

*На правах рукописи*

**Чудиновских Юлия Анатольевна**

**РЕЗИДЕНТНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ СЕРДЦА И ИХ РОЛЬ В  
РАЗВИТИИ ГИПЕРТРОФИИ МИОКАРДА**

14.01.05. - кардиология

**АВТОРЕФЕРАТ**

Диссертации на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

**МОСКВА**

**2011**

Работа выполнена в Государственном Учреждении Научном Центре Сердечно-Сосудистой Хирургии им. А.Н.Бакулева РАМН

**Научные руководители:**

доктор медицинских наук, профессор, академик РАМН Бокерия Лео Антонович;

доктор биологических наук Еремеева Марина Викторовна.

**Официальные оппоненты:**

**Сыркин Абрам Львович** - доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой профилактической и неотложной кардиологии Факультета Постлевузовского Профессионального Образования Врачей Государственного Учреждения Высшего Профессионального Образования Первого Московского Государственного Медицинского Университета им. И.М. Сеченова Министерства Здравоохранения и Социального Развития Российской Федерации;

**Ключников Иван Вячеславович** - доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник отделения хирургического лечения ишемической болезни сердца и миниинвазивной коронарной хирургии Научного Центра Сердечно-Сосудистой Хирургии им.А.Н.Бакулева РАМН.

**Ведущая организация:** Федеральное Государственное Учреждение Российский Кардиологический Научно-Производственный Комплекс Министерства Здравоохранения и Социального Развития Российской Федерации.

Защита диссертации состоится «11» марта 2011 года в 14.00 на заседании диссертационного совета Д.001.015.01. Научного Центра Сердечно-Сосудистой Хирургии им.А.Н.Бакулева РАМН по адресу: 121552, Москва, Рублевское шоссе, 135.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Научного Центра Сердечно-Сосудистой Хирургии им.А.Н.Бакулева РАМН.

Автореферат разослан «10» февраля 2011г.

Ученый Секретарь Диссертационного Совета НЦ ССХ им. А.Н.Бакулева РАМН  
доктор медицинских наук Газизова Динара Шавкатовна

## ВВЕДЕНИЕ.

О регенерации сердца и резидентных стволовых клетках миокарда (РСКМ) продолжают многолетние дебаты. С одной стороны, факт открытия РСКМ был воспринят с большим энтузиазмом учеными, так как появилась возможность создания новых технологий восстановления поврежденного миокарда. С другой стороны, новую концепцию регенерации сердца оппоненты восприняли скептически. Было высказано предположение, что это научное открытие является результатом анализа артефактов. В настоящее время относительно мало данных известно о роли РСКМ человека в клеточном гомеостазе и при различных формах патологии сердца.

Гипертрофическая кардиомиопатия (ГКМП) является распространенным генетически детерминированным заболеванием и частой причиной внезапной сердечной смерти людей трудоспособного возраста. Патогенез ГКМП достаточно сложен и включает динамическую обструкцию выводного отдела левого желудочка (ВОЛЖ), систолическое движение передней створки митрального клапана, диастолическую дисфункцию, ишемию миокарда, нарушения ритма и проводимости, увеличение толщины стенок сердца. В современной научной литературе отсутствуют комплексные данные анализа экспрессии маркеров пролиферации и маркеров клеток-предшественников при оценке морфологических проявлений этого заболевания, и очень ограничено представление о роли РСКМ в патогенезе ГКМП. До конца неизвестно гипертрофия или гиперплазия КМЦ ведет к развитию и прогрессированию ГКМП. Для создания эффективных методов лечения необходимо учитывать современное представление о клеточных механизмах, играющих ключевую роль в развитии заболевания.

Исходя из вышеизложенного **целью** нашего исследования было изучение РСКМ и их роли в развитии гипертрофии миокарда.

В качестве модели развития гипертрофии нами было выбрано заболевание «гипертрофическая кардиомиопатия».

В соответствии с целью были поставлены следующие **задачи**:

1. Выявить в миокарде РСКМ и оценить пролиферативный потенциал миокарда.

2. Проанализировать качественные и количественные характеристики субпопуляции РСКМ.

3. Проанализировать и охарактеризовать на гистологическом и ультраструктурном уровнях морфологические особенности строения миокарда у пациентов, страдающих ГКМП.

4. Сопоставить полученные результаты анализа пролиферативного потенциала с клинико-функциональными данными у пациентов с ГКМП различных возрастных групп.

### **Научная новизна исследования.**

Работа носит новаторский характер, так как впервые с применением метода иммуноконфокальной и электронной микроскопии на уникальном интраоперационном биопсийном материале дана комплексная характеристика спектра морфологических проявлений ГКМП, проведена оценка пролиферативного потенциала миокарда, выявлены РСКМ и клетки-предшественники КМЦ различной степени зрелости у пациентов с ГКМП. Определена взаимосвязь между полученными морфологическими данными и результатами клинического обследования пациентов с ГКМП. Впервые обнаружены особенности влияния медикаментозного лечения на пролиферативный потенциал и развитие гипертрофии миокарда при ГКМП.

### **Научно-практическая значимость исследования.**

Результаты исследования расширяют наши знания о механизмах патогенеза, ГКМП, что целесообразно учитывать при создании новых и совершенствовании уже существующих методов лечения. В работе определены параметры, различающие гипертрофию миокарда при обструктивной форме ГКМП на клеточном уровне в разных возрастных группах. Проведенная оценка пролиферативного потенциала миокарда и корреляционный анализ с клинико-функциональными параметрами позволили выделить две формы течения заболевания: наиболее агрессивную форму, проявляющуюся в более молодом возрасте, и менее злокачественного течения форму, проявляющуюся в старшем возрасте. Выявлены особенности влияния

медикаментозной терапии на пролиферативный потенциал миокарда при ГКМП. Полученные результаты необходимо учитывать при определении индивидуальной тактики лечения пациентов с обструктивной формой ГКМП.

#### **Внедрение в практику.**

Результаты работы опубликованы в 15 печатных работах, в том числе по теме исследования опубликовано 4 статьи в центральной печати. Результаты исследования представлены на научно-практических конференциях в России и зарубежом. Практические рекомендации учитываются при ведении пациентов с обструктивной формой ГКМП в НЦ ССХ им.А.Н.Бакулева РАМН. Результаты работы внедрены в педагогическую деятельность НЦ ССХ им. А.Н.Бакулева РАМН: используются в материалах лекций для ординаторов и аспирантов, проходящих последиplomное образование, для кардиологов и кардиохирургов, проходящих циклы усовершенствования на базе НЦ ССХ им. А.Н.Бакулева РАМН.

#### **Выносимые на защиту положения.**

1. В миокарде пациентов с обструктивной формой ГКМП в зависимости от возраста в разной степени развивается гипертрофия КМЦ, периваскулярный и интерстициальный фиброз, присутствуют мелкие незрелые пролиферативно активные КМЦ, пролиферативно активные зрелые КМЦ, клетки-предшественники КМЦ, экспрессирующие маркер стволовых клеток c-kit – «резидентные стволовые клетки миокарда».
2. В гипертрофированных КМЦ при обструктивной форме ГКМП одновременно выявляются признаки усиления и пролиферативной, и синтетической активности, атрофии, миолиза и нарушения пространственной ориентации миофибрилл.
3. При развитии гипертрофии миокарда взаимосвязано происходит гиперплазия клеток-предшественников и гипертрофия зрелых КМЦ, при этом пролиферативная активность зрелых КМЦ возрастает при увеличении толщины МЖП, градиента в ВОЛЖ и степени фиброза миокарда. Количество мелких незрелых пролиферативно активных КМЦ и клеток-предшественников КМЦ увеличивается с усилением степени гипертрофии КМЦ и фиброза миокарда МЖП.

