СРО липидов. Накопление продуктов ПОЛ приводит к нарушению структуры и функции биомембран, то есть появляется системное повреждающее дей-

ствие на клетку с изменением ее цитохимической активности. Первичные и вторичные продукты ПОЛ, внутриклеточные ферменты оказывают вазоконстрикторное действие, что подтверждает возможность участия молекул-метаболитов ПОЛ в локальных и системных гемодинамических расстройствах.

Полученные результаты подтверждают данные о способности милдроната и триметазидина уменьшать процессы ПОЛ при ИБС. Показатели активности ключевых звеньев ЦТК и сопряженных с ним реакций, значениями показателей активности про- и антиоксидантных систем крови у пациентов с ИБС на фоне приема СРТ и цитопротекторов, продемонстрировали наличие закономерностей, отражающих молекулярные взаимодействия, развивающиеся в крови и на уровне кардиомиоцитов в условиях приема цитопротекторов разного химического строения.

Обнаруженная нами динамика экспрессии белков плазмы крови у пациентов с ИБС, принимавших СРТ и различные цитопротекторы, позволяет представить молекулярный механизм формирования различной эффективности триметазидина и милдроната.

На основании проведенного анализа молекулярных механизмов возникновения и прогрессирования ИБС, включавших молекулы различной химической структуры и их взаимодействия, можно сделать заключение о необходимости применения, наряду со стандартными антиангинальными лекарственными препаратами, лекарственных средств метаболической направленности действия из группы цитопротекторов, механизм действия которых включает воздействие на 5 ключевых групп белков-маркеров ИБС: группа белков — молекул, определяющих функциональные и гемодинамические нарушения при ИБС, группа белков — молекул, отвечающих за формирование сократительной функции миокарда, группа белков — молекул ишемического preconditionирования в миокарде, группа белков — молекул биооксидантных, биоантиоксидантных и биорегуляторных систем организма, белок — молекула микрореологических и аутоиммунных нарушений при ИБС.

Выводы

1. Применение кардиопротекторов способствует снижению содержания продуктов свободно-радикального окисления крови у больных ИБС, при одинаковом с милдронатом влиянии на процессы ПОЛ, антиоксидантное действие более выражено у триметазидина.

2. Выявлена динамика молекулярного профиля плазмы крови у пациентов с ИБС на фоне приема триметазидина и милдроната, включающего молекулы белков сократительной функции и ишемического preconditionирования миокарда, молекулы функциональных и гемодинамических нарушений при ИБС, молекулы белков микрореологии и аутоиммун-

ных процессов, молекулы белков биооксидантных, биоантиоксидантных и биорегуляторных систем.

3. Современные методы оценки молекулярных эффектов цитопротекторов доказали возмож-

ность применения триметазидина и милдроната в качестве кардиопротекторов для первичной и вторичной лекарственной профилактики ИБС I-III ФК.

Литература

1. Беленков Ю.Н. Хроническая сердечная недостаточность в России — опыт 25 лет: где мы находимся и куда должны идти? // Сердечная недостаточность. — 2003. — Т.4. — №1(17). — С.9-11.
2. Гордеев И.Г., Бекчиу Е.А., Люсов, В.А. и др. Оценка влияния миокардиальных цитопротекторов на процессы перекисного окисления липидов у больных стабильной стенокардией до и после хирургической реваскуляризации миокарда // Российский кардиологический журнал. — 2005 — № 3. — С. 41 — 47.
3. Сарвилина И.В., Каркищенко В.Н., Горшкова Ю.В. Междисциплинарные исследования в медицине. — М.: Изд. "Техносфера", 2007. — 368 с.
4. Маколкин В.И., Глезер М.Г, Жарова А.И. Ишемия миокарда: от понимания механизмов к адекватному лечению // Кардиология. — 2000. — Т. 40, № 9.
5. Калвиныш, И.Я. Милдронат и триметазидин: сходство и различие // Terra Medica Nova. — 2002. — № 2. — С. 3-5.
6. Berger P. Restenosis, reocclusion and adverse cardiovascular events after successful balloon angioplasty of occluded versus nonoccluded coronary arteries: results from the Multicenter American Research Trial with Cilazapril after Angioplasty to prevent Transluminal coronary Obstruction and Restenosis (MARCATOR) // J. Am. Coll. Cardiol. — 1996. — №27. — P.1-7.
7. Cashin-Hemphill L. Dinsmore R. et al. Atherosclerosis progression in subjects with and without post-angioplasty restenosis in QUIET // J. Am. Coll. Cardiol. — 1997. — № 29. — P.418.
8. Cooke G., Liu-Stratton A. Ferketich M. et al. The FRISC Group. Risk of myocardial infarction and death during treatment with low dose aspirin and intravenous heparin in men with unstable coronary artery disease // Lancet. — 1990. — № 336. — P. 827-830.

Abstract

The molecular effects of trimetazidine and mildronate were investigated in patients with stable effort angina, Functional Class (FC) I-III. The comparison criteria included blood activity and concentrations of the main products of free-radical oxidation and the components of Krebs cycle and anti-oxidant system. Proteomic methods were also used. Trimetazidine and mildronate could be recommended as cardio-protectors in primary and secondary prevention of FC I-III coronary heart disease.

Key words: Coronary heart disease, free-radical oxidation, cytochemistry, proteomics, trimetazidine, mildronate.

Поступила 18/07-2009