

Клеточные и гуморальные маркеры апоптоза при остром коронарном синдроме в сочетании с гипертонической болезнью

Л.В. Васина

Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени акад. И.П. Павлова
Клиническая больница №122 им. Л.Г. Соколова, Санкт-Петербург

Резюме

Цель работы — изучить содержание аннексина А5, sApo-1/Fas и sBcl-2 и количество циркулирующих мононуклеаров в апоптозе для уточнения их роли в патогенезе острого коронарного синдрома (ОКС) в сочетании с гипертонической болезнью (ГБ). Обследованы 83 больных ОКС (47 пациентов с нестабильной стенокардией (НС) и 36 — с острым инфарктом миокарда (ОИМ)) и 14 практически здоровых лиц. ГБ была определена у 15 пациентов с НС и у 17 с ОИМ. Установлено, что у больных ОКС, особенно в сочетании с ГБ, отмечалось достоверное по сравнению с контролем снижение количества жизнеспособных мононуклеаров и увеличение количества мононуклеаров в ранней стадии апоптоза (аннексин А5-«позитивных»). Наряду с этим наблюдалось достоверное увеличение содержания в крови sBcl-2, sApo-1/Fas и аннексина А5 у больных ОИМ по сравнению с пациентами с НС, особенно в сочетании с ГБ. Показана связь между уровнем sApo-1/Fas, аннексина А5 и количеством циркулирующих мононуклеаров в ранней стадии апоптоза. Таким образом, при ОКС, особенно в сочетании с ГБ, отмечается усиление клеточного апоптоза в результате гемодинамических нарушений, что приводит к активации противовоспалительных и антиапоптотических механизмов, направленных на уменьшение выраженности тромбофилии за счёт снижения тромбогенного потенциала эндотелиоцитов, подвергшихся апоптозу.

Ключевые слова: острый коронарный синдром, апоптоз эндотелиоцитов, аннексин А5, sApo-1/Fas, sBcl-2.

Cellular and humoral markers of apoptosis in acute coronary syndrome in the hypertensives

L.V. Vasina

St Petersburg Pavlov State Medical University, Hospital №122 named after L.G. Sokolov, St Petersburg

Resume

The aim of this work was to examine the contents of annexin A5, sApo-1/Fas and sBcl-2 and the number of circulating mononuclear cells in apoptosis in order to clarify their role in the pathogenesis of acute coronary syndrome (ACS) accompanied by arterial hypertension (AH). We examined 83 patients with ACS (47 patients with unstable angina and 36 with myocardial infarction) and 14 healthy individuals. AH has been identified in 15 patients with unstable angina and in 17 with myocardial infarction. The number of viable mononuclear cells was significantly decreased and the number of mononuclear cells at the early stages of apoptosis (annexin A5-“positive”) was significantly increased as compared to control group in patients with the ACS, especially if accompanied with AH. At the same time there was a significant increase of sBcl-2 and sApo-1/Fas and annexin A5 in blood of the patients with myocardial infarction compared to patients with unstable angina, especially if combined with AH. The association between the level of sApo-1/Fas, annexin A5 and the number of circulating mononuclear cells at the early stages of apoptosis was shown in the study. Thus, in ACS, especially if accompanied by AH, enhanced cell apoptosis resulting from hemodynamic abnormal changes leads to activation of antiapoptotic mechanisms aimed at the decrease of the thrombophilia severity by reducing thrombogenic features of endotheliocytes subjected to apoptosis.

Key words: acute coronary syndrome, endotheliocyte apoptosis, annexin A5, sApo-1/Fas, sBcl-2.

Статья поступила в редакцию: 28.11.08. и принята к печати: 04.12.08.

В клинической практике ишемическая болезнь сердца (ИБС) (в том числе и её острые осложнения) нередко сочетается с гипертонической болезнью (ГБ) [1].

Согласно современным представлениям, в патогенезе как острого коронарного синдрома (ОКС), так и ГБ имеет значение дисфункция эндотелиоцитов, сопровождающаяся их ускоренным апоптозом [2]. Экспозиция фосфатидилсерина (PS) на поверхности клеток, подвергшихся апоптозу, увеличивает их прокоагулянтный потенциал за счёт активации комплекса тканевого фактора (tissue factor, TF) и фактора VIIa (ф VIIa), что ведёт к развитию тромбофилии [3–4].