**Апробация** диссертации состоялась 9 июня 2010 года на заседании апробационного совета НЦССХ им. А.Н.Бакулева РАМН.

Диссертация изложена на 136 страницах и состоит из введения, 3 глав (литературный обзор, материалы и методы, собственные результаты и обсуждение полученных результатов), заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Диссертация содержит 7 таблиц и 37 рисунков. Библиографический указатель включает 13 отечественных и 206 зарубежных источников литературы.

### **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.**

В исследование включено 38 взрослых пациентов с обструктивной формой ГКМП, проходивших обследование и лечение в НЦ ССХ им. А.Н.Бакулева РАМН с декабря 2007 по февраль 2010 года. Общеклинические методы обследования пациентов включали анамнез и осмотр. Применялись стандартные методы лабораторно-инструментальной диагностики: клинический и биохимический анализ крови, ЭКГ и ЭхоКГ, рентгенологическое исследование органов грудной клетки, МРТ сердца и коронароангиографию. Средний возраст пациентов составил  $39,3 \pm 12,6$  лет. Все пациенты на дооперационном этапе получали медикаментозное лечение: наибольшая часть пациентов принимала бета-адреноблокаторы (34 человека - 90%), блокаторы кальциевых каналов принимали 3 пациента (8%), ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента получали 7 пациентов (18%), нитросодержащие препараты получали 6 человек (16%), диуретическая терапия (верошпирон) проводилась у 28 пациентов (74%), статины принимали 5 человек (13%), варфарин был назначен у 1 пациента (3%), кордарон получали 4 пациента (11%), антиагреганты принимали 5 человек (13%).

Хирургическое лечение пациентов проводилось по методу Бокерия: устранение обструкции ВОЛЖ доступом через правый желудочек в условиях искусственного кровообращения (ИК) и фармакохолодовой кардиopleгии (ФХКП).

Интраоперационные биоптаты миокарда МЖП были получены через  $15,7 \pm 5,9$  мин после пережатия аорты в условиях ИК и ФХКП с использованием раствора Кустодиол. Далее материал обрабатывали по общепринятой методике

приготовления парафиновых срезов. После окраски препаратов по методу «Picro Mallory trichrome» (Bio-Optica), при световой микроскопии с использованием программы Image-Pro определяли долю фиброза в миокарде на 20 случайно выбранных полях зрения при увеличении  $\times 40$ , в % к площади среза изучаемого препарата. Методом флуоресцентной иммуноконфокальной микроскопии (Leica TCS SPE) в миокарде выявляли пролиферативно активные КМЦ, экспрессирующие ядерный маркер пролиферации Ki67 и клетки, экспрессирующие поверхностный мембранный маркер стволовых клеток c-kit. Принадлежность Ki67<sup>+</sup>- и c-kit<sup>+</sup>-клеток к КМЦ определяли по специфическому окрашиванию антителами к саркомерному  $\alpha$ -актину. На 10 полях зрения при увеличении  $\times 25$  определяли плотность Ki67- и c-kit-позитивных КМЦ на единицу площади среза. Количество исследованных КМЦ на срезе составило  $150545 \pm 145561$  (4864-687986) на общей площади среза  $69115820 \pm 55934457$   $\text{мкм}^2$  ( $2963632$ - $172796723$   $\text{мкм}^2$ ). Для исследования ультраструктуры КМЦ МЖП больных ГКМП из части интраоперационного материала были сделаны полутонкие срезы ткани и окрашены по методу ШИК с докраской метиленовым синим, пранализированы под световым микроскопом. У 50 КМЦ в препарате для каждого больного (увеличение 100) измеряли диаметр клетки и ядер. По 4-х бальной шкале оценивали степень утраты миофибрилл: утрата миофибрилл не выявлена (0); утрата миофибрилл в КМЦ слабая (1), умеренная (2) или выраженная (3). Ультратонкие срезы анализировали в электронном микроскопе Philips CM100. Изучали особенности ультраструктуры КМЦ, отмечая наличие и степень выраженности в клетках признаков гипертрофии, пролиферативной активности и дистрофии.

Статистическую обработку результатов исследования проводили с применением программ Exel 2003 (Microsoft, США) и Statistica 7 (StatSoft, США).

## **РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.**

### **1. Особенности клинической картины заболевания ГКМП.**

Средний возраст пациентов, включенных в исследование, составил  $39,3 \pm 12,6$  лет. Все пациенты жаловались на слабость и утомляемость. У 5 пациентов

наблюдалась одышка в покое (13%) и у 38 (100%) пациентов одышка возникала при физической нагрузке. Жалобы на перебои в работе сердца и приступы сердцебиений предъявляли все пациенты (100%). Головокружение отмечалось у 19 (50%) пациентов. Отечный синдром наблюдался у 7 (18%) пациентов. На боли в области сердца при физической нагрузке жаловались все пациенты (100%), при этом боли локализовались в левой половине грудной клетки, носили длительный ноющий характер и проходили самостоятельно. Боли не были четко связаны с физической нагрузкой и на ЭКГ признаки ишемии не были обнаружены. При коронароангиоентрикулографии атеросклеротические изменения коронарных артерий были выявлены у 3 пациентов (в 1 случае гемодинамически значимое поражение ПМЖВ). Отягощенный семейный анамнез по ГКМП был у 15 (40%) пациентов. ГКМП - генетически детерминированное заболевание, связанное с мутациями генов саркомерных и других белков, что ведет к широкому спектру клинических проявлений заболевания [Maron B. et al., 2003; Maron B. et al., 2006]. Превалирующими симптомами ГКМП являются: одышка и боли в груди при нагрузке и в покое, слабость и головокружение, синкопальные состояния [Douglas Wigle E. et al., 1995; Maron B.J. et al., 2003]. Синкопальные состояния отмечались у 7 (18%) пациентов. По данным Spirito P. и соавторов частота появления синкопе составляет 14% при ГКМП [2009].

При предоперационном обследовании пациентов с обструктивной формой ГКМП были зарегистрированы и сопутствующие заболевания. Верифицирована ИБС у 3 (8%) пациентов, у 3 (8%) пациентов в анамнезе был перенесенный острый инфаркт миокарда, в одном случае заболевание впервые дебютировало после перенесенного постинфекционного миокардита (3%), гиперхолестеринемия определялась у 9 (24%) пациентов, гипертоническая болезнь была диагностирована у 17 (45%) пациентов. Хроническим бронхитом страдали 2 (5%) пациента. Большая часть пациентов страдала хроническим гастритом – 16 (42%) пациентов, язвенная болезнь желудка была верифицирована у 2 (5%) пациентов. У 4 (11%) пациентов в анамнезе был хронический холецистит. Ожирением страдали 21 (55%) пациент, гиперурикемия у 1 (3%) пациента, у 1 пациента (3%) был сахарный диабет 2 типа. У



3 пациентов (8%) в анамнезе была мочекаменная болезнь, хроническим пиелонефритом страдали 2 (5%) пациента и у 2 пациентов (5%) был диффузный эутиреоидный зоб. Варикозная болезнь вен нижних конечностей была у 1 (3%) пациента, миома матки у 1 (3%) пациента, дисфункция яичников у 2 (5%) пациенток, у 1 (3%) был нейрофиброматоз и у 1 (3%) пациента в анамнезе была меланома кожи.

