

КОРРЕЛЯЦИИ БИОМАРКЕРОВ ВОСПАЛЕНИЯ И ДЕСТРУКЦИИ В КРОВИ И В СОСУДИСТОЙ СТЕНКЕ У МУЖЧИН С КОРОНАРНЫМ АТЕРОСКЛЕРОЗОМ

**Яна Владимировна ПОЛОНСКАЯ¹, Александр Михайлович ЧЕРНЯВСКИЙ²,
Александр Михайлович ВОЛКОВ², Елена Владимировна КАШТАНОВА¹,
Светлана Юрьевна ЦЫМБАЛ², Юлия Игоревна РАГИНО¹**

¹ *НИИ терапии СО РАМН
630089, г. Новосибирск, ул. Бориса Богаткова, 175/1*

² *ФГУ Новосибирский НИИ патологии кровообращения
имени академика Е.Н. Мешалкина Росмедтехнологий
630055, г. Новосибирск, ул. Речкуновская, 15*

В крови и в атеросклеротических бляшках мужчин с коронарным атеросклерозом исследованы биомаркеры воспаления и деструкции. В крови выявлены повышенные уровни С-реактивного протеина, интерлейкинов 8 и 6, матриксных металлопротеиназ 3 и 9 и тканевого ингибитора металлопротеиназ-1, корреляции между маркерами воспаления и деструкции не найдено. Выявлены взаимосвязи между маркерами воспаления и деструкции в атеросклеротических очагах и между биомаркерами деструкции в крови и в атеросклеротических бляшках. Показана корреляционная связь между уровнем С-реактивного протеина в крови и в сосудистой стенке.

Ключевые слова: атеросклероз, атеросклеротические бляшки коронарных артерий, воспалительные цитокины, матриксные металлопротеиназы.

В течение нескольких десятилетий сердечно-сосудистые заболевания атеросклеротического генеза занимают лидирующую позицию в структуре смертности населения в индустриально развитых странах, в том числе и в России [1], что способствует продолжению интенсивного изучения этиопатогенеза атеросклероза.

По современным представлениям [2–4] в основе развития атеросклероза лежит последовательное взаимодействие многих патогенетических факторов, ведущее, в конечном счете, к образованию фиброзной бляшки (неосложненной или осложненной). Профессор J.C. Fruchart в 2003 г. [5] сформулировал современные представления о шести последовательных стадиях формирования атеросклеротического очага. По мере развития характерно постепенное накопление липидов: сначала внутри, затем внеклеточно с формированием липидного пятна/полоски, молодой атеросклеротической бляшки; затем следует стадия стабильной бляшки, для которой

характерны толстая покрышка и гомогенное уплотненное липидное ядро, далее развивается нестабильная, уязвимая бляшка, которая при неблагоприятном исходе осложняется трещиной, надрывом или разрывом фиброзной покрышки и развитием тромбоза с острыми клиническими проявлениями.

Современные взгляды на ключевые механизмы формирования нестабильной атеросклеротической бляшки не однозначны. Установлено, что важную роль в ее дестабилизации играет воспаление. В ряде исследований было показано, что существует значительная инфильтрация атеросклеротических бляшек, особенно нестабильных, макрофагами и Т-лимфоцитами. Так, содержание макрофагов в нестабильной бляшке в 2,2 раза больше, чем в стабильной. В нестабильных бляшках выявлены повышенные уровни С-реактивного протеина (СРП) и провоспалительных цитокинов [6–8]. При остром коронарном синдроме в крови обнаружено уве-

*Полонская Я.В. – к.б.н., старший научный сотрудник, e-mail: yana-polonskaya@yandex.ru
Чернявский А.М. – д.м.н., проф., зам. директора по научной работе, e-mail: amchern@mail.ru
Волков А.М. – д.м.н., зав. лабораторией патоморфологии и электронной микроскопии,
e-mail: iren167@yandex.ru*

Каштанова Е.В. – к.б.н., старший научный сотрудник, e-mail: elekastanova@yandex.ru

Цымбал С.Ю. – научный сотрудник, e-mail: s_tsimbal83@mail.ru

*Рагино Ю.И. – д.м.н., проф., зав. лабораторией клинических биохимических и гормональных исследований,
e-mail: ragino@mail.ru*

личение содержания таких провоспалительных цитокинов и маркеров, как интерлейкин-1-бета (ИЛ-1 β), ИЛ-6, фактор некроза опухоли альфа (ФНО- α), ИЛ-8 и СРП [9–11].

