

БИОХИМИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ МЕТАБОЛИЗМА КОСТНОЙ ТКАНИ И ИХ ВЛИЯНИЕ НА НЕСТАБИЛЬНОСТЬ АТЕРОСКЛЕРОТИЧЕСКИХ ОЧАГОВ В СОСУДИСТОЙ СТЕНКЕ

Полонская Я. В.¹, Каштанова Е. В.^{1,3}, Мурашов И. С.², Волков А. М.², Чернявский А. М.², Рагино Ю. И.¹

Цель. Изучить некоторые из биохимических показателей костного метаболизма в сосудистой стенке у мужчин с коронарным атеросклерозом, оценить влияние этих маркеров на нестабильность атеросклеротического очага и выявить особенности их распределения в нестабильных бляшках разных типов.

Материал и методы. В исследование было включено 65 мужчин в возрасте 46-79 лет, поступивших в Клинику ФГБУ НИИП им. акад. Е. Н. Мешалкина Минздрава России на операцию коронарного шунтирования. В ходе операции у мужчин была проведена эндартерэктомия из коронарной(-ых) артерии(-й). Каждый материал эндартерэктомии, был симметрично разделен на несколько фрагментов для проведения гистологических и биохимических исследований. По результатам гистологического анализа 193 образцов были определены: 19 фрагментов неизменённой ткани интимы, 102 стабильных, 72 нестабильных бляшек. Был определен тип нестабильных бляшек: 1) липидный, 2) воспалительно-эрозивный 3) дистрофически-некротический. В гомогенатах фрагментов определяли: остеопротегерин, кальцитонин, остеокальцин, холестерин. Статистическую обработку результатов проводили в SPSS (13.0).

Результаты. В результате проведённых гистологических исследований в нестабильных очагах был выявлен более высокий уровень кальцификации по сравнению со стабильными бляшками. Биохимические исследования показали повышение уровней кальцитонина и остеокальцина. Если рассматривать разные типы нестабильных бляшек, то самый высокий уровень этих показателей был выявлен в бляшках дистрофически-некротического типа, меньше всего как кальцитонина, так и остеокальцина было в бляшках воспалительно-эрозивного типа. В стабильных атеросклеротических очагах был выявлен самый высокий уровень остеопротегерина. Содержание холестерина в стабильных и нестабильных атеросклеротических очагах, оказалось почти в 4 раза выше ($p < 0,01$) по сравнению с неизменённой интимой. Была выявлена связь холестерина с кальцитонином и остеокальцином.

Заключение. Полученные результаты свидетельствуют, что повышение остеопротегерина способствует стабилизации очага, а кальцитонин и остеокальцин могут являться маркерами нестабильности атеросклеротической бляшки, вызванной повышенной кальцификацией.

Российский кардиологический журнал 2016, 11 (139): 66–69
<http://dx.doi.org/10.15829/1560-4071-2016-11-66-69>

Ключевые слова: остеопротегерин, кальцитонин, остеокальцин, холестерин, атеросклеротическая бляшка.

Полонская Я. В.* — к.б.н., с.н.с. лаборатории клинических биохимических и гормональных исследований терапевтических заболеваний, Каштанова Е. В. — к.б.н., с.н.с. лаборатории клинических биохимических и гормональных исследований терапевтических заболеваний, доцент, Мурашов И. С. — м.н.с. лаборатории экспериментальной хирургии и морфологии, Волков А. М. — д.м.н., зав. лаборатории патоморфологии и электронной микроскопии, Чернявский А. М. — д.м.н., профессор, заместитель директора по научной работе, Рагино Ю. И. — д.м.н., профессор РАН, руководитель лаборатории клинических биохимических и гормональных исследований терапевтических заболеваний.

¹ФГБУ Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины, Новосибирск; ²ФГБУ Новосибирский научно-исследовательский институт патологии кровообращения имени академика Е. Н. Мешалкина Минздрава России, Новосибирск; ³Новосибирский государственный технический университет, Новосибирск, Россия.

