

СВЯЗЬ ОСТЕОНЕКТИНА С НЕКОТОРЫМИ БИОМАРКЕРАМИ ПРИ СТЕНОЗИРУЮЩЕМ АТЕРОСКЛЕРОЗЕ И КАЛЬЦИНОЗЕ КОРОНАРНЫХ АРТЕРИЙ

Рагино Ю.И.^{1*}, Кашианова Е.В.¹, Чернявский А.М.², Волков А.М.², Полонская Я.В.¹, Иванова М.В.¹

¹ Научно-исследовательский институт терапии Сибирского отделения РАМН (НИИ терапии СО РАМН);

² Новосибирский НИИ патологии кровообращения им. академика Е.Н. Мешалкина Росмедтехнологий”, Новосибирск

Резюме

Прямым способом биоманнитного сепарирования белков с магнитными микросферами исследовано содержание в крови белка-маркера стромальных стволовых клеток с остеогенной потенцией — остеонектина — у 45 мужчин с коронарным атеросклерозом и 45 сопоставимых по возрасту мужчин без ИБС (контроль). Определены повышенная концентрация остеонектина в крови, особенно у мужчин со стенозирующим атеросклерозом (СА) и кальцинозом коронарных артерий, и ее значимые независимые ассоциации с некоторыми ключевыми биомаркерами атеросклероза, метаболического синдрома и наличием СА и кальциноза коронарных артерий. Полученные результаты позволяют заключить, что остеонектин может быть одним из новых биомаркеров СА и кальциноза коронарных артерий.

Ключевые слова: остеонектин, стенозирующий атеросклероз, кальциноз коронарных артерий, биомаркеры атеросклероза.

Коронарный атеросклероз является патоморфологической основой ишемической болезни сердца (ИБС), распространенность и смертность от осложнений которой остаются высокими в мире и в России. В зарубежных и российских публикациях подчеркивается комплексный характер и значимость таких звеньев атерогенеза как дислипидопротеинемия, эндотелиальная дисфункция, воспаление и другие [2, 10]. В последние годы в проблеме атеросклероза, в отношении высокого риска развития сердечно-сосудистых осложнений, большое внимание уделяется изучению стенозирующего атеросклероза (СА) и кальциноза аорты и коронарных артерий [9], в том числе активно ведется поиск их новых биомаркеров.

Известны данные об участии в атерогенезе костно-мозговых стволовых клеток гемопоэтической и стромальной линий дифференцировки. Предполагается, что пролиферирующие в интиму сосудов клетки имеют костно-мозговую природу и проникновение циркулирующих в кровотоке костно-мозговых колониеобразующих стволовых клеток гемопоэтической и стромальной линий дифференцировки в интиму сосудов происходит в местах концентрации липидов и развития атеросклеротических очагов [1, 4]. Стромальные стволовые клетки несут на своей поверхности маркер остеонектин — неколлагеновый гликопротеин костной ткани, избирательно связывающий соли кальция и фосфора с коллагеном. Остеонектин усиленно экспрессируется клетками, присутствующими в стенке сосуда при прогрессировании атеросклероза, а именно при кальцификации атеросклеротической бляшки. По мнению некоторых исследователей, высокое содержание в периферичес-

ком кровотоке остеонектин-положительных клеток может отражать наличие продуктивного этапа воспалительного процесса в сосудистой стенке [5, 6, 11].

Целью настоящего исследования было изучение содержания в крови белка остеонектина у мужчин с коронарным атеросклерозом, а также его связи с наличием у пациентов СА и кальциноза коронарных артерий и с некоторыми другими биомаркерами атеросклероза путем прямого способа биоманнитного сепарирования белков с магнитными микросферами.

Материал и методы

Исследование было проведено в рамках Программы совместных научных исследований НИИ терапии СО РАМН и НИИ патологии кровообращения после его одобрения этическими комитетами обоих учреждений. В исследование было включено 90 мужчин 41-73 лет (средний возраст — 56,6±4,6 лет). Всеми обследованными заполнялась форма информированного согласия на участие в исследовании.

