Содержание провоспалительных цитокинов, хемоаттрактанов и деструктивных металлопротеиназ в разных типах нестабильных атеросклеротических бляшек

Ю.И. Рагино[1], д.м.н., проф., зав. лабораторией клинических биохимических и гормональных исследований НИИ терапии СО РАМН
А.М. Чернявский[2]., д.м.н., проф., зам. директора по научной работе ФГУ ННИИПК Росмедтехнологий
Я.В.. Полонская[1]., к.б.н., старший научный сотрудник лаб. клинических биохимических и гормональных исследований НИИ терапии СО РАМН
А.М. Волков[2], д.м.н., зав. лабораторией патоморфологии ФГУ ННИИПК Росмедтехнологий
Е.В. Каштанова[1], к.б.н., научный сотрудник лаб. клинических биохимических и гормональных исследований НИИ терапии СО РАМН

1 – Учреждение Российской академии медицинских наук Научно-исследовательский институт терапии Сибирского отделения РАМН (НИИ терапии СО РАМН), г. Новосибирск;

2 – Федеральное Государственное учреждение Новосибирский НИИ патологии кровообращения им. Е.Н. Мешалкина Росмедтехнологий (ФГУ ННИИПК Росмедтехнологий), Новосибирск

Работа выполнена при финансовой поддержке Гранта РФФИ № 09-04-00374а

Абстракт

У мужчин с коронарным атеросклерозом без острого коронарного синдрома определены и изучены характерные и значимые для нестабильных бляшек разных типов (липидного, воспалительно-эрозивного и дистрофически-некротического) коронарных артерий воспалительные, деструктивные биомаркеры и хемоаттрактанты. Из 3-х типов нестабильных бляшек не только для воспалительно-эрозивного, но и для липидного типа характерна повышенная воспалительная активность (повышенные концентрации интерлейкина-1-бета, интерлейкина-6, интерлейкина-8, интерлейкина-18 и моноцитарного хемотаксического протеина-1) в сравнении с дистрофически-некротическим типом, при котором доминирующей является повышенная деструктивная активность (повышенные концентрации фактора некроза опухоли-альфа, эндотелина-1 и сниженный уровень тканевого ингибитора металлопротеиназ 1 типа). .

Ключевые слова: *атеросклеротические бляшки коронарных артерий, липидный, воспалительно-эрозивный и дистрофически-некротический типы нестабильности бляшек, воспалительные цитокины, хемоаттрактанты, деструктивные матриксные металлопротеиназы*

Contents of proinflammatory cytokines, chemoattractants and destructive metalloproteinases in varrious tipe of unstable atherosclerotic plaques

Yu.I. Ragino1, A.M. Chernyavski2, Ya.V. Polonskaya1, A.M. Volkov2, E.V. Kashtanova1
1 – Institute of Internal Medicine Siberian Branch of RAMS, Novosibirsk
2 – Research State of Circulation Pathology of Russian Medical Technology Agency, Novosibirsk

Abstract

Typical and significant inflammatory, destructive biomarkers and chemoattractants of various types of unstable plaques (lipid type, inflammatory-erosive type, necrotic type) of coronary arteries were determined and studied in coronary atherosclerosis men without acute coronary syndrome. The increased inflammatory activity (increased concentrations of interleukin 1-beta, interleukin 6, interleukin 8, interleukin 18 and monocytes chemotactic protein – 1) was typical not only for unstable plaques inflammatory-erosive type, but for lipid type too in comparison with necrotic type of unstable plaques. On the other hand, increased destructive activity (increased levels of tumor necrotic factor alpha, endothelin 1 and decreased level of tissue inhibitor of metalloproteinase-1) was typical for necrotic type of unstable plaques only.