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):
yana-polonskaya@yandex.ru

Рукопись получена 13.05.2016
Рецензия получена 20.06.2016
Принята к публикации 27.06.2016

BIOCHEMICAL MARKERS OF BONE TISSUE METABOLISM INFLUENCE ON VULNERABILITY OF ATHEROSCLEROTIC LESIONS

Polonskaya Ya. V.¹, Kashtanova E. V.^{1,3}, Murashov I. S.², Volkov A. M.², Chernyavskiy A. M.², Ragino Yu. I.¹

Aim. To assess some of biochemical markers of bone tissue metabolism, in vessel wall in males with coronary atherosclerosis; to evaluate the influence of these markers on vulnerability of atherosclerotic lesion and to figure out the specifics of their spread among unstable plaques of various kinds.

Material and methods. Totally, 65 males included at the age 46-79 y.o., admitted to the Clinics of E.N. Meshalkin Novosibirsk Scientific-Research Institute of Circulation Pathology for coronary bypass surgery. During operation, an endarterectomy was performed of coronary arteries. Each specimen of endarterectomy was symmetrically divided to fragments for histological and biochemical studies. By the results of histological analysis, in 193 specimens we found: 19 fragments of intact intima, 102 stable, 72 unstable plaques. Then the types of unstable plaques were established: 1) lipids; 2) inflammatory-erosive; 3) dystrophic-necrotic. In homogenates of the fragments we assessed: osteoprotegerin, calcitonin, osteocalcin, cholesterol. Statistics was done with SPSS (13.0).

Results. By the results of the performed histology, in unstable plaques there was higher level of calcification comparing to stable plaques. Biochemical studies showed increased levels of calcitonin and osteocalcin. If to assess the diverse types of unstable plaques, the highest level of these parameters was

found in dystrophic-necrotic plaques; lowest amount of calcitonin and osteocalcin was found in inflammatory-erosive type. Content of cholesterol in stable and unstable atherosclerotic lesions was about 4 times higher ($p < 0,01$) in comparison with intact intima. Relation of cholesterol with calcitonin and osteocalcin was found, as well.

Conclusion. The data shows that increased osteoprotegerin aids the stabilization of lesion, and calcitonin and osteocalcin might be markers of plaque instability, caused by increased calcification.

Russ J Cardiol 2016, 11 (139): 66–69
<http://dx.doi.org/10.15829/1560-4071-2016-11-66-69>

Key words: osteoprotegerin, calcitonin, osteocalcin, cholesterol, atherosclerotic plaque.

¹Scientific-Research Institute of Therapy and Prevention Medicine, Novosibirsk; ²E.N. Meshalkin Novosibirsk Scientific-Research Institute of Circulation Pathology, Novosibirsk; ³Novosibirsk State Technical University, Novosibirsk, Russia.

Проблема сосудистого кальциноза в последнее время стала одной из приоритетных в кардиологии. Кальцификация коронарных артерий рассматривается как маркер риска атеросклероза и его осложнений. Сосудистая кальцификация — это сложный процесс, который во многом сопоставим с остеогенезом и имеет те же регуляторные белки. Установлено, что компонентами сосудистого кальцификата являются соли кальция, фосфаты, остеокальцин, остеокальцин, коллаген I типа и другие соединения характерные для костной ткани [1, 2]. В кальцифицированной атеросклеротической бляшке идентифицированы остеобластоподобные клетки, определено существование активной резорбции очагов эктопической сосудистой кальцификации. Накопление нерастворимого осадка кристаллического фосфата кальция в атеросклеротических бляшках идёт даже на ранних стадиях атеросклеротических поражений [3-5].