Основную группу составили 45 пациентов с верифицированным коронарным атеросклерозом при проведении селективной коронароангиографии на ангиографической установке “Advantex LC/LP” (General Electric, США), без острого коронарного синдрома со стабильной стенокардией напряжения II-IV ФК, поступивших в Клинику ФГУ ННИИПК на операцию аортокоронарного шунтирования, и у которых в ходе операции при наличии интраоперационных показаний была проведена эндартериэктомия из коронарной артерии. Гистологический анализ материала эндартериэктомии, содержащего инти-

Таблица 1

Содержание белка остеонектина в сыворотке крови (мг/мл) у мужчин с коронарным атеросклерозом и контрольной группы

Методы оценки белка	Группы лиц	Средняя	Ошибка средней	Стандартное отклонение	Минимум - максимум	p
Метод Лоури	Атеросклероз	6,39*	0,49	1,19	3,15-11,69	0,000
	Контроль	3,87	0,25	0,81	1,85-5,77	
Метод электрофореза	Атеросклероз	5,75*	0,49	1,45	2,22-9,35	0,000
	Контроль	2,39	0,31	1,16	0,91-3,91	

му-медиа коронарной артерии, был проведен после стандартной окраски гематоксилин-эозином и Ван Гизон на бинокулярном микроскопе Axiostar Plus (C. Zeiss) с цифровым фотовыходом. Средний индекс массы тела (ИМТ) в группе был $30,1 \pm 2,1$ кг/м², средний объем талии (ОТ) — $102,2 \pm 8,7$ см, среднее САД/ДАД — $140,2 \pm 16,8$ / $88,7 \pm 9,0$ мм рт. ст.

Контрольную группу, сопоставимую по полу и возрасту, составили 45 мужчин, проходящих обследование в Клинике НИИ терапии СО РАМН, без ИБС согласно данным клинико-функциональных исследований, включая запись ЭКГ с расшифровкой по Миннесотскому коду. Средний ИМТ в группе был $27,7 \pm 2,4$ кг/м², средний ОТ — $94,5 \pm 8,8$ см, среднее САД/ДАД — $142,6 \pm 15,7$ / $89,9 \pm 9,3$ мм рт. ст. По числу курящих мужчин группы были также сопоставимы.

У всех мужчин однократно забирали кровь из локтевой вены утром натощак через 12 ч после приема пищи. Показатели липидного профиля (общий холестерин, ХС, триглицериды, ТГ, холестерин липопротеинов высокой и низкой плотности, ЛВП-ХС и ЛНП-ХС) и глюкозы сыворотки крови измеряли энзиматическими методами с использованием стандартных реактивов Biocon Fluitest (Германия) на биохимическом анализаторе Labsystem FP-901 (Финляндия). Методами иммуноферментного анализа с использованием стандартных тест-систем ELISAs (Biomerica, BCM Diagnostics, DSL) определяли в сыворотке крови уровни С-пептида, высокочувствительного С-реактивного протеина (вчСРП), фактора некроза опухоли (ФНО-альфа), интерлейкинов (ИЛ-1-бета, ИЛ-6, ИЛ-8) на ИФА анализаторе Multiscan EX (Финляндия).

Измерение содержания белка остеонектина в сыворотке крови проводили с использованием протеомной технологии “PureProteome Protein A and Protein G Magnetic Beads” (Millipore, США). Использовали прямой способ биоманнитного сепарирования белков с магнитными микросферами Protein A and Protein G Magnetic Beads и магнитным сепаратором Magna GrIPTM Rack. Приводим краткое описание методики.

Магнитные микросферы соединяли с антителами к специфическим антигенам А и G и 3-кратно промывали раствором фосфатного буфера, pH 7,4 с 0,1%