Наряду с воспалительными цитокинами макрофаги продуцируют активные ферменты, вызывающие деградацию внеклеточного матрикса – деструктивные матриксные металлопротеиназы (ММП). В последнее время большое внимание уделяется изучению их роли в патогенезе атеросклероза. Согласно существующим представлениям они воздействуют на коллагеновые волокна покрышки бляшки, приводя к ее ослабеванию, разрыву и, как следствие, к дестабилизации течения ишемической болезни сердца (ИБС). При этом, по мнению ряда авторов, ключевую роль в дестабилизации бляшки и развитии нестабильной ИБС играет ММП-9 [11–14]. Также проводятся исследования по изучению активности других ММП в процессе деградации экстрацеллюлярных белков в сосудистой стенке.

Активность провоспалительных цитокинов и деструктивных ММП в динамике стадийного развития атеросклеротического очага до нестабильной бляшки изучена недостаточно. Мало работ, в которых рассматривается взаимосвязь маркеров воспаления и деструкции в системном кровотоке и в атеросклеротических очагах. В рамках обозначенной проблемы в настоящей работе было проведено исследование показателей активности процессов воспаления и деструкции на этапах последовательного развития атеросклеротического очага до стадии нестабильной бляшки у пациентов с неосложненным коронарным атеросклерозом, а также оценены корреляционные связи биомаркеров воспаления и деструкции в крови и в стенке коронарных артерий.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследование выполнено в рамках Программы совместных научно-исследовательских работ НИИ терапии СО РАМН и ФГУ Новосибирский НИИ патологии кровообращения Росмедтехнологий при одобрении этических комитетов учреждений (протоколы № 1 от 14.09.2005 и № 4 от 28.09.2005).

В исследование было включено 82 мужчины. В основную группу вошли 37 человек в возрасте 46–64 лет с коронароангиографически верифицированным коронарным атеросклерозом, без острого коронарного синдрома, со стабильной стенокардией напряжения II–III функционального класса, которые поступили в клинику

НИИ патологии кровообращения на операцию аортокоронарного шунтирования. Все пациенты заполняли информированное согласие на участие в исследовании. Контрольную группу составили 45 мужчин аналогичного возраста, проходящих обследование в клинике НИИ терапии СО РАМН, без ИБС согласно данным клинико-функциональных исследований, включая запись ЭКГ с расшифровкой по Миннесотскому коду. У всех обследованных мужчин однократно забирали кровь из локтевой вены утром натощак через 12 часов после приема пищи.

У пациентов с коронарным атеросклерозом в ходе операции при наличии интраоперационных показаний была произведена эндартерэктомия из коронарной артерии. Полученный материал был продольно и поперечно симметрично разделен на несколько фрагментов для выполнения гистологических и биохимических исследований. Гистологический анализ фрагментов интимы/меди проводили после окраски гематоксилином и эозином и по Ван-Гизону на бинокулярном микроскопе Axiostar Plus (Carl Zeiss AG, Германия) с цифровым фотовыходом. Для биохимических исследований замороженные в жидком азоте фрагменты бляшек гомогенизировали в растворе фосфатно-солевого буфера (pH 7,4). Содержание белка в гомогенатах измеряли по методу Лоури, биохимические показатели в гомогенатах рассчитывали относительно белка.

В гомогенатах и в сыворотке крови были определены концентрации ФНО- α , ИЛ-6, ИЛ-8, антагониста рецептора интерлейкина-1 (ИЛ-1-РА), СРП, матриксных металлопротеиназ 3 и 9 (стромелизин ММП-3, желатиназа ММП-9), тканевого ингибитора металлопротеиназ 1 типа (ТИМП-1) с помощью наборов стандартных тест-систем ELISA для иммуноферментного анализа (наборы Biomerica, BCM Diagnostics, Bender-Medsystems GmbH, Австрия). Измерение проводилось на иммуноферментном анализаторе Multiscan EX (Финляндия).