Сердечная недостаточность у пациентов с ГКМП оценивалась по классификации сердечной недостаточности Нью-Йоркской Ассоциации Сердца (NYHA). Функциональный класс I NYHA был у 3 пациентов. У 1 пациента сердечная недостаточность была III функционального класса, у 34 пациентов ХСН проявилась во II функциональном классе по классификации NYHA. В среднем функциональный класс ХСН составил  $1,9 \pm 0,6$ . Согласно литературным данным у большинства пациентов с ГКМП функциональный класс ХСН был в пределах I-II и у 18% - ХСН была III-IV функционального класса по NYHA [Fay W.P. et al., 1990].

Нарушения ритма и проводимости - ранние и неспецифические симптомы ГКМП. В группе пациентов, включенных в исследование, наиболее часто определялась эктопическая активность: суправентрикулярная экстрасистолия у 7 пациентов (18%) и желудочковые экстрасистолы у 28 (74%) пациентов, что сопоставимо с результатами исследований других авторов [Selcuk Adabag A. et al., 2008]. Суправентрикулярная и желудочковая экстрасистолия регистрировалась у 32 (84%) пациентов. Нарушения проводимости в виде блокады ножек пучка Гиса были у 30 (79%) пациентов. Пароксизмальной формой мерцательной аритмии страдали 3 (8%) пациента, 2 из которых постоянно принимали кордарон. Радиочастотная абляция устьев легочных вен была выполнена 2 из 3 пациентов с пароксизмальной формой фибрилляции предсердий. По данным литературы частота появления фибрилляции предсердий при ГКМП может достигать 24% [Olivotto I. et al., 2001]. Пароксизмальная форма желудочковой тахикардии была диагностирована у 1 (3%) пациента. Частота пароксизмальной желудочковой тахикардии при ГКМП составляет до 14% [Selcuk Adabag A. et al., 2008]. Пароксизмальная наджелудочковая тахикардия регистрировалась у 1 (3%) пациента, однако частота этой формы аритмии

при ГКМП может достигать 23% [Selcuk Adabag A. et al., 2008]. Одному пациенту в послеоперационном периоде в связи с развитием полной атриовентрикулярной блокады был имплантирован электрокардиостимулятор.

Анализ жалоб и осмотр пациентов с обструктивной формой ГКМП показал, что клиническая картина заболевания складывалась из признаков умеренно выраженной сердечной недостаточности, нарушений ритма и проводимости, у некоторых пациентов отмечались пре- и синкопальные состояния. Основными причинами обращения пациентов к врачу были слабость, повышенная утомляемость, ощущение сердцебиений и перебоев в работе сердца. Средний возраст на момент манифестации заболевания составил  $28,9 \pm 14,4$  лет. Время от первого появления симптомов до постановки диагноза в среднем было  $6,6 \pm 5,3$  лет. В некоторых случаях ГКМП скрывалось под «маской» другого заболевания: ИБС с развитием инфаркта миокарда в 3 (8%) случаях и «мимикрия» миокардита в 1 случае (3%). По данным литературы ГКМП может манифестировать в любом возрасте, при этом клиническая картина вариабельна, в том числе у членов одной семьи, являющихся носителями одной мутации [Maron B. et al., 2002].

При ЭхоКГ у включенных в исследование пациентов было выявлено: КДР<sub>ср</sub> ЛЖ и КСР<sub>ср</sub> ЛЖ составили  $41,3 \pm 5,7$  мм и  $23,1 \pm 4,9$  мм, КДО<sub>ср</sub> ЛЖ и КСО<sub>ср</sub> ЛЖ были  $80,5 \pm 24,4$  мл и  $23,6 \pm 10,2$  мл. Фракция выброса ЛЖ была в норме у всех пациентов (ФВЛЖ<sub>ср.</sub> =  $74,1 \pm 7,4\%$ ). Согласно литературным данным, ГКМП носит прогрессирующий характер в связи с постоянно происходящим процессом ремоделирования ЛЖ, что приводит в 3,5% случаев к развитию систолической дисфункции. У большинства пациентов с ГКМП в течение длительного периода систолическая функция остается сохранной [Harris K. et al., 2006]. У 38 пациентов (100%) в исследовании определялась диастолическая дисфункция, что является частью эхокардиографической картины ГКМП [Wigle E.D. et al., 1987]. У всех пациентов отмечалась дилатация полости ЛП (диаметр ЛП<sub>ср</sub>  $48,6 \pm 7,4$  мм), что согласуется с результатами исследований других авторов [Douglas Wigle E. et al., 1995]. Нарушение функции митрального клапана (МК) является одним из основных

признаков ГКМП [Klues H. G. et al., 1995]. У всех пациентов в нашем исследовании была недостаточность МК: недостаточность 1-2 степени определялась у 29 пациентов и 3-4 степени - у 9 пациентов. Пластика МК по Carpentier была выполнена 5 (13%) , протезирование МК было выполнено у 3 (8%) пациентов. Среднее значение градинета на ВОЛЖ составило  $90,8 \pm 34,0$  мм рт. ст., поэтому у всех пациентов была обструктивная форма заболевания согласно принятой классификации ГКМП [Шиллер и соавт. 2007]. Отмечалось увеличение средних показателей толщины стенок ЛЖ: ср.Тмжп  $24,3 \pm 4,7$  мм и ср.Тзслж  $16,4 \pm 3,4$  мм, что является патогномоничным признаком ГКМП [Douglas Wigle E. et al., 1995; Шиллер и соавт. 2007]. При проведении МРТ-исследования сердца были получены результаты, сопоставимые с результатами ЭхоКГ. Среднее значение массы миокарда ЛЖ было  $217,1 \pm 60,1$  г, во всех 38 (100%) случаях при контрастировании визуализировались участки фиброза миокарда.

## **2. Оценка морфологических признаков и пролиферативного потенциала миокарда пациентов с ГКМП.**

В миокарде МЖП пациентов с обструктивной формой ГКМП была обнаружена умеренная степень гипертрофии КМЦ: средний диаметр КМЦ составил  $23,9 \pm 5,0$  мкм (от 10,5 до 34 мкм) (рис. 1А), что сравнимо с результатами Kunkel В. и соавторов [1978]. Большинство КМЦ формировали боковые контакты с соседними КМЦ (рис. 1Б). В КМЦ у 18,4% пациентов обнаружены умеренные зоны утраты миофибрилл (зоны миолиза), в большинстве КМЦ эти зоны были незначительными (рис. 1Б). Степень выраженности миолиза прямо коррелировала с ФВ ЛЖ ( $r=0,45$ ,  $p=0,007$ ) и была выявлена обратная корреляция распространенности миолиза с КСО ЛЖ ( $r=-0,37$ ,  $p=0,03$ ) у этих пациентов. У 5 из 30 (16,7%) больных в миокарде МЖП обнаружены единичные клетки с крайней степенью утраты миофибрилл, в цитоплазме которых находились митохондрии, гранулы гликогена и фрагменты Z-структур. У 22 из 38 (57,9%) больных отмечено непараллельное расположение миофибрилл (disarray) (рис. 2), характерное для ГКМП в большей степени, чем для других заболеваний сердца [Maron B.J. et al., 1974; Varnava A.M. et al., 2000]. У 8

больных нарушение параллельной ориентации миофибрилл определено менее чем в 25% КМЦ, у 5 больных – примерно в 50% КМЦ и у 9 больных – более чем в 75% КМЦ. По данным литературы [Maron B.J. et al., 1979; Varnava A.M. et al., 2000] непараллельное расположение миофибрилл в КМЦ при ГКМП не связано с изменениями толщины стенки ЛЖ и МЖП. Нами было обнаружено, что КМЦ с непараллельно расположенными миофибриллами чаще встречались у больных с небольшими показателями толщины задней стенки ЛЖ ( $r=-0,49$ ,  $p=0,007$ ), у пациентов более молодого возраста ( $r=-0,46$ ,  $p=0,004$ ) и у пациентов с большей степенью гипертрофии КМЦ МЖП ( $r=0,52$ ,  $p=0,001$ ). Обратную корреляцию степени выраженности нарушения параллельной ориентации миофибрилл с возрастом больных ГКМП описывали и другие авторы [Varnava A.M. et al., 2000]. Зоны фиброза миокарда составили от 7 до 72 % (ср. степень распространенности фиброза миокарда по данным световой микроскопии  $42\pm 15\%$ ) изучаемой площади среза препарата миокарда. Фиброз был распложен периваскулярно (рис. 3А) или интерстициально (рис. 3Б). Корреляции степени фиброза миокарда с морфометрическими параметрами и клиническими показателями больных ГКМП в нашем исследовании не выявлены. В литературе ранее были описаны положительные корреляции степени распространенности фиброза миокарда с диаметром КМЦ [Sugihara N. et al., 1990], максимальной толщиной стенки ЛЖ и массой сердца [Varnava A.M. et al., 2000].