Твин 20. Далее, к ним добавляли 25 мкл кроличьих поликлональных антител к остеонектину человека (Chemicon, США), пробы инкубировали при комнатной температуре 10 минут на миниротаторе Bio RS-24 с платформой PRS-22 (Биосан, Латвия) и 3-кратно промывали раствором фосфатного буфера. К полученным комплексам добавляли 1 мл сыворотки крови обследуемых. Для образования комплекса иммуномагнито-чувствительных микросфер с рецепторами к остеонектину человека пробы инкубировали при 4 °С на миниротаторе Bio RS-24 с платформой PRS-22 в течение 1 часа. Затем пробы промывали 3-кратно раствором фосфатного буфера и добавляли для элюции 60 мкл 0,2 М глицина (pH 2,5), инкубировали 2 мин., переносили супернатанты в новые пробирки, добавляя 5 мкл 1 М трис (pH 8,5). Количественную оценку выделенного белка остеонектина в супернатантах проводили: 1) измерением белка по общепринятому методу Лоури и соавт. (1951) и 2) методом электрофореза в 6% полиакриламидном геле на аппарате “SE 600 Ruby Standard Dual Cooled Vertical” (GE Healthcare, Австрия) 1,5 часа при последующей окраске геля Coomassie blue R. Денситометрия гелей осуществлялась с использованием трансиллюминаторной системы “GelDoc” (BioRad, США). В качестве стандарта использовали набор белковых калибраторов “Sigma” (High Range, Molecular Weight 36-200 kDa), содержащий кроличий миозин 200 kDa, бета-

Таблица 2

Сравнение биомаркеров липидного обмена, углеводного обмена и воспаления между группами мужчин с коронарным атеросклерозом и контрольной (M±σ)

Показатель	Атеросклероз	Контроль
Общий ХС, мг/дл	223,2±30,6	215,1±31,5
ЛВП-ХС, мг/дл	40,1±10,2*	56,1±9,6
ТГ, мг/дл	178,4±73,6*	112,3±61,7
ЛНП-ХС, мг/дл	147,2±35,1	140,3±33,9
Глюкоза, мм/л	5,5±1,0	5,6±1,1
С-пептид, нг/мл	1,2±0,5*	0,4±0,2
вчСРП, мг/л	5,5±3,1*	1,2±0,6
ФНО-альфа, пг/мл	3,7±1,3*	1,8±0,8
ИЛ-1-бета, пг/мл	1,8±0,7	1,6±0,7
ИЛ-6, пг/мл	10,9±2,5*	5,2±1,3
ИЛ-8, пг/мл	23,4±8,8	17,1±5,9

Примечание: * — различие с контрольной группой при p<0,05.

Таблица 3
Корреляционные связи содержания белка остеонектина в сыворотке крови с исследованными биомаркерами атеросклероза у всех обследованных мужчин (n=90)

Исследуемые биомаркеры	Содержания остеонектина в сыворотке крови	
	r Пирсона	r Спирмена
Общий ХС	0,167	0,155
ЛПВП-ХС	-0,478**	-0,497*
ЛПНП-ХС	0,189	0,193
ТГ	0,322*	0,334
Глюкоза плазмы	0,413**	0,423*
С-пептид	0,396**	0,418**
вчСРП	0,235	0,247
ФНО-альфа	0,379**	0,355**
ИЛ-1-бета	0,113	0,128
ИЛ-6	0,282*	0,299
ИЛ-8	0,345*	0,377*
СА и кальциноз коронарных артерий (n=31)	0,309**	0,317*

Примечание: * – при $p < 0,05$, ** – при $p < 0,01$.

галактозидазу *E. coli* 116 кDa, кроличью фосфорилазу б 97 кDa, БСА 66 кDa, печеночную глутаминдегидрогеназу 55 кDa, яичный овальбумин 45 кDa, кроличью глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназу 36 кDa. Учитывалось, что молекулярный вес остеонектина – 43 кDa.

Статистическую обработку результатов проводили в лицензионной версии Программы SPSS for Windows, используя дескриптивный, корреляционный и линейно-регрессионный анализы. Критерием статистической достоверности был $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

По данным оценки содержания остеонектина в сыворотке крови методом Лоури было отмечено различие между основной и контрольной группами: у мужчин с коронарным атеросклерозом концентрация остеонектина в сыворотке крови была в 1,65 раз выше, чем в контрольной группе (табл. 1). По данным оценки содержания остеонектина в сыворотке крови методом электрофореза, также обнаружены значимые различия между группами. Так, концентрация остеонектина у мужчин с коронарным атеросклерозом была выше в 2,4 раза по сравнению с мужчинами контрольной группы.