Статистическую обработку полученных результатов проводили, вычисляя среднее арифметическое (M) и среденквадратичное отклонение (σ) и представляли в виде $M \pm \sigma$. Различия между группами определяли с помощью t -критерия Стьюдента и считали значимыми при уровне вероятности $p < 0,05$. При проведении корреляционного анализа использовали метод Спирмена.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ результатов определения концентраций биомаркеров воспаления в сыворотке крови

Таблица 1

Сравнение уровней биомаркеров воспаления в крови между группами мужчин с коронарным атеросклерозом и контрольной

Показатель	Коронарный атеросклероз	Контроль
СРП, мкг/мл	6,79 ± 3,93*	1,2 ± 0,6
ФНО-α, пг/мл	2,56 ± 1,23	1,8 ± 0,8
ИЛ-6, пг/мл	12,87 ± 5,82*	5,2 ± 1,3
ИЛ-8, пг/мл	29,76 ± 12,24*	17,1 ± 5,9

* Отличие от соответствующего показателя контрольной группы достоверно при $p < 0,05$.

показал, что у мужчин с коронарным атеросклерозом уровень СРП выше в 5,66 раза, ИЛ-6 – в 2,5 раза, ИЛ-8 – в 1,7 раза по сравнению с мужчинами контрольной группы (табл. 1). Содержание ИЛ-1-РА у мужчин с атеросклерозом не отличалось от значений контрольной группы.

Полученные нами результаты согласуются с данными других исследователей [9, 11, 15] и указывают на связь повышенных уровней ИЛ-6, ИЛ-8 и СРП в крови с риском развития атеросклероза коронарных и периферических артерий, нестабильной стенокардии и инфаркта миокарда, что свидетельствует о важной роли воспаления в развитии сердечно-сосудистых заболеваний атеросклеротического генеза.

Выраженность деструктивных процессов в атеросклеротических очагах, одно из следствий активности воспаления, обусловлена секрецией активированными макрофагами и Т-лимфоцитами металлопротеиназ. Повышенные уровни некоторых из ММП (наиболее часто – ММП-3, ММП-9) выявлены в крови при атеросклерозе и многими авторами считаются одними из новых биомаркеров атеросклероза и его осложнений [11, 14, 16, 17].

В нашем исследовании у мужчин с коронарным атеросклерозом определялись в крови

несколько маркеров деструкции, а именно ММП-3, ММП-9, ТИМП-1. При оценке содержания биомаркеров активности деструктивных процессов мы ориентировались на результаты законченных крупных исследований в Европе и США. Условно нормальным уровнем в крови для ММП-3 считали концентрацию $\leq 8,0$ нг/мл [16], для ММП-9 – до 48,0 нг/мл [18] и для ТИМП-1 – до 250 нг/мл [19].

Уровень ММП-3 в сыворотке крови у мужчин с коронарным атеросклерозом оказался повышенным (табл. 2). Также почти в два раза была увеличена концентрация ТИМП-1, что согласуется с данными других авторов [16, 17, 19]. Содержание ММП-9 было также значительно выше условно нормальной величины.

Таким образом, у мужчин с коронарным атеросклерозом в крови повышены уровни СРП, ИЛ-8, ИЛ-6, ММП-3, ММП-9 и ТИМП-1. Значимых связей между маркерами воспаления и деструкции в крови не выявлено, однако отмечены сильные взаимосвязи между содержанием ИЛ-6 и СРП, а также между концентрациями ИЛ-1-РА и ФНО-α.

Проведенный далее корреляционный анализ обозначил некоторые связи между исследуемыми биомаркерами воспаления в крови. Наиболее выраженные корреляции были выявлены между содержанием ИЛ-6 и СРП ($p < 0,01$, $r = 0,742$; здесь и далее указаны коэффициенты Спирмена), а также между концентрациями ИЛ-1-РА и ФНО-α ($p < 0,01$, $r = 0,444$). Значимых взаимосвязей между биомаркерами воспаления и деструкции в крови нами обнаружено не было. Вероятно, воспалительные изменения при коронарном атеросклерозе носят системный характер, в то время как повышенные уровни биомаркеров деструкции могут быть обусловлены локальными процессами, идущими в атеросклеротических очагах сосудистой стенки.