Целью нашего исследования стало изучение некоторых из биохимических показателей костного метаболизма в сосудистой стенке у мужчин с коронарным атеросклерозом, оценка влияния этих маркеров на нестабильность атеросклеротического очага и выявление особенностей их распределения в нестабильных бляшках разных типов.

Материал и методы

Исследование проведено в рамках Программы совместных научно-исследовательских работ НИИТПМ и ФГБУ ННИИПК им. акад. Е. Н. Мешалкина Минздрава России на 2011-2016гг. Проведение исследования было одобрено Этическими комитетами учреждений. В исследование было включено 65 мужчин в возрасте 46-79 лет, поступивших в Клинику ФГБУ ННИИПК им. акад. Е. Н. Мешалкина Минздрава России на операцию коронарного шунтирования. Критериями исключения пациентов из исследования были инфаркт миокарда давностью менее 6 месяцев, острые и обострение хронических инфекционно-воспалительных заболеваний, почечная недостаточность, активные заболевания печени, онкологические заболевания, гиперпаратиреоз. Всеми пациентами заполнялась форма Информированного согласия на участие в исследовании.

В ходе операции у мужчин была проведена эндартерэктомия из коронарной(-ых) артерии(-й). Каждый материал эндартерэктомии был продольно и поперечно симметрично разделен на несколько фрагментов для проведения гистологических и биохимических исследований. Гистологический анализ 193 фрагментов коронарных артерий после макроскопического описания образцов (распространенность бляшки, степень стенозирования просвета артерии, кровоизлияния в структуры бляшки, участки обызвествления, тромбы) и стандартной окраски

проводился на бинокулярном микроскопе Axiostar Plus (C. Zeiss, Германия) с цифровым фотовыходом. Гистологический анализ проводился с подробным описанием состояния покрышки бляшки (толстая, тонкая, истонченная, фиброзная, рыхлая, плотная, гиалинизированная, участок истонченной покрышки, кровоизлияния в покрышке, разрыв, изъязвление в покрышке, обызвествление, атерокальциноз покрышки), её эндотелиальной поверхности, ядра бляшки, периферии бляшки/очага. Все бляшки, по результатам гистологического анализа, были разделены на стабильные и нестабильные. Нестабильная атеросклеротическая бляшка определялась согласно критериям Waksman R [6], как поврежденная бляшка с толщиной фиброзной покрышки менее 65 мкм, инфильтрированная макрофагами и Т-лимфоцитами (более 25 клеток в поле зрения диаметром 0,3 мм), с крупным липидным ядром (>40%). Из 193 образцов было определено 19 фрагментов неизмененной ткани интимы, атероматозная бляшка стабильная была детерминирована в 102 случаях, атероматозная бляшка нестабильная — в 72. Был определен тип нестабильных бляшек (Waksman R, Seruys PW, 2004; Шлычкова Т.П. и др., 2005): 1) фиброатерома с тонкой фиброзной покрышкой (липидный тип), характеризуется наличием крупного атероматозного ядра — 27 образцов; 2) бляшка с повышенным содержанием протеогликанов или воспалением, приводящим к эрозии и тромбозу (воспалительно-эрозивный тип) — 14 образцов; 3) бляшки с выраженными дистрофическими изменениями и некрозами в покрышках, с кальцинированным ядром (дистрофически-некротический тип) — 31 образец [7].

Для проведения биохимических исследований замороженные в жидком азоте образцы были гомогенизированы в растворе фосфатно-солевого буфера. Полученные гомогенаты делили на аликвоты для проведения дальнейших биохимических анализов. В гомогенатах иммуноферментными методами определяли: остеопротегерин (Bioscience, Австрия), кальцитонин (Biomerica, Германия), остеокальцин (Immunodiagnostic Systems Ltd, Великобритания). Холестерин определяли с помощью ферментативного метода. (Диакон — ДС, Россия)