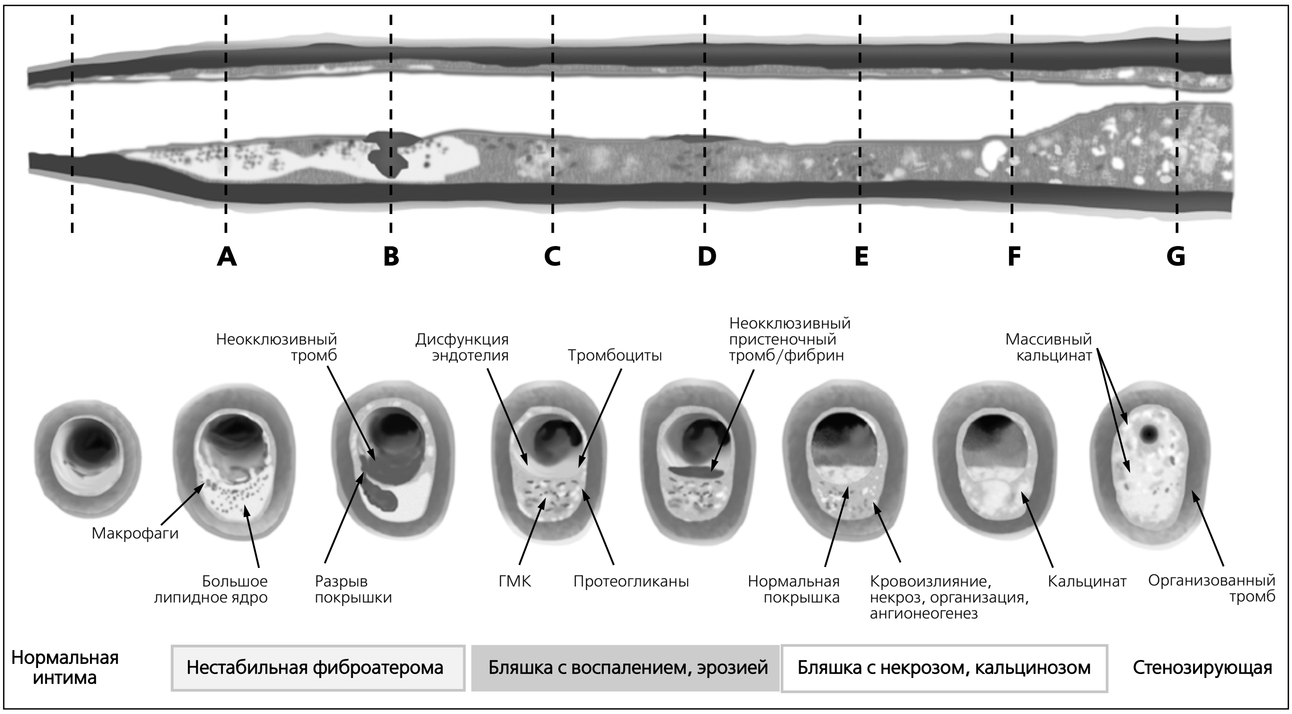
Key words: *atherosclerotic plaques of coronary arteries, lipid, inflammatory-erosive and necrotic types of unstable plaques, inflammatory cytokines, chemoattractants, destructive matrix metalloproteinases.*

Пусковым механизмом тромбообразования на поверхности атеросклеротической бляшки, приводящего к окклюзии артерии и развитию инфаркта миокарда, является нарушение целостности эндотелия на участке деструкции покрышки нестабильной или «уязвимой» атеросклеротической бляшки со склонностью к изъязвлению и разрыву [1-4]. Формирование нестабильной бляшки с истонченной покрышкой, очаговой деструкцией эндотелия, воспалительной клеточной инфильтрацией, рыхлым липидным ядром (иногда с участками некроза, кальциноза) [5-8], является критической стадией развития атеросклеротического очага [9, 10].