Полученные результаты протеомных исследований свидетельствуют о повышенном содержании в крови при коронарном атеросклерозе маркера стромальных стволовых клеток остеонектина и не противоречат данным мировой и отечественной литературы [1, 4-6]. Так, по данным Габбасова З.А. [1], в крови пациентов с ИБС было обнаружено значительное увеличение количества клеток, экспрессирующих антиген к остеонектину, в отличие от здоровых доно-

ров без ИБС. Авторы предложили рассматривать повышенное количество остеонектин-положительных клеток как новый показатель наличия и развития атеросклеротического поражения сосудов человека.

Согласно данным гистологического исследования материала энarterиозектомии, у 31 (69%) из 45 мужчин с коронарным атеросклерозом был выявлен СА и кальциноз коронарных артерий, в том числе у 2-х пациентов при гистологическом исследовании атеросклеротических бляшек с кальцинозом были выявлены признаки оссификации и развития хрящевой ткани. Подобные гистологически обнаруженные признаки в атеросклеротических бляшках были описаны ранее Hunt J.L [7]. В сыворотке крови у этих 2 пациентов были обнаружены и наиболее высокие уровни остеонектина ($>9,0$ мг/мл).

У всех 90 мужчин, включенных в исследование, в сыворотке крови были определены также уровни некоторых ключевых липидных (общий ХС, ЛВП-ХС, ЛНП-ХС, ТГ), воспалительных (вчСРП, ФНО-альфа, ИЛ-1-бета, ИЛ-6, ИЛ-8) и метаболических (С-пептид, глюкоза) биомаркеров атеросклероза (табл. 2). В группе мужчин с коронарным атеросклерозом оказались повышенными уровни в крови вчСРП в 4,6 раз, ФНО-альфа – в 2,0 раза, ИЛ-6 в – 2,1 раза, с-пептида – в 3 раза, ТГ – в 1,6 раз и сниженным – уровень ЛВП-ХС в 1,4 раза в сравнении с мужчинами контрольной группы.

Корреляционный анализ (табл. 3) выявил значимые корреляционные связи уровня остеонектина в крови с уровнями в крови ТГ, ЛВП-ХС, глюкозы, С-пептида, ФНО-альфа, ИЛ-6, ИЛ-8. Значимые корреляции были также отмечены между содержанием в крови остеонектина и наличием СА и кальциноза коронарных артерий, что согласуется с данными Collin-Osdoby P. о повышенных концентрациях в крови и непосредственно в атеросклеротических бляшках при атеросклерозе некоторых белков костной ткани – таких, как остеокальцин, костные морфогенные белки, остеонектин, остеоопонтин и др. [3].

Проведенный далее линейный регрессионный анализ также выявил значимые независимые ассоциации ($p < 0,001$) между содержанием остеонектина в крови (независимая переменная) и уровнями в крови ТГ, ЛВП-ХС, С-пептида, ФНО-альфа, ИЛ-6, а также наличием у мужчин СА и кальциноза коронарных артерий, повышенных ИМТ и ОТ (зависимые переменные).

Обсуждая полученные результаты корреляционного и регрессионного анализов, необходимо отметить, что нами обнаружены ассоциации содержания остеонектина в крови с такими липидными и воспалительными биомаркерами атерогенеза, которые фактически являются одновременно и биохимическими маркерами метаболического синдрома (повышенные в крови уровни ТГ, С-пептида, ФНО-альфа, сниженное содер-

жание ЛВП-ХС). Полученные результаты согласуются с результатами серии опубликованных работ, выполненных под руководством проф. Wong N.D., в которых подчеркивается выраженная ассоциация метаболического синдрома с прогрессирующим кальцинозом и стенозом аорты, аортального клапана и коронарных артерий. Авторы говорят об иницирующем и потенцирующем влиянии метаболического синдрома на раннее возникновение и значительную прогрессию СА и кальциноза коронарных артерий [8, 12].

Таким образом, на основании проведенного исследования с помощью протеомных технологий,

можно заключить, что остеонектин как маркер стромальных стволовых клеток с остеогенной потенцией, вероятно, играет важную роль в атерогенезе и может быть одним из новых биомаркеров СА и кальциноза коронарных артерий. Об этом свидетельствуют, во-первых, его повышенные концентрации в крови, особенно у лиц с СА и кальцинозом коронарных артерий и, во-вторых, его значимые независимые ассоциации с некоторыми ключевыми биомаркерами атеросклероза и метаболического синдрома, а также с самим СА и кальцинозом коронарных артерий.