В гомогенатах атеросклеротических бляшек, как и в крови, нами также определены концентрации перечисленных выше биомаркеров ак-

Таблица 2

Уровни биомаркеров деструкции в крови у мужчин с коронарным атеросклерозом

Показатель в крови	Минимум	Максимум	$M \pm \sigma$
ММП-3, нг/мл (условно норма < 8 нг/мл, повышение ≥ 8 нг/мл) [16]	4,59	18,8	9,9 ± 3,39
ММП-9, нг/мл (условно норма < 48 нг/мл, повышение ≥ 48 нг/мл) [18]	44,0	1125	499,15 ± 216,11
ТИМП-1 нг/мл (условно норма < 253 нг/мл, повышение ≥ 253 нг/мл) [19]	144	660	440,48 ± 119,8

Таблица 3

Корреляционные связи (коэффициент Спирмена) между маркерами воспалительных и деструктивных процессов в атеросклеротических очагах

	ММП-9	ФНО-α	ИЛ-6	ИЛ-1-РА	ИЛ-8	СРБ
ТИМП-1	0,317**	0,229*	0,635**	0,614**	0,521**	0,329**
ММП-3	0,227*	0,616**			-0,217*	
ИЛ-6	0,374**			0,552**	0,549**	0,287**
ИЛ-1-РА	0,484**		0,552**		0,685**	
СРБ	0,292**		0,287**	0,367**	0,321**	0,367**

Примечание. Здесь и в табл. 4 статистическая значимость коэффициента корреляции: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$.

тивности процессов воспаления и деструкции. Корреляционный анализ выявил наличие выраженных связей между исследуемыми параметрами деструкции и воспаления в атеросклеротических очагах (табл. 3). Так, были определены значимые корреляции концентрации в бляшках ММП-9 с концентрациями ТИМП-1 ($p < 0,01$, $r = 0,317$), ИЛ-1-РА ($p < 0,01$, $r = 0,484$), ИЛ-6 ($p < 0,01$, $r = 0,374$) и СРБ ($p < 0,01$, $r = 0,292$). Выявлена корреляционная связь между содержаниями ММП-3 и ФНО-α ($p < 0,01$, $r = 0,616$). Значимые зависимости показаны между уровнями ТИМП-1 и таких параметров активности воспалительного процесса, как ИЛ-1-РА ($p < 0,01$, $r = 0,614$), ИЛ-6 ($p < 0,01$, $r = 0,635$), ИЛ-8 ($p < 0,01$, $r = 0,521$) и СРБ ($p < 0,01$, $r = 0,329$). Как и ожидалось, в атеросклеротических очагах обнаружены корреляционные связи концентрации ИЛ-6 с концентрациями ИЛ-1-РА ($p < 0,01$, $r = 0,552$), ИЛ-8 ($p < 0,01$, $r = 0,549$) и СРБ ($p < 0,01$, $r = 0,287$), а также связь между содержанием ИЛ-1-РА и ИЛ-8 ($p < 0,01$, $r = 0,685$) и СРБ ($p < 0,01$, $r = 0,367$).

Достоверность связей выраженности деструктивных изменений (уровней матричных ММП и их тканевого ингибитора) с активностью воспалительных процессов в атеросклеротических бляшках была оценена методом регрессионного и мультивариантного анализа в модели GLM (General Linear Model). Показатели активности процессов деструкции включались в модель в качестве зависимых переменных, а исследуемый спектр воспалительных показателей – в качестве независимых. В результате выявлена статистически значимая зависимость содержания ММП-9 от концентраций ИЛ-6 ($B = 0,1$; $p < 0,05$) и ИЛ-1-РА ($B = 0,002$; $p < 0,05$). Доказана зависимость содержания ММП-3 от концентрации ФНО-α ($B = 0,242$; $p < 0,001$), содержания ТИМП-1 – от концентрации ИЛ-1-РА ($B = 0,062$; $p < 0,001$).

Наконец, нами был проведен корреляционный анализ связей показателей биомаркеров активности процессов воспаления и деструкции в крови и в стенке коронарных артерий (табл. 4).