Основной путь инициации апоптоза реализуется через систему мембранно-связанных белков семейства опухоленекротических (tumour necrosis factor, TNF) рецепторов, к которым относится Apo-1/Fas. Показано, что при атеросклерозе иммунные клетки, включая активированные Т-лимфоциты и макрофаги, экспрессируя Fas-лиганд, запускают апоптоз эндотелиоцитов через взаимодействие с Fas-рецептором [5]. Повышение чувствительности эндотелиальных клеток к опосредованному Fas апоптозу связывают с изменением уровня экспрессии внутриклеточных белков семейства Bcl-2, которые функционируют как регуляторы апоптоза [6].

В последние годы большое внимание уделяется изучению биологической активности белков, относящихся к семейству аннексинов. Аннексин А5, как и другие аннексины, не выделяется среди нормальных клеток; источником его являются апоптотические и разрушенные клетки, в том числе кардиомиоциты и эндотелиоциты [7].

Данные о содержании в крови растворимых форм аннексина А5, Аро-1/Fas и Bcl-2 и количестве циркулирующих мононуклеаров, экспрессирующих на своей поверхности PS (аннексин А5-«позитивных»), при ОКС, особенно в сочетании с артериальной гипертензией (АГ), малочисленны и противоречивы, что и послужило основанием для данного исследования.

Материалы и методы

В исследование было включено 83 больных (21 женщина и 62 мужчины) с ОКС, средний возраст которых составил $59,8 \pm 10,5$ года. Пациенты не имели хронических воспалительных заболеваний, потенциально влияющих на функциональную активность лейкоцитов. Все обследованные были разделены на 2 группы: в первую группу вошли 47 пациентов, поступивших по поводу нестабильной стенокардии (НС), во вторую — 36 больных острым инфарктом миокарда (ОИМ). АГ 1–3-й степени в соответствии с критериями ВОЗ (1999) была определена у 15 пациентов с НС и у 17 с ОИМ. Диагноз ОИМ основывался на общепринятых критериях ВОЗ. При дифференциальной диагностике между ОИМ без подъема ST и нестабильной стенокардией ориентировались на уровень тропонина I. В третью (контрольную) группу вошли 14 практически здоровых лиц.

Растворимые формы Bcl-2, Аро-1/Fas и аннексина А5 в плазме крови определяли иммуноферментным методом, используя тест-системы фирмы «Bender MedSystems», Австрия. Количество циркулирующих мононуклеаров в апоптозе определяли с помощью метода проточной цитофлуориметрии, используя набор

ANNEXIN V-FITC-kit (Bender Medsystems, Австрия), включающий аннексин А5, конъюгированный с флюоресцеинизотиоцианатом (Annexin A5-FITC), пропидий иодид (PI) и связывающий буфер.

Внесение в клеточную суспензию двух меток — пропидиума иодида (PI) (для выявления позднего апоптоза и некроза) и аннексина А5-FITC (для выявления ранней стадии апоптоза) — позволяет одновременно оценить количество интактных, апоптотических и некротических клеток в данной суспензии: жизнеспособные клетки отрицательные и по аннексину А5, и по PI; клетки, находящиеся на ранней стадии апоптоза, положительные по аннексину А5 и отрицательные по PI; клетки на поздней стадии апоптоза положительные и по аннексину А5, и по PI; погибшие клетки отрицательные по аннексину А5 и положительные по PI.

Статистическую обработку данных проводили с помощью параметрических и непараметрических методов анализа с использованием программы Statistica 6.0.

Результаты исследования

Данные о количестве мононуклеаров, связывающих аннексин А5 и PI, у больных и в контрольной группе представлены в табл. 1.

У больных НС и ОИМ как с сопутствующей ГБ, так и без нее отмечалось достоверное по сравнению с контролем снижение количества жизнеспособных мононуклеаров и увеличение количества мононуклеаров в ранней стадии апоптоза (аннексин А5-«позитивных»). Также установлено достоверное увеличение количества аннексин А5-«позитивных» мононуклеаров в группах пациентов с ОИМ с сопутствующей ГБ по сравнению с больными ОИМ без ГБ ($27,1 \pm 4,23\%$ против $19,1 \pm 2,12\%$).

Данные о содержании растворимых форм Аро-1/Fas, Bcl-2 и аннексина А5 у больных и в контроле представлены в табл. 2.