Литература

1. Габбасов З.А., Агапов А.А., Сабурова О.С. и др. Определение циркулирующих стромальных стволовых клеток с остеогенной потенцией в крови пациентов с ишемической болезнью сердца методом лазерной поточной цитометрии // Бюлл. эксп. биол. мед., 2005; 139 (2): 237-240.
2. Диагностика и коррекция нарушений липидного обмена с целью профилактики и лечения атеросклероза. Российские рекомендации. IV пересмотр. Москва, ВНОК // Кардиоваск. тер. и проф., 2009; 6 (Прил. 3), 58 с.
3. Collin-Osdoby P. Regulation of vascular calcification by osteoclast regulatory factors RANKL and osteoprotegerin // Circ. Res., 2004; 95 (11): 1046-1057.
4. Gabbasov Z.A., Agapov A.A., Saburova O.S. et al. Circulating stromal osteonectin-positive progenitor cells and stenotic coronary atherosclerosis // Can. J. Physiol. Pharmacol., 2007; 85(3-4): 295-300.
5. Gadeau A.P., Chaulet H., Daret D. et al. Time course of osteopontin, osteocalcin, and osteonectin accumulation and calcification after acute vessel wall injury // J. Histochem. Cytochem., 2001; 49: 79-86.
6. Gossli M., Modder U.I., Atkinson E.J. et al. Osteocalcin expression by circulating endothelial progenitor cells in patients with coronary atherosclerosis // J. Am. Coll. Cardiol., 2008; 52(16): 1314-1325.
7. Hunt J.L., Fairman R., Mitchell M.E. et al. Bone formation in carotid plaques: a clinicopathological study // Stroke, 2002; 33: 1214-1219.
8. Ibebuogu U.N., Ahmadi N., Hajsadeghi F. et al. Measures of coronary artery calcification and association with the metabolic syndrome and diabetes // J. Cardiometab. Syndr., 2009; 4(1): 6-11.
9. Messika-Zeitoun D., Bielak L.F., Peyser P.A. et al. Aortic valve calcification: determinants and progression in the population // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 2007; 27: 642-648.
10. Tabet F., Rye K.A. High-density lipoproteins, inflammation and oxidative stress // Clin. Sci., 2009; 116 (2): 87-98.
11. Trion A., van der Laarse A. Vascular smooth muscle cells and calcification in atherosclerosis // Am. Heart J., 2004; 147(5): 808-814.
12. Wong N.D., Sciammarella M.G., Polk D. et al. The metabolic syndrome, diabetes, and subclinical atherosclerosis assessed by coronary calcium // J. Am. Coll. Cardiol., 2003; 41: 1547-1553.

Abstract

Blood levels of osteonectin (a protein marker of stromal stem cells with osteogenic potential) were measured, using the method of biomagnetic protein separation with magnetic microspheres, in 45 men with coronary atherosclerosis and 45 age-matched controls without coronary heart disease. Osteonectin concentration was maximal in men with atherosclerotic stenosis (AS) and calcinosis of coronary arteries. Osteonectin levels were independently associated with several key markers of atherosclerosis, metabolic syndrome, and coronary AS and calcinosis. Therefore, osteonectin could be one of the new markers of coronary AS and calcinosis.

Key words: Osteonectin, atherosclerotic stenosis and calcinosis of coronary arteries, atherosclerosis biomarkers.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов Президента РФ № МД-539.2007.7 и РФФИ № 09-04-00374а

Поступила 25/02 — 2010

© Коллектив авторов, 2010
630089, г. Новосибирск, ул. Б. Богаткова, 175/1
тел: (383) 2674743,
факс: (383) 2642516,
E-mail: ragino@mail.ru

[Рагино Ю.И. (*контактное лицо) — д.м.н., зав. лабораторией клинических биохимических и гормональных исследований, Каштанова Е.В. — к.б.н., научный сотрудник, Чернявский А.М. — д.м.н., профессор, зам. директора по научной работе, Волков А.М. — д.м.н., зав. лабораторией патоморфологии, Полонская Я.В. — к.б.н., ст. научный сотрудник, Иванова М.В. — ст. научный сотрудник].