На сегодняшний день доказано, что важную роль в дестабилизации атеросклеротической бляшки играет воспалительный процесс. Во многих исследованиях выявлена значительная инфильтрация нестабильных атеросклеротических бляшек активированными макрофагами, Т-лимфоцитами и лейкоцитами [2, 5, 8], секретирующими провоспалительные цитокины, в том числе интерлейкин-1-бета (ИЛ-1-бета), ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-18, фактор некроза опухоли альфа (ФНО-альфа) и другие [10, 11]. ИЛ-1-бета и ФНО-альфа индуцируют образование эндотелиальными клетками адгезивных молекул, приводя к снижению антиадгезивных и антикоагуляционных свойств эндотелия, ИЛ-6 – цитотоксический фактор дифференцировки Т-лимфоцитов – стимулирует синтез и секрецию основных белков острой фазы воспаления, ИЛ-8 стимулирует продукцию факторов моноцитов и макрофагов, активирующих хемотаксис нейтрофилов и Т-лимфоцитов в атеросклеротические очаги, ИЛ-18, секретируемый Т-лимфоцитами, активирует моноциты и макрофаги, инициирует процессы апоптоза [3, 9, 11-13].

Параллельно с воспалительными цитокинами активированные макрофаги атеросклеротических очагов секретируют ряд хемоаттрактантов, в том числе, моноцитарный хемотаксический протеин (MCP-1), эндотелиально-моноцитарный активирующий полипептид (EMAP-II), молекулы межклеточной адгезии (sICAM-1) и молекулы адгезии эндотелиоцитов (sVCAM-1). MCP-1, экспрессирующийся макрофагами в ответ на воздействие цитокинов ФНО-альфа, ИЛ-1-бета и ИЛ-6, является специфическим хемоаттрактантом моноцитов и Т-лимфоцитов [2, 3, 12]. EMAP-II, секретирующийся макрофагами и Т-лимфоцитами, является провоспалительным цитокином и хемоаттрактантом, индуцирующим образование прокоагулянтного тканевого фактора на поверхности эндотелиоцитов, активацию нейтрофилов, апоптоз, ингибирование неоваскуляризации интимы/медии артериальной стенки [12-14].

Рисунок 1. Разные типы нестабильных атеросклеротических бляшек [19].



Кроме провоспалительных цитокинов и хемоаттрактантов макрофаги продуци-руют матриксные металлопротеиназы (ММП) [15, 16], вызывающие деградацию внеклеточного матрикса. Из них коллагеназы ММП-1, ММП-13 расщепляют фибриллярный коллаген I и III типов, желатиназы ММП-2 и ММП-9 и стромолизин ММП-3 расщепляют адгезивные молекулы, нефибриллярные формы коллагена и протеогликаны [13, 17, 18]. Тканевой ингибитор металлопротеиназ 1 типа (ТИМП-1) является ингибитором ММП-1, ММП-3, ММП-9 и, связываясь с активным каталитическим центром ММП, блокирует их активность, образуя нековалентные комплексы (например, комплекс ТИМП-1/ММП-3) [17, 18].

Существует несколько разных типов нестабильности атеросклеротических очагов. Наиболее часто их классифицируют на 3 типа: 1) липидный (фиброатерома), 2) воспалительно-эрозивный и 3) деструктивный (дистрофически-некротический) (рис. 1). Характерными чертами первого типа являются крупное атероматозное ядро (циркулярно или эксцентрично расположенное), истонченная фиброзная покрышка; второго – небольшое липидное ядро, фиброзная покрышка, обильно инфильтрированная клетками воспалительного ряда (макрофаги и Т-лимфоциты) или пенистыми клетками, гибель эндотелиальных клеток на поверхности воспалительной или липидной эрозии покрышки; третьего – выраженные дистрофические изменения и некрозы в покрышке, очаги кальцификации разных размеров под истонченной покрышкой [5, 6, 19].