Из представленных в табл. 2 данных видно, что у больных ОКС отмечалось достоверное по сравнению с конт-

Таблица 1

ЦИРКУЛИРУЮЩИЕ МОНОНУКЛЕАРЫ, СВЯЗЫВАЮЩИЕ АННЕКСИН А5 И PI (%), ПРИ ОСТРОМ КОРОНАРНОМ СИНДРОМЕ С СОПУТСТВУЮЩЕЙ ГИПЕРТОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ И БЕЗ НЕЕ, $M \pm m$

Показатель	Контроль (n = 14)	Острый коронарный синдром			
		НС (n = 32)	НС + ГБ (n = 15)	ОИМ (n = 19)	ОИМ + ГБ (n = 17)
Интактные клетки (аннексин А5-PI ⁻)	$92,1 \pm 6,01$	$79,8 \pm 11,45^*$	$78,7 \pm 10,32^*$	$79,0 \pm 6,29^*$	$71,2 \pm 9,24^*$
Ранняя стадия апоптоза (аннексин А5 ⁺ PI ⁻ -клетки),	$6,5 \pm 1,31$	$18,3 \pm 2,11^*$	$19,5 \pm 3,21^*$	$19,1 \pm 2,12^*$	$27,1 \pm 4,23^{* \#}$
Поздняя стадия апоптоза (аннексин А5 ⁺ PI ⁺ -клетки)	$1,1 \pm 0,23$	$1,25 \pm 0,19$	$1,17 \pm 0,21$	$1,19 \pm 0,23$	$1,01 \pm 0,12$
Погибшие клетки (аннексин А5-PI ⁺ -клетки)	$0,27 \pm 0,03$	$0,67 \pm 0,12$	$0,58 \pm 0,13$	$0,65 \pm 0,21$	$0,61 \pm 0,14$

Примечание: ГБ — гипертоническая болезнь; ОИМ — острый инфаркт миокарда; НС — нестабильная стенокардия.

* — результат статистически достоверно отличается от контроля ($p < 0,05$);

— статистически достоверные различия между группами больных ОИМ в сочетании с ГБ и без нее ($p < 0,05$).

Таблица 2

СОДЕРЖАНИЕ РАСТВОРИМЫХ ФОРМ Bcl-2, Apo-1/Fas И АННЕКСИНА A5 ПРИ ОСТРОМ КОРОНАРНОМ СИНДРОМЕ С СОПУТСТВУЮЩЕЙ ГИПЕРТОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ И БЕЗ НЕЕ, М ± m

Показатель	Контроль	Острый коронарный синдром			
		НС (n = 32)	НС + ГБ (n = 15)	ОИМ (n = 19)	ОИМ + ГБ (n = 17)
sApo-1/Fas, (пг/мл)	1664,0 ± 209,22	1980,4 ± 112,62*	1991,6 ± 102,92*	2670,0 ± 162,34*#	2672,9 ± 154,27*^
sBcl-2, (МЕ/мл)	13,7 ± 3,12	29,1 ± 8,16*	28,9 ± 7,32*	57,8 ± 11,41*#	59,2 ± 10,15*^
Аннексин A5, нг/мл	0,89 ± 0,11	4,9 ± 0,22*	5,2 ± 0,31*	6,1 ± 1,02*	6,9 ± 0,93*^

Примечание: ГБ — гипертоническая болезнь; ОИМ — острый инфаркт миокарда; НС — нестабильная стенокардия.

* — результат статистически достоверно отличается от контроля ($p < 0,05$);

— результат статистически достоверно отличается между группами больных ОИМ и НС без ГБ ($p < 0,05$);

^ — результат статистически достоверно отличается между группами больных ОИМ и НС в сочетании с ГБ ($p < 0,05$).

ролем повышение в крови растворимых форм sApo-1/Fas, sBcl-2 и аннексина A5, наиболее выраженное при ОИМ.