При электронной микроскопии миокарда МЖП при ГКМП определены ультраструктурные изменения, характерные для гипертрофии КМЦ [Ferrans V.J. et al., 1975; Maron B.J. et al., 1978]. В КМЦ были выявлены признаки усиления синтетической активности: крупные ядра неправильной формы с инвагинациями ядерной оболочки и большим количеством ядрышек ( $r=0,74$ ,  $p<0,001$ ) (рис. 4А), в околоядерной зоне наряду с признаками утраты миофибрилл в большом количестве определялись митохондрии, липофусцин и развитый эндоплазматический ретикулум ( $r=0,38$ ,  $p=0,04$ ) (рис. 4А и Б). Ранее наличие признаков усиления синтетической активности КМЦ при ГКМП было описано рядом авторов [Matturi et al., 1995; Гудкова А. Я. и др., 2003]. При анализе ультраструктуры КМЦ в саркоплазме наблюдалось повышенное содержание миофибрилл, в некоторых КМЦ встречались

структуры комплекса Гольджи с расположенными рядом электронно-плотными гранулами, подобными предсердным. Во многих КМЦ выявлялось расширение трубочек Т-системы (рис. 5), которое в литературе описано как одно из проявлений гипертрофии КМЦ, необходимое для поддержания стандартного соотношения между объемом и поверхностью гипертрофированной клетки [Page E., et al. 1973]. В саркоплазме единичных КМЦ были обнаружены разного размера очаги миолиза, заполненные гликогеном и митохондриями (рис. 6А). КМЦ были неправильной формы, с непараллельным расположением миофибрилл ( $r=0,54$ ,  $p=0,002$ ). У многих КМЦ были боковые отростки и множественные вставочные диски. Количество боковых отростков КМЦ было выше у больных с более высоким градиентом в ВОЛЖ ( $p=0,03$ ). В отдельных КМЦ с крупными ядрами неправильной формы определялись известные по литературе дистрофические изменения КМЦ при ГКМП [Maron B.J. et al., 1978] (рис. 6Б) – накопление миелоноподобных телец и фагосом ( $r=0,44$ ,  $p=0,02$ ),  $\alpha$ -гликогена ( $r=0,52$ ,  $p=0,002$ ), липидных капель. У 1 больного в нескольких КМЦ были выявлены центриоли - признак пролиферативной активности клетки (рис.7).

При иммуноконфокальной микроскопии в миокарде МЖП при ГКМП были обнаружены две группы Ki67<sup>+</sup>-пролиферативно активных КМЦ: зрелые КМЦ (ср. диаметр  $28,8 \pm 21,5$  мкм (рис.8 А) и мелкие округлые КМЦ, с тонким ободком саркоплазмы, содержащей саркомерный  $\alpha$ -актин (ср. диаметр  $5,9 \pm 1,7$  мкм) (рис. 8Б). Экспрессия маркера пролиферации Ki67 свидетельствовала о выходе клеток из стадии покоя G<sub>0</sub> и начале клеточного цикла. Появление этих двух типов клеток в миокарде было взаимосвязано ( $r=0,62$ ,  $p=0,00003$ ) и коррелировало со степенью фиброза миокарда (соответственно:  $r=0,43$ ,  $p=0,007$  и  $r=0,36$ ,  $p=0,03$ ). Зрелые Ki67<sup>+</sup>-КМЦ были обнаружены в количестве 128,6 (от 43,6 до 329,8) на 1млн КМЦ у 37 из 38 (97%) пациентов. Мелкие Ki67<sup>+</sup>-КМЦ, экспрессирующие маркер пролиферации, были выявлены у 35 из 38 (92%) больных в количестве 190,4 на 1млн КМЦ (от 58,9 до 454,2) (см. таблицу 1). При увеличении толщины МЖП увеличивалось и количество зрелых Ki67<sup>+</sup>- КМЦ ( $r=0,34$ ,  $p=0,047$ ). Также количество зрелых Ki-67<sup>+</sup>-КМЦ увеличивалось при нарастании градиента давления ВОЛЖ ( $r=0,34$ ,  $p=0,044$ ). В

нашем исследовании количество мелких Ki67<sup>+</sup>-КМЦ увеличивалось с нарастанием степени гипертрофии КМЦ ( $r=0,35$ ,  $p=0,03$ ). Ранее было обнаружено, что активация мелких клеток-предшественников КМЦ связана с развитием гипертрофии, полиплоидии взрослых КМЦ и с гетерогенностью состава исходной популяции КМЦ у больных ГКМП [Urbanek K. et al., 2003]. Исследований, посвященных изучению высокодифференцированных КМЦ с признаками пролиферативной активности в миокарде человека, сравнительно немного. Проводилась оценка экспрессии разных маркеров пролиферации, что привело к сильному разбросу данных о количестве и роли пролиферативно активных клеток в прогрессировании заболевания [Matturri L. et al., 2002; Шляхто Е.В. и др., 2007].

*Таблица 1. Количество пролиферативно активных КМЦ различной степени зрелости у пациентов с ГКМП.*

| Тип клеток                                 | Количество клеток (Ме) |
|--------------------------------------------|------------------------|
| зрелые Ki67+/α sarc+/ 10 <sup>6</sup> КМЦ  | 128,6                  |
| мелкие Ki67+/α sarc+ / 10 <sup>6</sup> КМЦ | 190,4                  |
| РСКМ c-kit+/α sarc+/ 10 <sup>6</sup> КМЦ   | 50,9                   |

C-kit-положительные клетки-предшественники КМЦ, рассматриваемые нами как резидентные стволовые клетки миокарда, содержащие саркомерный α-актин, обнаружены у 32 (84%) пациентов. C-kit<sup>+</sup>-α-sarc<sup>+</sup>-КМЦ имели средний диаметр 7,1±1,7 мкм и располагались, как правило, в интерстициальном пространстве единично или небольшими группами (рисунок 9). Количество C-kit<sup>+</sup>-клеток составило 50,9 (от 22,1 до 279,4) клеток на 1 млн КМЦ (см. таблицу 1). C-kit<sup>+</sup>-клетки-предшественники КМЦ диаметром 6±2 мкм были найдены в миокарде ЛЖ больных с аортальным стенозом [Urbanek K. et al., 2003] и больных ИБС [Urbanek K. et al., 2005] в аутопсийном материале. По нашим данным количество c-kit<sup>+</sup>-клеток-предшественников КМЦ прямо коррелирует с количеством зрелых ( $r=0,50$ ,  $p=0,0017$ ) и мелких незрелых ( $r=0,50$ ,  $p=0,0015$ ) пролиферативно активных КМЦ, а также со степенью гипертрофии КМЦ ( $r=0,51$ ,  $p=0,001$ ) и степенью фиброза миокарда МЖП ( $r=0,48$ ,  $p=0,0025$ ) в общей группе пациентов. Выявление в миокарде клеток,

экспрессирующих маркер стволовых клеток (c-kit) дало нам основание считать их резидентами стволовыми клетками миокарда, способными дать начало и кардиомиоцитам, и гладко-мышечным клеткам, и эндотелиоцитам.