Наше исследование было посвящено изучению роли факторов воспалительно-деструктивного процесса в развитии разных типов нестабильности атеросклеротических очагов коронарных артерий

Материалы и методы

Исследование было проведено в рамках Программы совместных научно-исследовательских работ НИИ терапии СО РАМН и ФГУ ННИИПК Росмедтехнологий. Проведение исследования было одобрено Этическими комитетами обоих учреждений. В исследование были включены мужчины с ангиографически верифицированным коронарным атеросклерозом и стабильной стенокардией напряжения II-IV ФК, которые поступили в клинику ФГУ ННИИПК Росмедтехнологий на операцию коронарного шунтирования. Всеми пациентами заполнялась форма Информированного согласия на участие в исследовании.

В ходе операции при наличии интраоперационных показаний у 54 пациентов была проведена эндартерэктомия из коронарной артерии. Каждый из 54 материалов эндартерэктомии, содержащий фрагменты интимы/медии коронарной артерии, был разделен на 3-4 фрагмента для проведения гистологических и биохимических исследований.

Гистологический анализ фрагментов интимы/медии коронарных артерий после макроскопического описания (распространенность бляшки, степень стенозирования просвета артерии, кровоизлияния в структуры бляшки, наличие обызвествления, тромбов) и стандартной окраски гематоксилин-эозином и Ван Гизон проводился на бинокулярном микроскопе Axiostar Plus (C. Zeiss). Из 162 фрагментов интимы/медии условно неизмененная ткань интимы была детерминирована в 19 случаях, липидное пятно/полоска – в 23, стабильная молодая атеросклеротическая бляшка – в 34, стабильная бляшка с фиброзом/кальцинозом – в 41, нестабильная бляшка со склонностью к изъязвлению или разрыву – в 45. У нестабильных бляшек был определен тип нестабильности: 1) фиброатерома с массивным липидным ядром и тонкой фиброзной покрышкой (липидный тип) – 14 образцов; 2) бляшка с повышенным содержанием протеогликанов, воспалительными или липидными эрозивными повреждениями в покрышках (воспалительно-эрозивный тип) – 16; 3) бляшка с кальцинированным ядром, выраженными дистрофическими изменениями и некрозами в покрышках (дистрофически-некротический тип) – 15 образцов.

Для проведения биохимических исследований замороженные в жидком азоте фрагменты были гомогенизированы при температуре 4°С в растворе фосфатно-солевого буфера, pH 7,4. Измерение белка в гомогенатах проводили по методу Лоури, расчёт биохимических показателей производился относительно белка. Методом иммуноферментного анализа с использованием наборов ELISAs в гомогенатах определяли уровни ФНО-альфа, ИЛ-1-бета, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-18 (BCM Diagnostics наборы), С-реактивного белка (высокочувствительный метод, вчСРБ) (Bender Medsystems наборы), MCP-1, EMAP-II (BCM Diagnostics наборы), sICAM-1 и sVCAM-1 (Bender Medsystems наборы), ТИМП-1, ММП-3, ММП-7 и ММП-9 (BCM Diagnostics наборы) и эндотелина-1 (Biomedica наборы).

Статистическую обработку результатов проводили в программе SPSS for Windows (версия 11,5), используя критерий статистической достоверности — $p<0,05$.

Результаты и обсуждение

Некоторые исследованные нами ранее из перечисленного выше комплекса провоспалительных, деструктивных биомаркеров и хемоаттрактантов были определены как значимые для стадии развития нестабильной атеросклеротической бляшки [20]. Согласно результатам наших исследований, стадия развития нестабильной бляшки в сравнении с другими стадиями развития атеросклеротического очага (липидное пятно, стабильные молодая и фиброзная бляшки) характеризуется наибольшими концентрациями интерлейкинов ИЛ-6 и ИЛ-8 (15,9±1,1 нг/мг белка и 37,1±4,8 пг/мг белка, соответственно), хемоаттрактантов MCP-1 и EMAP-II (401,7±39,8 и 2007,8±189,5 пг/мг белка, соответственно), деструктивных ММП-7 и ММП-9 (2,31±0,2 и 6,2±0,6 нг/мг белка, соответственно) и сниженным содержанием ТИМП-1 (117,2±11,3 нг/мг белка) [20].