Значимых связей между уровнями воспалительных цитокинов в крови и в стенке коронар-

Таблица 4

Корреляционные связи между показателями воспалительно-деструктивных биомаркеров в крови и в сосудистой стенке у мужчин с коронарным атеросклерозом (коэффициент Спирмена)

Сыворотка Бляшка	ТИМП-1	ММП-9	СРБ	ИЛ-6	ФНО-α	ИЛ-8
ТИМП-1	-0,247*		-0,249*			-0,230*
ММП-9		-0,332*		0,226*	0,219*	
ММП-3			0,410**	0,317**		
СРБ	-0,212*	-0,345*	0,448**	0,466**	0,647**	0,422**
ИЛ-6		-0,357*			0,259**	
ИЛ-1-РА		-0,349*	-0,309*		0,219*	-0,223*
ИЛ-8	-0,233*	-0,442**	-0,244*			
ФНО-α			0,272*			0,336**

ных артерий нами не выявлено. Это свидетельствует о том, что, вероятно, воспалительные процессы, ведущие к развитию/прогрессии атеросклеротических бляшек, носят преимущественно локальный характер. Повышенное содержание биомаркеров воспаления в крови может быть отражением активности не только атеросклеротического процесса в стенках сосудов, но и какого-либо другого хронического воспалительного системного процесса. Хотя между локальным и системным воспалением существует несомненная зависимость, она, вероятно, не имеет линейного характера.

С другой стороны, нами обнаружены выраженные связи между маркерами деструкции ТИМП-1 ($p < 0,001$) и ММП-9 ($p < 0,001$) в крови и стенке коронарных артерий, что отражает важную, может быть ключевую, роль ТИМП-1 и ММП-9 в дестабилизации (за счет деструкции) атеросклеротических очагов. Также выявлена зависимость между уровнем СРП в крови и в сосудистой стенке, что свидетельствует о важной роли этого белка острой фазы воспаления в атерогенезе.

Таким образом, факторы, способствующие развитию и осложнению нестабильных атеросклеротических бляшек, могут действовать и на уровне целого организма и локально в сосудистой стенке. Вероятно, воспалительные изменения носят системный характер, в то время как повышение содержания маркеров активности процессов деструкции в крови может быть обусловлено локальными процессами, идущими в атеросклеротическом очаге.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Харченко В.И., Какорина Е.П., Корякин М.В. и др. Смертность от основных болезней системы кровообращения в России. Аналитический обзор данных Госкомстата, Минздрава России, ВОЗ и экспертных оценок по проблеме // Рос. кардиол. журн. 2005. (1). 5–15.

Kharchenko V.I., Kakorina E.P., Koryakin M.V. et al. Mortality from major diseases of the circulatory system in Russia. Analytical review of the data to Goskomstat, Russian Ministry of Health, WHO and the expert assessments on the issue // Ros. kardiolog. zhurn. 2005. (1). 5–15.

2. Никитин Ю.П. Новые фундаментальные и прикладные основы атерогенеза // Бюл. СО РАМН. 2006. (2). 6–14.

Nikitin Yu.P. New fundamental and applied basis of atherogenesis // Byul. SO RAMN. 2006. (2). 6–14.

3. Waksman R. Handbook of the vulnerable plaque. London, 2004. 1–48.

4. Puddu G.M., Cravero E., Arnone G. et al. Molecular aspects of atherogenesis: new insights and unsolved questions // J. Biomed. Sci. 2005. 18. (8). 373–388.

5. Fruchart J.-C. Pathophysiology of stages of development of atherosclerosis // Handbook of Dyslipidemia and Atherosclerosis. Lille, 2003. 1–65.

6. Libby P. Inflammation and atherosclerosis // Circulation. 2002. 105. 1135–1147.

7. Donald D., Heistad M.D. Unstable coronary-artery plaques // N. Engl. J. Med. 2003. 24. (11). 2285–2288.

8. Kolodziej F.D., Herman K.G., Burke A.P. Intraplaque hemorrhage and progression of coronary atheroma // N. Engl. J. Med. 2003. 349. 2316–2325.

9. Kanda T., Hirao Y., Oshima S. et al. Interleukin-8 as a sensitive marker of unstable coronary artery disease // Am. J. Cardiol. 1996. 77. 304–307.