При анализе влияния медикаментозного лечения на течение заболевания в общей группе пациентов с ГКМП на клеточном уровне нами было обнаружено, что прием бета-адреноблокаторов ведет к уменьшению количества пролиферативно активных зрелых КМЦ и РСКМ. У пациентов, которые принимали бета-адреноблокаторы до операции было достоверно меньшее количество крупных пролиферативно активных КМЦ ( $r=-0,42$ ;  $p=0,008$ ) и меньше РСКМ ( $r=-0,42$ ;  $p=0,009$ ). А у пациентов, которые получали ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента было выявлено достоверно меньшее количество пролиферативно активных мелких клеток-предшественников КМЦ ( $r=-0,47$ ;  $p=0,002$ ). У пациентов, которые принимали верошпирон обнаружена гипертрофия КМЦ в менее выраженной степени ( $r=-0,38$ ;  $p=0,02$ ) и отмечено достоверно меньшее количество пролиферативно активных мелких КМЦ ( $r=0,37$ ;  $p=0,02$ ) в отличие от пациентов, которые не принимали препарат.

### **3. Морфологические и функциональные особенности обструктивной формы ГКМП в разных возрастных группах.**

Все пациенты общей группы (18-61 год) при проведении корреляционного анализа по результатам изучения морфологических особенностей миокарда и клинико-функциональных параметров были разделены на две возрастные категории - от 18 до 45 лет включительно (27 пациентов, средний возраст  $33,1 \pm 8,8$  лет) и от 46 лет до 61 года (11 пациентов, ср. возраст  $54,5 \pm 5,5$  лет).

Пациенты первой группы имели достоверно более низкие показатели градиента на ВОЛЖ ( $81,6 \pm 28,5$  по сравнению с  $111,6 \pm 37,8$  мм рт.ст.) и КДР ЛЖ ( $4,0 \pm 0,5$  по сравнению с  $4,4 \pm 0,7$  мм), достоверно более высокие показатели гипертрофии КМЦ (средний диаметр КМЦ  $25,1 \pm 4,4$  по сравнению с  $21,0 \pm 5,5$  мкм) и степени выраженности непараллельного расположения миофибрилл, чем пациенты второй группы. Менее выраженное нарушение пространственной ориентации миофибрилл с возрастом у больных ГКМП описывали и другие авторы [Varnava

А.М., et al., 2001]. В классических работах Spirito P. и Maron B.J. была продемонстрирована высокая степень гипертрофии стенки ЛЖ у молодых пациентов ГКМП (21-30 лет) по сравнению с пациентами старшего возраста и отмечалось снижение темпов нарастания гипертрофии стенки ЛЖ у пациентов с возрастом при наблюдении этого процесса в динамике в течение 3-6 лет [Spirito P., Maron B.J., 1989]. Аналогичные закономерности изменения показателей гипертрофии миокарда и плоидности КМЦ в разных возрастных группах выявили Шляхто Е.В. и соавт [2007].

В нашем исследовании у пациентов в младшей и старшей возрастной группе были обнаружены зрелые пролиферативно активные КМЦ (зрелые Ki67+/ $\alpha$  sarc+ /  $10^6$  КМЦ 129 (39 - 324) и 141 (48 - 642),  $p > 0,05$ ), мелкие пролиферативно активные клетки-предшественники КМЦ (мелкие Ki67+/ $\alpha$  sarc+ /  $10^6$  КМЦ 179 (70 - 357) и 180 (19 - 493),  $p > 0,05$ ) и РСКМ (c-kit+/ $\alpha$  sarc+ /  $10^6$  КМЦ 45 (24 - 295) и 207 (21 - 618),  $p > 0,05$ ).

Корреляционный анализ между клинико-морфологическими показателями в каждой из выделенных нами групп позволил выявить изменение соотношения между размерами КМЦ, количеством мелких пролиферирующих Ki67-позитивных КМЦ с показателями объема и размеров полости ЛЖ. В младшей группе размеры КМЦ МЖП достоверно были больше при меньшем КСР ЛЖ ( $r = -0,45$ ,  $p = 0,02$ ), а в старшей группе КМЦ достоверно были более мелкими при меньшем КСО ЛЖ ( $r = 0,68$ ,  $p = 0,02$ ). Кроме того, доля мелких Ki67-позитивных КМЦ МЖП в младшей группе достоверно была больше у больных с меньшим КДО ЛЖ ( $r = -0,49$ ,  $p = 0,01$ ) и КСО ЛЖ ( $r = -0,53$ ,  $p = 0,005$ ). Таким образом, в младшей возрастной группе уменьшение объемных показателей ЛЖ связано с увеличением размеров КМЦ и относительно высокой степенью гиперплазии клеток-предшественников КМЦ, что предполагает развитие гипертрофии ткани и за счет гипертрофии клеток, и за счет гиперплазии клеток-предшественников. Возможно, это является причиной более агрессивного характера течения заболевания в группе пациентов молодого возраста и при отсутствии лечения может неблагоприятно влиять на прогноз заболевания. В старшей группе число пролиферативно активных мелких клеток-предшественников



было достоверно меньше при меньшем КСР ЛЖ ( $r = 0,77$ ,  $p = 0,01$ ). С возрастом степень развития гипертрофии КМЦ снижается, однако пролиферативный потенциал миокарда сохраняется, о чем свидетельствует факт выявления у пациентов старшего возраста пролиферативно активных клеток различной степени зрелости и, в том числе, РСКМ. В старшей возрастной группе уменьшение полости ЛЖ происходит за счет гиперплазии и менее выраженной гипертрофии зрелых КМЦ, что ведет к дальнейшему прогрессированию заболевания.

### **ВЫВОДЫ**

1. В миокарде взрослых больных при обструктивной форме ГКМП выявлена умеренная степень гипертрофии КМЦ и выраженный периваскулярный и интерстициальный фиброз, присутствуют мелкие незрелые пролиферирующие КМЦ, пролиферативно активные зрелые КМЦ и клетки-предшественники КМЦ, экспрессирующие маркер стволовых клеток c-kit - «резидентные стволовые клетки миокарда».
2. В КМЦ при ГКМП определены ультраструктурные признаки гипертрофии и повышения синтетической активности, атрофии и дегенерации, непараллельного расположения миофибрилл и, в редких случаях, утраты миофибрилл.
3. Пролиферативная активность зрелых КМЦ повышается при увеличении толщины МЖП, нарастании градиента в ВОЛЖ и увеличении степени фиброза миокарда.
4. Количество мелких незрелых пролиферирующих КМЦ и клеток-предшественников КМЦ увеличивается при нарастании степени гипертрофии КМЦ и фиброза миокарда МЖП.
5. При применении бета-адреноблокаторов в нашем исследовании выявлено снижение пролиферативного потенциала миокарда за счет уменьшения количества пролиферативно активных зрелых КМЦ и РСКМ. При применении ингибиторов ангиотензин-превращающего фермента и антагонистов альдостерона обнаружено уменьшение количества пролиферативно активных мелких КМЦ. При применении антагонистов альдостерона снижается и степень развития гипертрофии КМЦ.
6. В процессе развития гипертрофии миокарда при ГКМП параллельно происходит и гиперплазия мелких клеток-предшественников КМЦ и РСКМ, и