Наблюдалось достоверное увеличение содержания sBcl-2 и sApo-1/Fas у пациентов с ОИМ по сравнению с больными НС без сопутствующей ГБ (уровень sBcl-2 при ОИМ составил $57,8 \pm 11,41$ МЕ/мл, при НС — $29,1 \pm 8,16$ МЕ/мл, sApo-1/Fas — $2670,0 \pm 162,34$ пг/мл и $1980,4 \pm 112,62$ пг/мл соответственно). У больных НС и ОИМ с сопутствующей ГБ также отмечалось достоверное повышение в крови sBcl-2 и sApo-1/Fas при ОИМ по сравнению с НС (уровень sBcl-2 при ОИМ составил $28,9 \pm 7,32$ МЕ/мл, при НС — $59,2 \pm 10,15$ МЕ/мл, sApo-1/Fas — $1991,6 \pm 102,92$ пг/мл и $2672,9 \pm 154,27$ пг/мл соответственно).

При анализе содержания в крови аннексина A5 достоверное увеличение его в крови отмечалось при ОИМ по сравнению с НС с сопутствующей ГБ ($6,9 \pm 0,93$ нг/мл против $5,2 \pm 0,31$ нг/мл). Выявлена прямая корреляционная зависимость между уровнем sApo-1/Fas, аннексина A5 и количеством циркулирующих мононуклеаров в ранней стадии апоптоза ($r = 0,64$ и $r = 0,72$ соответственно, $p < 0,05$).

Обсуждение результатов

По современным представлениям, гемодинамические нарушения относятся к основным индукторам апоптоза эндотелиоцитов *in vivo* наряду с TNF- α , ангиотензином II, оксидативным стрессом, гомоцистеином. Известно, что в местах турбулентного потока крови увеличивается риск развития атеросклеротического поражения, особенно в области бифуркации артерий. Увеличение напряжения сдвига может привести к ослаблению и даже потере контактов эндотелиальных клеток с базальной мембраной, что является дополнительным фактором в инициации программируемой гибели клеток [8]. Ламинарный поток, являющийся одним из мощных эндогенных антиатеросклеротических факторов, защищает эндотелиальные клетки от апоптоза [9]. Показано, что при ИБС, особенно при ОКС, отмечается усиление апоптоза эндотелия, следствием чего является появление в крови микрочастиц эндотелиального происхождения и увеличение прокоагулянтной активности крови [10, 11]. В результате проведенных исследований установлено, что у больных НС и ОИМ как с сопутствующей ГБ, так и без нее отмечалось достоверное по сравнению с контролем снижение количества жизнеспособных мо-

нонуклеаров и увеличение количества мононуклеаров в ранней стадии апоптоза (аннексин A5-«позитивных»). Также установлено достоверное увеличение количества аннексин A5-«позитивных» мононуклеаров в группах пациентов с ОИМ с сопутствующей ГБ по сравнению с больными ОИМ без ГБ.

Поскольку в составе циркулирующей мононуклеарной фракции находятся эндотелиальные клетки-предшественники и зрелые эндотелиоциты, отделившиеся от базальной мембраны, вполне корректно предположить, что в периферической крови при ОКС, особенно в сочетании с ГБ, увеличивается количество аннексин A5-«позитивных» эндотелиоцитов в результате влияния гемодинамических факторов на сосудистую стенку. Учитывая современное представление о патогенезе ОКС, повышение числа циркулирующих эндотелиоцитов можно рассматривать как маркер эндотелиального повреждения, связанного с разрушением бляшки или её эрозией [12].

Особое место в эндогенных механизмах, блокирующих апоптоз при атеросклерозе, занимает растворимая форма sApo-1/Fas, образующаяся в результате протеолиза мембранной формы или альтернативного сплайсинга мРНК, приводящего к образованию укороченного транскрипта, не содержащего трансмембранного участка [13].

Показана способность sApo-1/Fas ингибировать клеточную гибель, индуцируемую анти-Fas-антителами, возможно, за счёт конкуренции sApo-1/Fas и мембранной формы Fas за связывание с их лигандом [14]. В регуляции и блокаде Fas-связанного апоптоза участвуют белки семейства Bcl-2, расположенные в митохондриях [15].

Известно, что растворимая форма Bcl-2 сохраняет свои антиапоптотические свойства, нейтрализуя белки семейства Bcl, индуцирующие апоптоз [13].

Результаты собственных исследований и имеющиеся в литературе данные свидетельствуют о значительном увеличении плазменной концентрации аннексина A5 при атеротромбозе, особенно при ОИМ в сочетании с ГБ [16–18].