Статистическую обработку результатов проводили в программе SPSS (13.0). Значения в таблицах представлены как $M \pm m$, где M — среднее арифметическое значение, m — ошибка среднего. Для оценки формы распределения признаков использовали тест Колмогорова-Смирнова. Достоверность различий между средними значениями оценивали с использованием t -критерия Стьюдента (для признаков с нормальным распределением) или критерия Манна-Уитни (для признаков с ненормальным распределением). Множественное сравнение между группами проводили методом дисперсионного анализа (One-Way-ANOVA)

Таблица 1

Уровни кальцитонина, остеопротегерина и остеокальцина на разных этапах развития атеросклеротического очага

Показатель	Неизменённая интима, n=11	Стабильная бляшка, n=65	Нестабильная бляшка, n=50
Кальцитонин (пг/мг белка)	13,49±3,17	20,63±4,1	28,29±3,64*
Остеопротегерин (пг/мг белка)	171,04±14,03	276,71±25,91*	220,17±20,6
Остеокальцин (нг/мг белка)	26,99±16,16	69,19±17,17	128,47±19,06* [#]
Холестерин (мг/мг белка)	14,36±2,97	56,9±8,98**	53,97±9,92**

Примечание: * — p<0,05 в сравнении с неизменённой интимой, ** — p<0,01 в сравнении с неизменённой интимой, [#] — p<0,05 в сравнении со стабильной бляшкой.

Таблица 2

Уровни кальцитонина, остеопротегерина и остеокальцина в разных типах нестабильных бляшек

Показатели	Тип нестабильной бляшки		
	1. Воспалительно-эрозивный, n=14	2. Липидный, n=27	3. Дистрофически-некротический, n=31
Кальцитонин, (пг/мг белка)	9,32±2,61*	14,67±2,39*	41,21±9,38
Остеопротегерин, (пг/мг белка)	186,77±32,79	277,1±29,64	203,51±40,93
Остеокальцин, (нг/мг белка)	3,54±1,1* [#]	96,27±23,79	131,8±17,61
Холестерин (мг/мг белка)	21,98±3,17*	48,87± 10,26	75,87±20,57

Примечание: * — p<0,05 в сравнении с дистрофически-некротическим типом, [#] — p<0,05 в сравнении с липидным типом.

с использованием критерия Vonfeggoni для нормального распределения и методом Краскела-Уоллиса для ненормального. Корреляционные связи оценивали с помощью критериев Спирмена. Различия считались статистически значимыми при p<0,05.

Результаты и обсуждение

В результате проведённых нами исследований в нестабильных бляшках был выявлен более высокий уровень кальцификации по сравнению со стабильными бляшками. Кальцифицированными оказались 77% нестабильных бляшек, причём крупноглыбчатые кальцификаты в них выявлены в 39% случаев. Среди стабильных бляшек было кальцифицировано 52%, на крупноглыбчатые кальцификаты приходилось 23%. Таким образом, нестабильность атеросклеротических очагов ассоциируется с более высоким уровнем кальцификации.

Мы исследовали возможные этиопатогенетические связи кальцификации атеросклеротических очагов с нарушениями липидного и фосфорно-кальциевого обмена. Для этого в образцах были определены уровни холестерина, кальцитонина, остеопротегерина и остеокальцина. Кальцитонин влияет на транспорт ионов Ca²⁺ через клеточные мембраны. Он стимулирует поглощение ионов Ca²⁺ митохондриями и тем самым задерживает отток ионов Ca²⁺ из клетки, что может отражаться на кальцификации сосудистой стенки. В проведённом нами ранее исследовании [8] выявлено повышение кальцитонина в крови у мужчин с коронарным атеросклерозом, особенно у пациентов с преобладанием нестабильных бляшек в коронарных артериях. Полученные нами данные не противоречат указанному результату. Так, уровень

кальцитонина был в 2,1 раза выше (p<0,05) в нестабильных атеросклеротических очагах по сравнению с неизменённой интимой. Содержание кальцитонина в стабильных бляшках также было выше в 1,5 раза в сравнении с неизменённой интимой, но различия были недостоверны (табл. 1).