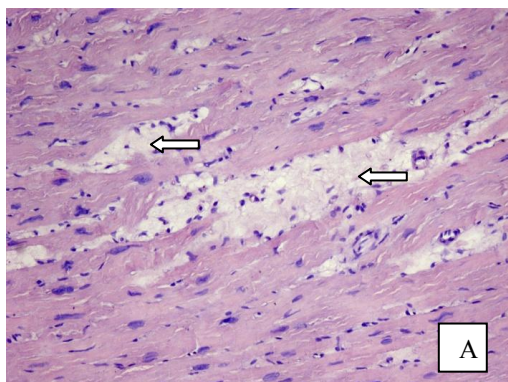
гипертрофия зрелых КМЦ. В молодом возрасте гипертрофия миокарда развивается за счет относительно высокой степени гипертрофии КМЦ и активной пролиферации мелких незрелых клеток-предшественников КМЦ. У пациентов старшего возраста степень развития гипертрофии КМЦ ниже, в то время как пролиферативный потенциал миокарда сохраняется, за счет пролиферации мелких клеток-предшественников КМЦ.

### **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.**

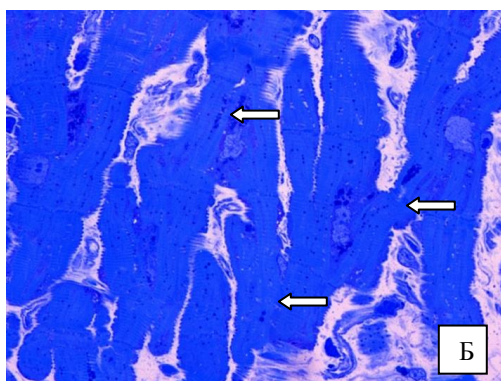
1. Комплексная оценка патоморфологических изменений и пролиферативного потенциала миокарда при ГКМП, проведенная с помощью световой, конфокальной и электронной микроскопии помогает понять закономерность проявления клинической симптоматики и целенаправленно воздействовать на механизмы патогенеза заболевания с помощью медикаментозных и хирургических методов лечения.
2. В молодом возрасте течение обструктивной формы ГКМП имеет более агрессивный характер, подтвержденный на клеточном уровне, что требует своевременного направления пациентов на хирургическое лечение.
3. Выявленный пул резидентных стволовых клеток миокарда и клеток-предшественников КМЦ на различных стадиях дифференцировки при ГКМП в различных возрастных группах свидетельствует о пролиферативном потенциале сердца, который активируется в условиях генетически детерминированного нарушения архитектоники сократительных элементов и увеличения доли соединительной ткани в миокарде. При отсутствии лечения это способствует дальнейшему прогрессированию заболевания.

## ПРИЛОЖЕНИЕ.

Рисунок 1. Гипертрофированные КМЦ МЖП при ГКМП.

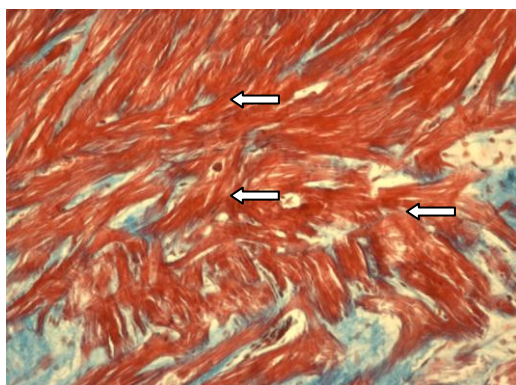


А. Общий вид миокарда. Крупные КМЦ с ядрами сложной формы. Очаги периваскулярного фиброза. Световая микроскопия. Окраска гематоксилином-эозином. Увел. ок.10 × об.40. Пациент М., 59 лет. Диагноз: Обструктивная форма ГКМП. НК II ФК НУНА.



Б. Разветвление КМЦ с образованием широких боковых отростков, соединяющих клетки соседних мышечных волокон. Световая микроскопия. Окраска ШИК. Увел. ок.10 × об.100. Пациент Г., 59 л. Диагноз: Обструктивная форма ГКМП. НК II ФК НУНА.

Рисунок 2. Непараллельное расположение миофибрилл (disarray) в миокарде МЖП у пациентов с обструктивной формой ГКМП.



Световая микроскопия. Окраска по Маллори. Увеличение ок.10 × об.20. Пациент Г., 59 л. Диагноз: Обструктивная форма ГКМП. НК II ФК НУНА.

Рисунок 3. Выраженный периваскулярный (А) и интерстициальный (Б) фиброз в миокарде МЖП при обструктивной форме ГКМП. Окраска по Маллори (коллаген окрашен синим цветом, мышечные фибриллы – красным, ядра клеток – черным). Увел. Ок.10 ×об.10. А. Пациент М., 25 л. Диагноз: Обструктивная форма ГКМП. НК II ФК НУНА. Б. Пациент 59 лет М. Диагноз: Обструктивная форма ГКМП. НК II ФК НУНА.

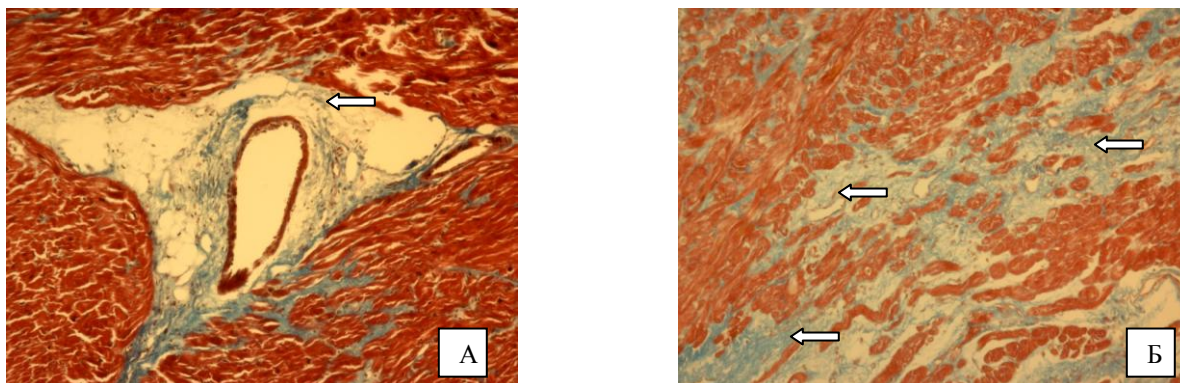
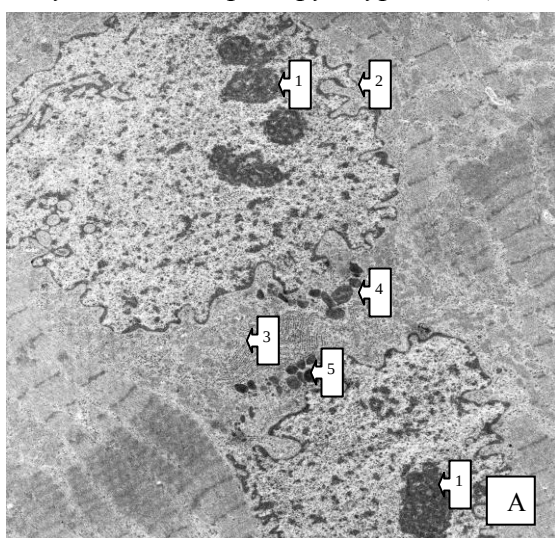
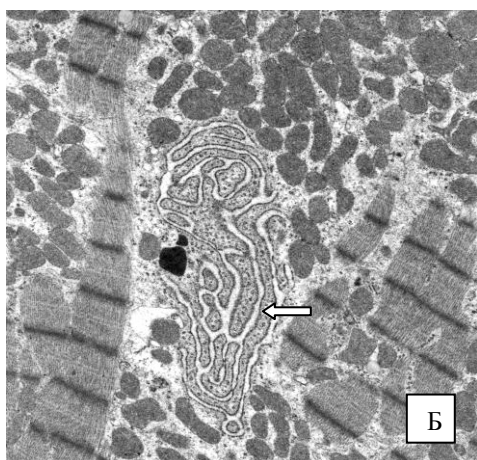


Рисунок 4. Ультраструктура КМЦ МЖП больных с обструктивной формой ГКМП.