10. Kofler S., Nickel T., Weis M. Role of cytokines in cardiovascular diseases: a focus on endothelial responses to inflammation // Clin. Sci. 2005. 108. 205–213.

11. Funayama H., Ishikawa S.-E., Kubo N. et al. Increases in interleukin-6 and matrix metalloproteinase-9 in the infarct-related coronary artery of acute myocardial infarction // Circ. J. 2004. 68. 451–454.

12. Shah P.K. Mechanisms of plaque vulnerability and rupture // J. Am. Coll. Cardiol. 2003. 41. 15–22.

13. Galis Z.S., Khatri J.J. Matrix metalloproteinases in vascular remodelling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly // Circ. Res. 2002. 90. 251–262.

14. Loftus I.M. Increased matrix MMP-9 activity in unstable carotid plaques: a potential role in acute plaque disruption // Stroke. 2000. 31. 40–47.

15. Clarke R., Emberson J.R., Breeze E. et al. Biomarkers of inflammation predict both vascular and non-vascular mortality in older men // Eur. Heart J. 2008. 29. 800–809.

16. White A.J., Duffy S.J., Walton A.S. et al. Matrix metalloproteinase-3 and coronary remodeling: implications for unstable coronary disease // Cardiovasc. Res. 2007. 75. (4). 813–820.

17. Uzu H., Harpf A., Liu M. et al. Increased expression of membrane type 3-matrix metalloproteinase in human atherosclerotic plaque // Circulation. 2002. 106. (24). 3024–3036.

18. Wald D.S., Law M.R., Wald N.J., Morris J.K. Serum homocystein and coronary heart disease. Coronary heart epidemiology. Oxford: University Press, 2005. 239–250.

19. Lindsay M.M., Maxwell P., Dunn F.G. TIMP-1 a marker of left ventricular diastolic dysfunction and fibrosis in hypertension // Hypertension. 2002. 40. 136–140.

CORRELATIONS OF INFLAMMATORY AND DESTRUCTIVE BIOMARKERS IN BLOOD AND IN VASCULAR WALL IN MEN WITH CORONARY ATHEROSCLEROSIS

**Yana Vladimirovna POLONSKAYA¹, Aleksandr Mikhailovich CHERNYAVSKI²,
Aleksandr Mikhailovich VOLKOV², Elena Vladimirovna KASHTANOVA¹,
Svetlana Yur`evna TSYMBAL², Yulia Igorevna RAGINO¹**

¹ *Institute of Internal Medicine SB RAMS
630089, Novosibirsk, Boris Bogatkov str., 175/1*

² *Novosibirsk State Research Institute of Circulation Pathology
named after Academician E.N. Meshalkin of Rusmedtechnology
630055, Novosibirsk, Rechkunovskaya str., 15*

Biomarkers of inflammation and destruction were studied in blood and atherosclerotic plaques of men with coronary atherosclerosis. The increased levels of C-reactive protein (CRP), interleukins IL-8 and IL-6, MMP-3, MMP-9 and TIMP-1 were elevated in blood. Correlation between markers of inflammation and destruction in blood was not found. Interconnections between markers of inflammation and destruction in atherosclerotic plaques and between destructive biomarkers in blood and in atherosclerotic plaques were revealed. Pronounced correlative relationship was found between CRP concentrations in blood and in atherosclerotic plaques.

Key words: atherosclerosis, atherosclerotic plaques of coronary arteries, inflammatory cytokines, matrix metalloproteinases.

Polonskaya Ya.V. – candidate of biological sciences, senior researcher, e-mail: yana-polonskaya@yandex.ru

Chernyavski A.M. – doctor of medical sciences, professor, deputy director, e-mail: amchern@mail.ru

Volkov A.M. – doctor of medical sciences, head of pathomorphology and electronic microscopy laboratory, e-mail: iren167@yandex.ru

Kashtanova E.V. – candidate of biological sciences, senior researcher, e-mail: elekastanova@yandex.ru

Tsymbal S.Yu. – researcher, e-mail: s_tsimbal83@mail.ru

Ragino Yu.I. – doctor of medical sciences, professor, head of laboratory of clinical biochemical and hormonal investigations, e-mail: ragino@mail.ru