Результаты сравнительного исследования уровней воспалительных, деструктивных биомаркеров и хемоаттрактантов в бляшках с разными типами нестабильности показали (таблица), что в бляшках воспалительно-эрозивного типа концентрации воспалительных биомаркеров ИЛ-1-бета, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-18 и хемоаттрактантов MCP-1, EMAP-II выше в сравнении с дистрофически-некротическим типом в 3,2, 2,2, 2,7, 2,8, 3,7 и 1,3 раза, соответственно ($p<0,05$).

Повышенные концентрации воспалительных цитокинов ИЛ-6 и ИЛ-8 и хемоат-трактантов MCP-1

Таблица. Содержание воспалительных биомаркеров, хемоаттрактантов и деструктивных биомаркеров в нестабильных атеросклеротических бляшках разных типов (M±m).

Показатели	1. Фиброатерома, n=14	2. Бляшка с воспалением, эрозией, n=16	3. Бляшка с кальцинозом, некрозом, n=15	* p<0,05
ИЛ-1, пг/мг белка	8,1±1,3*	7,6±1,2*	2,4±1,1	1,2 vs 3
ФНО-альфа, пг/мг	2,3±0,2	2,6±0,2	3,9±0,4*	3 vs 1,2
ИЛ-6, нг/мг	27,6±2,4*	14,2±1,3*	6,3±0,6	1,2 vs 3
ИЛ-8, пг/мг	58,9±5,4*	56,1±5,4*	20,9±2,1	1,2 vs 3
ИЛ-18, пг/мг	9,4±1,3*	8,6±1,2*	3,1±1,1	1,2 vs 3
вчСРБ, нг/мг	2,2±0,2	2,2±0,2	2,5±0,3	p>0,05
MCP-1, пг/мг	470,6±41,6*	598,0±54,1*	159,7±13,8	1,2 vs 3
EMAP-II, пг/мг	2099,3±197,0	2180,4±200,1*	1701,1±165,5	2 vs 3
sICAM-1, нг/мг	85,4±8,3	88,7±8,5	82,4±8,9	p>0,05
sVCAM-1, нг/мг	145,2±10,3	152,2±12,4	149,1±13,3	p>0,05
ТИМП-1, нг/мг	147,4±11,8	151,0±15,0	103,0±9,5*	3 vs 1,2
ММП-3, нг/мг	1,7±0,1	2,1±0,2	2,0±0,2	p>0,05
ММП-7, нг/мг	3,3±0,3*	2,1±0,2	1,3±0,1	1 vs 2,3
ММП-9, нг/мг	6,0±0,5	5,1±0,5	6,5±0,6	p>0,05
Эндотелин-1, пг/мг	1,4±0,2	1,6±0,2	3,1±0,6*	3 vs 1,2

Примечание: * *– статистически достоверное различие между показателями соот-ветствующих групп (p<0,05)..*

и EMAP-II в нестабильных бляшках воспалительно-эрозивного типа отражают наиболее выраженную активность острого воспалительного процесса и реакций тканевого повреждения, сопровождающихся повышенным хемотаксисом моноцитов, макрофагов, нейтрофилов и Т-лимфоцитов.

Однако повышенная воспалительная активность нами была выявлена и в нестабильных бляшках липидного типа. Так, уровни воспалительных цитокинов ИЛ-1-бета, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-18 и хемоаттрактанта MCP-1 в них оказались также выше в сравнении с дистрофически-некротическим типом в 3,4, 4,4, 2,8, 3,0 и 2,9 раза (p<0,05), соответственно. Полученные данные указывают на наличие воспалительной активности в нестабильных бляшках не только воспалительно-эрозивного типа, но и липидного типа. Кроме того, в нестабильных бляшках липидного типа обнаружена наибольшая концентрация ММП-7, которая оказалась выше в 1,6 и 2,5 раза (p<0,05), чем в бляшках воспалительно-эрозивного и дистрофически-некротического типов.