А. Крупные ядра с большими ядрышками (1) и инвагинациями ядерной оболочки (2). В околоядерной зоне – эндоплазматический ретикулум (3), митохондрии (4), липофусцин (5). Увел×3810. Пациент Т., 27 лет. Диагноз: Обструктивная форма ГКМП. НК II ФК НУНА.



Б. Гипертрофированный гранулярный эндоплазматический ретикулум. Увел. ×6500. Пациент М., 19 лет. Диагноз: Обструктивная форма ГКМП. НК II ФК НУНА.



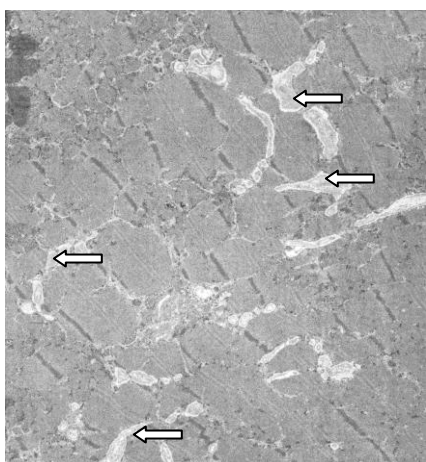
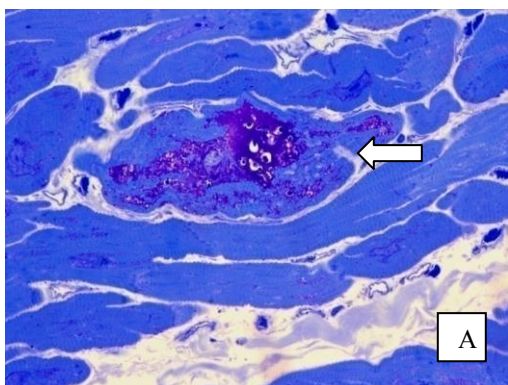
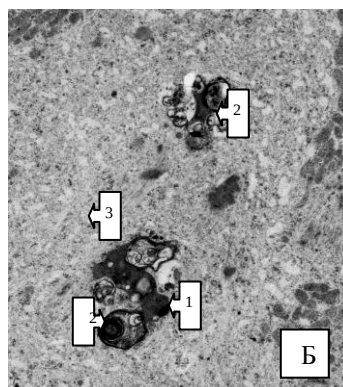


Рисунок 5. Расширение каналов Т-системы в гипертрофированных КМЦ МЖП. Электронная микрофотография. Увел.  $\times 4800$ . Пациент Т., 58 лет. Диагноз: Обструктивная форма ГКМП. НК II ФК НУНА.

Рисунок 6. Дистрофические изменения в КМЦ МЖП при обструктивной форме ГКМП.



А. Единичный КМЦ с признаками утраты миофибрилл и выраженной дегенерацией. Окраска ШИК. Увел. ок.10  $\times$  об.100. Пациент К., 49 л. Диагноз: Обструктивная форма ГКМП. НК II ФК НУНА.



Б. Миелиноподобные тельца (1) и аутофагосомы (2) в зоне саркоплазмы без миофибрилл (3). Увел.  $\times 8400$ . Пациент П., 48 лет. Диагноз: Обструктивная форма ГКМП. НК II ФК НУНА.

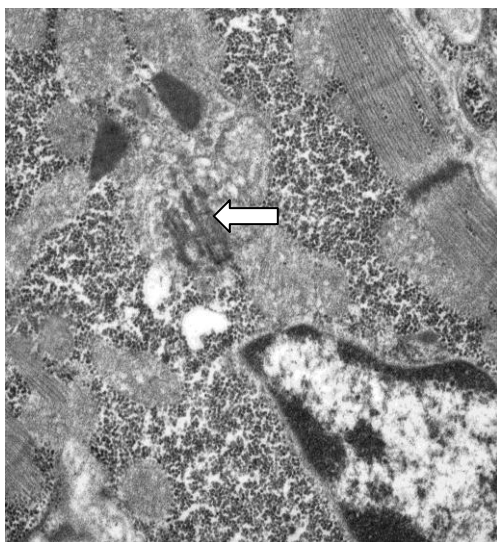
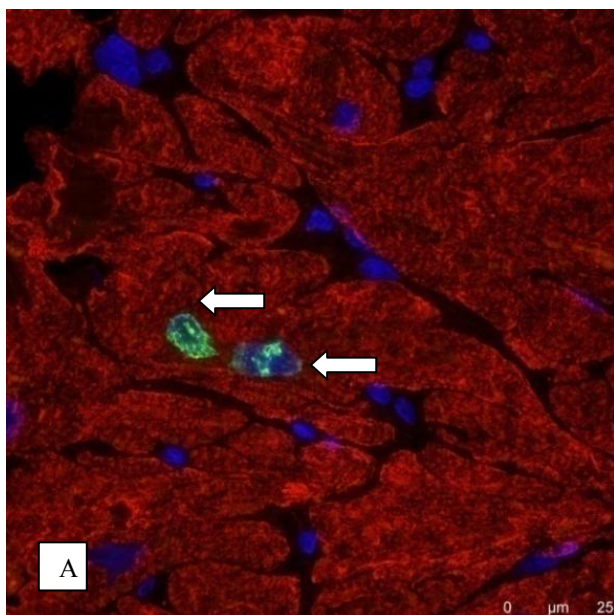


Рисунок 7. Центриоли в околоядерной зоне саркоплазмы КМЦ. Электронная микрофотография. Ув.  $\times 15000$ . Пациент А., 18 лет. Диагноз: Обструктивная форма ГКМП. НК II ФК НУНА.

Рисунок 8. Ki67-позитивные КМЦ в МЖП пациентов с обструктивной формой ГКМП. Иммуноконфокальная микроскопия (зеленая флуоресценция - Ki67-окрашенные ядра (Alexa 488), красная флуоресценция - саркомерный  $\alpha$ -актин (Alexa 546), синяя флуоресценция – ядра (DAPI)).

8А. Зрелые Ki67-позитивные КМЦ. Пациент В. 33г. Диагноз: Обструктивная форма ГКМП. НК II ФК NYHA.



8Б. Мелкие Ki67-позитивные КМЦ. Пациент В. 33г. Диагноз: Обструктивная форма ГКМП. НК II ФК NYHA.