Аннексин A5 обладает способностью связываться с отрицательно заряженными фосфолипидами, предотвращая тем самым риск развития тромбоза, а также является сильным ингибитором фосфолипазы A₂ и

протеинкиназы С, реализуя тем самым своё противовоспалительное действие [7]. Установлено, что, помимо антиапоптотических функций, Bcl-2 также обладает противовоспалительными свойствами, значительно снижая опосредованную TNF- α гиперэкспрессию Е-селектина и почти полностью блокируя экспрессию VCAM-1 на эндотелии [19].

Таким образом, при ОКС, особенно в сочетании с ГБ, отмечается усиление клеточного апоптоза в результате гемодинамических нарушений, что приводит к активации противовоспалительных и антиапоптотических механизмов, направленных на уменьшение выраженности тромбофилии за счёт снижения тромбогенного потенциала эндотелиоцитов, подвергшихся апоптозу.

Литература

1. Маколкин В.И., В.П. Благодар, В.В. Петрий. Антиишемический эффект ангиотензинпревращающего фермента лизиноприла у больных ишемической болезнью сердца, осложненной сердечной недостаточностью. Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2003;1:32–37.
2. S. Dimmeler, C. Hermann, A.M. Zeiher. Apoptosis of endothelial cells. Contribution to the pathophysiology of atherosclerosis? Eur Cytokine Netw 1998;9:697–698.
3. T. Bombeli, A. Karsan, J.M. Harlan. Apoptotic vascular endothelial cells become procoagulant. Blood 1997;89:2429–2442.
4. V.A. Fadok. A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. Nature 2000;405:85–90.
5. P.A. Kiener et al. Differential induction of apoptosis by Fas-Fas ligand interactions in human monocytes and macrophages. J Exp Med 1997;185:1511–1516.
6. A. Strasser et al. Bcl-2 and Fas/APO-1 regulates distinct pathways to lymphocyte apoptosis. Eur Mol Biol Organ J 1995;14:6136–6147.
7. C.P.M. Reutelingsperger, W.L. van Heerde. Annexin V, the regulator of phosphatidylserine-catalyzed inflammation and coagulation during apoptosis. Cell Mol Life Sci 1997;53:527–532.
8. D.J. Granville et al. Apoptosis: Molecular aspects of cell death and disease. Lab Invest 1998;78:893–913.
9. S. Dimmeler et al. Shear stress inhibits apoptosis of human endothelial cells. FEBS Lett 1996;399:71–74.
10. Z. Mallat et al. Shed membrane microparticles with procoagulant potential in human atherosclerotic plaques: a role for apoptosis in plaque thrombogenicity. Circulation 1999;99:348–353.
11. Н.Н. Петрищев и др. Патогенетическое значение изменения относительного содержания аннексин V-связывающих мононуклеаров и CD59⁺-лимфоцитов периферической крови при остром коронарном синдроме. Медико-биологические и социально-психологические проблемы безопасности в чрезвычайных ситуациях 2008;1:74–80.
12. F. Dignat-George et al. Circulating endothelial cell count as a diagnostic marker for non-ST-elevation acute coronary syndromes. Circulation 2004;110:1586–1591.
13. М.А. Пальцев, А.А. Иванов, С.Е. Северин. Межклеточные взаимодействия. М: Медицина; 2003:288 с.
14. J. Albanese, S. Meterissian, M. Kontogiannia. Biologically active Fas antigen and its cognate ligand are expressed on plasma membrane-derived extracellular vesicles. Blood 1998;91(10):3862–74.
15. C. Brenner et al. Bcl-2 and Bax regulate the channel activity of the mitochondrial adenine nucleotide translocator. Oncogene 2000;19:329–336.
16. Петрищев Н.Н., Васина Л.В. Аннексин А5 и дисфункция эндотелия. Учёные записки СПбГМУ имени акад. И.П. Павлова. 2004;XI(3) (Приложение):45–47.
17. Н.Н. Петрищев, Л.В. Васина, А.В. Луговая. Содержание растворимых маркеров апоптоза и циркулирующих аннексин V-связанных апоптотических клеток в крови больных острым коронарным синдромом. Вестник Санкт-Петербургского Университета. 2008;11(Вып.1):14–23.
18. Matsuda R. Clinical significance of measurement of plasma annexin V concentration of patients in the emergency room. Health Science J 1996;57(Issue 2):171.
19. T. Collins et al. A common theme in endothelial cell activation: insights from the structural analysis of the genes for E-selectin and VCAM-1. Trends Card Med 1993;3:92–97.