Отличительными особенностями нестабильных бляшек дистрофически-некротического типа в сравнении с липидным и воспалительно-эрозивным типами оказались повышенный уровень ФНО-альфа (в 1,7 и 1,5 раза, соответственно, p<0,05), сниженный уровень ТИМП-1 (в 1,4 и 1,5 раза, соответственно, p<0,05) и повышенный уровень эндотелина-1 (в 2,2 и 1,9 раза, соответственно, p<0,05), что отражает наличие повышенных деструктивных изменений в бляшках этого типа нестабильности. Действительно, сниженное содержание ТИМП-1 (ингибитора деструктивных ММП) и повышенные уровни деструктивных биомаркеров – ФНО-альфа и эндотелина-1 (биомаркера деструкции эндотелиоцитов) в нестабильных бляшках дистрофически-некротического типа свидетельствует о большей потенциальной возможности ферментативной и неферментативной деструктивной активности в бляшках этого типа. Повышенная же активность деструкции соединительнотканного матрикса в фиброзных покрышках нестабильных бляшек приводит к истончению и разрыву покрышек нестабильных бляшек и развитию острого коронарного синдрома [1-4].

Несмотря на ранее полученные нами результаты о характерном для нестабильных бляшек повышенном уровне ММП-9 [20], по уровням ее активности каких-либо значимых различий между тремя типами нестабильных бляшек выявлено не было. С другой стороны, полученные данные о повышенной концентрации ММП-7 (матрилизин, разрушающий протеогликаны, фибронектин, ламинин, версикан и др. [13, 18]) в нестабильных бляшках липидного типа, которая, кроме собственной активности, еще является активатором про-ММП-9, свидетельствует о значимом вкладе именно этого деструктивного фермента в формирование указанного типа нестабильности атеросклеротических очагов.

Корреляционный анализ выявил наличие выраженной связи исследуемых параметров деструктивной и воспалительной активности в атеросклеротических очагах. Показаны корреляционные связи (p<0,01) уровня ММП-9 с ИЛ-6 (коэффициенты Пирсона и Кендалла, соответственно, 0,421 и 0,318), ИЛ-8 (0,337 и 0,291), MCP-1 (0,389 и 0,397), EMAP-II (0,334 и 0,297). Подобный характер корреляционных связей с уровнями провоспалительных цитокинов обнаружен и для ММП-7. Выявлены корреляционные связи уровня ММП-3 с ФНО-альфа (0,541 и 0,487, p<0,01) и с ИЛ-1-РА (-0,277 и -0,307, p<0,05). Значимые (p<0,01) корреляции показаны для ТИМП-1 с параметрами активности воспалительного процесса – ФНО-альфа (-0,230 и -0,182), ИЛ-6 (-0,227 и -0,189), ИЛ-8 (-0,249 и -0,225), MCP-1 (-0,371 и -0,303) и уровнем ИЛ-1-РА (0,512 и 0,364).

Полученные результаты сравнительного исследования биомаркеров активности воспалительно-деструктивного процесса в разных типах нестабильности атеросклеротических очагов позволили выявить его особенности, характерные для разных типов нестабильных бляшек. Так, из 3-х типов нестабильных бляшек не только для воспалительно-эрозивного, но и для липидного типа характерна повышенная воспалительная активность (повышенные концентрации ИЛ-1-бета, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-18 и MCP-1) в сравнении с дистрофически-некротическим типом, при котором доминирующей является повышенная деструктивная активность (повышенные концентрации ФНО-альфа, эндотелина-1 и сниженный уровень ТИМП-1).

.