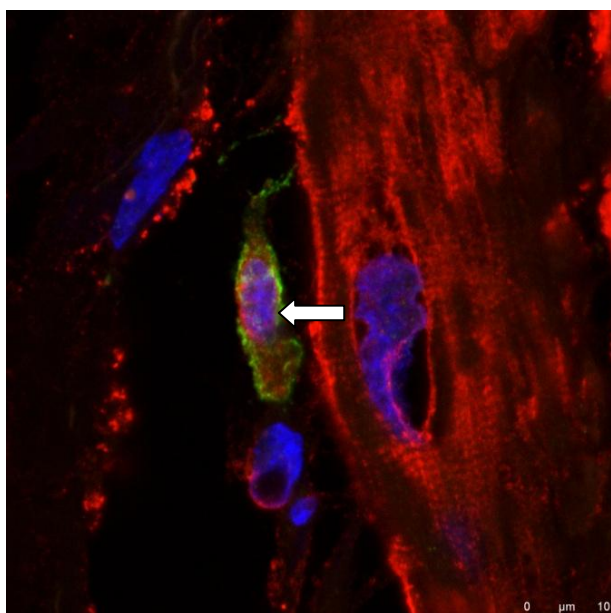
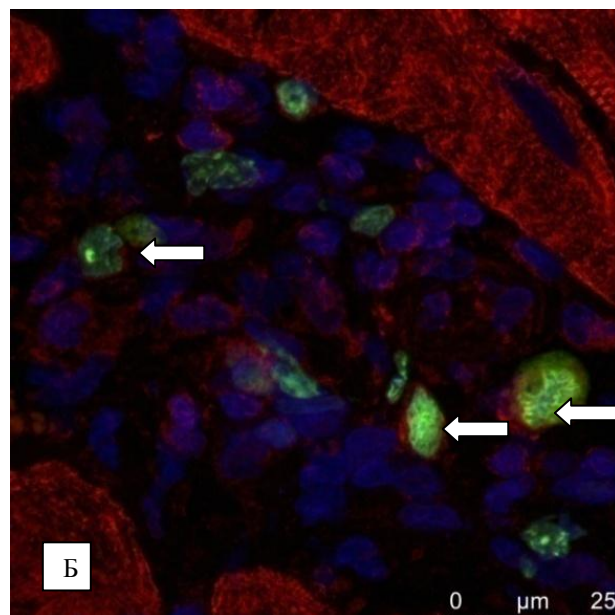


Рисунок 9. C-kit<sup>+</sup>-клетки-предшественники КМЦ в МЖП при ГКМП. Иммуноконфокальная микроскопия: зеленая флуоресценция – c-kit<sup>+</sup>-окрашивание плазматической мембраны (Alexa 488), красная флуоресценция - саркомерный  $\alpha$ -актин (Alexa 546), синяя флуоресценция – ядра (DAPI). А. Пациент В., 33г. Диагноз: Обструктивная форма ГКМП. НК II ФК NYHA.

### СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ.

- 1) Чудиновских, Ю.А. Резидентные стволовые клетки миокарда: роль в клеточном гомеостазе миокарда и потенциально возможные направления их применения в лечении сердечной недостаточности/ Ю.А. Чудиновских, М.В.Еремеева, Р.А.Серов, Л.А.Бокерия// Бюллетень НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН «Сердечно-сосудистые заболевания». -2007.- Том 8.- №6.- С. 297.
- 2) Чудиновских, Ю.А. Особенности морфологии миокарда при гипертрофической кардиомиопатии/ Ю.А. Чудиновских // Бюллетень НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН «Сердечно-сосудистые заболевания». -2009.- Том 10.- №3.- С. 220.
- 3) Чудиновских, Ю.А. Анализ возможности пролиферации клеток в зрелом миокарде/ Ю.А. Чудиновских, М.В. Еремеева, Л.А. Бокерия // Бюллетень НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН «Сердечно-сосудистые заболевания».- 2009.- Том 10.- №6.- С.312.
- 4) Чудиновских, Ю.А. Применение нанотехнологий в изучении морфологических признаков гипертрофической кардиомиопатии/ Ю.А. Чудиновских, М.В. Еремеева, Т.В. Сухачева, Р.А. Серов, Л.А.Бокерия// Нанофорум 2009. – С.256
- 5) Chudinovskikh, J. Usefulness of nanotechnologies in the study of morphological features of myocardium in hypertrophic cardiomyopathy/ J. Chudinovskikh, M.Eremeeva, T. Suhachova, R. Serov, L.A. Bockeria// Nanoforum 2009. The 2 competition of young researchers.- P. 265-266.
- 5) Чудиновских, Ю.А. Резидентные стволовые кардиомиоциты человека: роль в клеточном гомеостазе и регенерации миокарда/ Ю.А. Чудиновских, М.В. Еремеева, Л.А. Бокерия // Бюллетень НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН «Сердечно-сосудистые заболевания».- 2010.- Том 11.- № 2.- С.41-50.
- 6) Чудиновских, Ю.А. Новые данные о механизмах патогенеза гипертрофической кардиомиопатии/ Ю.А. Чудиновских, М.В. Еремеева, Т.В. Сухачева, Л.А. Бокерия // Бюллетень НЦ ССХ им. А.Н. Бакулева РАМН «Сердечно-сосудистые заболевания». - 2010.- Том11.- № 3.- С.102.

- 7) Бокерия, Л.А. Роль генных и клеточных технологий в создании биологического пейсмекера/ Л.А.Бокерия, М.В.Еремеева, Ю.А.Чудиновских // «Анналы аритмологии».- 2010.- № 1.- С.20-25.
- 8) Чудиновских, Ю.А. Современные концепции о патогенезе, диагностике и лечении гипертрофической кардиомиопатии/ Ю.А.Чудиновских, М.В. Еремеева, Т.В. Сухачева // «Кардиология».- 2011.- № 2.- С.65-70.
- 9) Чудиновских, Ю.А. Резидентные стволовые клетки миокарда: роль в клеточном гомеостазе миокарда и потенциально возможные направления их применения в лечении сердечной недостаточности/ Ю.А. Чудиновских, М.В. Еремеева, Т.В. Сухачева, Р.А. Серов, Л.А. Бокерия// Бюллетень НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН «Сердечно-сосудистые заболевания».- 2008.- Том 9.- №6.- С.290.
- 10) Чудиновских, Ю.А. Возрастные особенности гипертрофии у пациентов с обструктивной формой гипертрофической кардиомиопатии / Ю.А. Чудиновских, Т.В. Сухачева, М.В. Еремеева, Р.А. Серов, Л.А. Бокерия// Бюллетень НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН «Сердечно-сосудистые заболевания».- 2010.- Том 11.- №6.- С.43.
- 11) Chudinovskikh, J. Changes of the mechanism of hypertrophy with age in patients with hypertrophic cardiomyopathy/ J. Chudinovskikh, M. Eremeeva, T. Suhachova, R. Serov, L. Bockeria// Clin Res Cardiol.- 2010.- Vol. 99.- Suppl 2.- P.386.
- 12) Chudinovskikh, J. Functional and morphological features of myocardium in hypertrophic cardiomyopathy/ J. Chudinovskikh, M. Eremeeva, T. Suhachova et al. // Clin Res Cardiol.-2009.- Vol. 98.- Suppl 2.- P.373.
- 13) Chudinovskikh, J. Resident human cardiac stem cells and their role in the development of hypertrophy in different heart diseases/ J. Chuinovskikh, M. Eremeeva, T. Suhachova et al. // Clin Res Cardiol.- 2008.- Vol. 97.- Suppl 2.- P.151.
- 14) Chudinovskikh, J. New aspects of the morphological features and pathogenesis of hypertrophic cardiomyopathy/ J. Chudinovskikh, M. Eremeeva, T. Suhachova et al. // Keystone symposia "Cardiovascular Development and Repair". - 2010.- P. 135.
- 15) Чудиновских, Ю.А. Потенциальные возможности использования стволовых клеток в кардиологии/ Ю.А. Чудиновских// Бюллетень НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН «Сердечно-сосудистые заболевания».- 2002.- Том 3.- №5.- С.237.