Повышенный уровень кальцитонина стимулирует остеобласты, которые синтезируют основные компоненты межклеточного вещества — коллаген 1 типа, щелочную фосфотазу, остеокальцин, остеоонектин и другие [9]. По нашим данным, по мере развития очага от условной интимы к нестабильной бляшке возрастал не только уровень кальцитонина, но значительно увеличивалось содержание остеокальцина. Уровень остеокальцина был достоверно выше в 1,86 раза в нестабильных бляшках по сравнению со стабильными и более чем в 4 раза по сравнению с интимой (табл. 1).

Рядом авторов [10, 11] было показано, что остеопротегерин является модулятором кальцификации стенки сосудов. Это подтверждается тем, что у мышей с делецией гена остеопротегерина развивается кальцификация артерий. Данные артерии являются местами экспрессии остеопротегерина. Механизм регуляции остеопротегерином кальцификации артерий не известен.

В нашем исследовании самый высокий уровень остеопротегерина был выявлен в стабильных атеросклеротических очагах, в 1,62 (p<0,05) и 1,26 раза выше, чем в неизменённой ткани интимы и нестабильной бляшке, соответственно (табл. 1), что указывает на то, что возможно остеопротегерин может оказывать защитное действие на артерии, предупреждая патологическую кальцификацию и стабилизи-

руя атеросклеротическую бляшку, ингибируя умеренные воспалительные процессы. В проведённых нами ранее исследованиях [12] была выявлена связь между уровнями остеопротегерина и интерлейкина-6. Вероятно, повышение уровня остеопротегерина — компенсаторный процесс, способствующий стабилизации атеросклеротического очага.

Холестерин, как и ожидалось, оказался почти в 4 раза выше ($p < 0,01$) в атеросклеротических очагах, по сравнению с неизменённой интимой. При проведении корреляционного анализа была выявлена средняя связь холестерина с кальцитонином и остеокальцином $r = 0,474$ и $0,459$ ($p < 0,01$), соответственно.

Если рассматривать уровень кальцификации в зависимости от типа нестабильной бляшки, то оказалось, что наименее кальцифицированы бляшки воспалительного типа, в 50% случаев гистологический анализ показал отсутствие кальцификатов. Наиболее кальцифицированными, как и ожидалось, оказались бляшки некротически-дистрофического типа, кальцификаты были в 88% атеросклеротических очагов данного типа. Липидный тип был кальцифицирован на 64%.

При изучении нестабильных бляшек различного типа самый высокий уровень кальцитонина и остеокальцина был выявлен, как и ожидалось, в бляшках

дистрофически-некротического типа (табл. 2). Так, в бляшках этого типа уровень кальцитонина был выше по сравнению с воспалительно-эрозивным и липидным типом в 4,42 и 2,8 раза ($p < 0,05$), соответственно. Самые низкие уровни как кальцитонина, так и остеокальцина были в бляшках воспалительно-эрозивного типа. Это согласуется с проведёнными нами ранее исследованиями, которые показали связь кальцификации атеросклеротических бляшек с повышенным уровнем остеокальцина. Самый высокий уровень остеопротегерина был в бляшках липидного типа.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют, что повышение остеопротегерина способствует стабилизации очага, а кальцитонин и остеокальцин могут являться маркерами нестабильности атеросклеротической бляшки, вызванной повышенной кальцификацией.

Расшифровка механизмов, определяющих связь между развитием атеросклероза и патологическими нарушениями фосфорно-кальциевого обмена, имеет существенное значение для разработки новых подходов к изучению факторов риска атеросклеротического поражения сосудов и разработки новых методов профилактики и лечения этого заболевания.