Список литературы

1. Ambrose J.A., Srikanth S. Vulnerable plaques and patients: improving prediction of future coronary events. // Am. J. Med., 2010; 123: 10-16.
2. Shah P.K. Cellular and molecular mechanisms of plaque rupture. / High-risk atherosclerotic plaques: mechanisms, imaging, models, and therapy. Edited by L.M. Khachigian. // CRC Press, New York, 2005; 1-19.
3. Shah P.K., Sharifi B. Insights into the Molecular Mechanisms of Plaque Rupture and Thrombosis. // Biochemistry of Atherosclerosis, edited by S.K. Cheema, Springer, New York, 2006; 455-563.
4. Holschermann H., Tillmanns H., Bode C. Pathophysiology of acute coronary syndrome. // Hamostaseologie, 2006; 2¬¬¬6: 99-103.
5. Moreno P.R. Vulnerable plaque: definition, diagnosis, and treatment. // Cardiol. Clin., 2010; 28: 1-30.
6. Waksman R., Seruys P.W. Handbook of the vulnerable plaque. // London, 2004, p. 1-48.
7. Schaar J.A., Muller J.E., Falk E. et al. Terminology for high-risk and vulnerable coronary artery plaques. // Eur. Heart J., 2004, 25: 1077-1082.
8. Sadeghi1 M.M., Glover D.K., Lanza G.M. et al. Imaging Atherosclerosis and Vulnerable Plaque. // J. Nucl. Med., 2010; 51(Suppl 1): 51S–65S.
9. Puddu G.M., Cravero E., Arnone G. et al. Molecular aspects of atherogenesis: new in-sights and unsolved questions. // J. Biomedical Science, 2005, 18: 373-388.
10. Virmani R., Burke A.P., Farb A., Kolodgie F.D. Pathology of the vulnerable plaque. // J. Am. Coll. Cardiol., 2006; 47 (8 Suppl): C13-C18.
11. Shah P.K., Wang L., Sharifi B. New insights into molecular mechanisms of plaque insta-bility. // Atherosclerosis, 2006, 7: 156-157.
12. Braunersreuther V., Mach F., Steffens S. The specific role of chemokines in atheroscler-sis. // Thromb. Haemost., 2007; 97: 714-721.
13. Wang X., Connolly T.M. Biomarkers of vulnerable atheromatous plaques: translational medicine perspectives. // Adv. Clin. Chem., 2010; 50: 1-22.
14. Schwarz M.A., Zheng H., Liu J. et al. Endothelial-monocyte activating polypeptide II al-ters fibronectin based endothelial cell adhesion and matrix assembly via alpha5 beta1 in-tegrin. // Exp. Cell Res., 2005; 311: 229-239.
15. Bui Q.T., Prempeh M., Wilensky R.L. Atherosclerotic plaque development. // Int. J. Bio-chem. Cell Biol., 2009; 41: 2109-2113.
16. Daskalopoulou S.S., Daskalopoulos M.E., Theocharis S. et al. Metallothionein expression in the high-risk carotid atherosclerotic plaque. // Curr. Med. Res. Opin., 2007; 23: 659-670.
17. Katsuda S., Kaji T. Atherosclerosis and extracellular matrix. // J. Atheroscler Thromb., 2003, 10: 267-274.
18. Newby A.C. Dual role of matrix metalloproteinases in intimal thickening and atheroscle-rotic plaque rupture. // Physiol. Rev., 2005, 85: 1-31.
19. Naghavi M., Libby P., Falk E. et al. From vulnerable plaque to vulnerable patient. A call for new definitions and risk assessment strategies: part I. // Circulation, 2003; 108: 1664–1672.
20. Рагино Ю.И., Чернявский А.М., Полонская Я.В. и соавт. Изменение содержания провоспалительных цитокинов и деструктивных металлопротеиназ в процессе раз-вития атеросклеротического очага до нестабильной бляшки. // Кардиология, 2009;6: 43-50.