Литература

1. Qiao JH, Mishra V, Fishbein MC, et al. Multinucleated giant cells in atherosclerotic plaques of human carotid arteries: Identification of osteoclast-like cells and their specific proteins in artery wall. *Exp Mol Pathol* 2015; 99 (3): 654-62.
2. Higgins CL, Isbilir S, Basto P, et al. Distribution of alkaline phosphate, osteopontin, RANK ligand and osteoprotegerin in calcified human carotid atheroma. *Protein J*. 2015; 34 (5): 315-28.
3. Ageev FT, Barinova IV, Seredina EM, et al. The formation mechanisms of calcification of the arteries. *Cardiology Herald*. 2012; VII (XIX): 57-63. Russian (Ageev Ф.Т., Баринова И.В., Середина И.М. и др. Механизмы формирования кальцификации артерий. *Кардиологический вестник* 2012; VII(XIX): 57-63.
4. Ragino Yul, Volkov AM, Chernyavskiy AM. Stages of development of atherosclerotic lesion and types of unstable plaques — pathophysiological and histological characteristics. *Rus J Card*. 2013; 5(103):88-95. Russian (Рагино Ю.И., Волков А.М., Чернявский А.М. Стадии развития атеросклеротического очага и типы нестабильных бляшек — патофизиологическая и гистологическая характеристика. *Российский кардиологический журнал* 2013; 5(103): 88-95).
5. Han RI, Wheeler TM, Lumsden AB, et al. Morphometric analysis of calcification and fibrous layer thickness in carotid endarterectomy tissues. *Comput Biol Med*. 2016; 70: 210-9.
6. Waksman R, Seruys PW. *Handbook of the vulnerable plaque*. London 2004.
7. Shlichkova TP, Zhdanov VS, Karpov YuA, et al. Main types of unstable atherosclerotic plaques and their prevalence in coronary arteries in acute myocardial infarction. *Archives of pathology* 2005; 3: 24-8. Russian (Шлычкова Т.П., Жданов В.С., Карпов Ю.А. и др. Основные типы нестабильных атеросклеротических бляшек и их распространённость в коронарных артериях при остром инфаркте миокарда. *Архив патологии*, 2005; 3: 24-8).
8. Polonskaya YaV, Kashtanova EV, Murashov IS, et al. The relationship of the main indicators of calcium and lipid exchange with atherosclerosis of the coronary arteries. *Atherosclerosis and Dislipidemii* 2015; 1: 24-8. Russian (Полонская Я.В., Каштанова Е.В., Мурашов И.С. и др. Взаимосвязь основных показателей кальциевого и липидного обмена с атеросклерозом коронарных артерий. *Атеросклероз и дислипидемии* 2015, 1: 24-8).
9. Wookey PJ, Zulli A, Hare DL. The elevated expression of calcitonin receptor by cells recruited into the endothelial layer and neo-intima of atherosclerotic plaque. *Histochem Cell Biol*. 2009; 132(2): 181-9.
10. Davaine J-M, Quillard T, Chatelais M, et al. Bone Like Arterial Calcification in Femoral Atherosclerotic Lesions: Prevalence and Role of Osteoprotegerin and Pericytes. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2016; 51: 259-67.
11. Schoppet M, Preissner KT, Hofbauer LC. RANK ligand and osteoprotegerin: paracrine regulators of bone metabolism and vascular function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22(4): 549-53.
12. Polonskaya YaV, Kashtanova EV, Stakhneva EM, et al. Association of osteocalcin and osteoprotegerin with inflammatory biomarkers in the vascular wall in men with coronary atherosclerosis. Abstracts of the Russian national Congress of cardiology 2015; 507. Russian (Полонская Я.В., Каштанова Е.В., Стахнёва Е.М. и др. Ассоциации остеокальцина и остеопротегерина с воспалительными биомаркерами в сосудистой стенке у мужчин с коронарным атеросклерозом. Тезисы Российского национального конгресса кардиологов 2015, 507).