

# Связь остеоонектина с воспалительными, окислительными и липидными биомаркерами при коронарном атеросклерозе и его осложнениях

Ю. И. Рагино<sup>1</sup>, Е. В. Каштанова<sup>1</sup>, А. М. Чернявский<sup>2</sup>, Я. В. Полонская<sup>1</sup>, М. И. Воевода<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ «Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины» Сибирского отделения РАМН, Новосибирск

<sup>2</sup> ФГБУ «Новосибирский научно-исследовательский институт патологии кровообращения имени академика Е. Н. Мешалкина» МЗ РФ, Новосибирск

## Абстракт

**Цель.** Изучение концентрации в крови остеоонектина при коронарном атеросклерозе и его осложнениях, а также его связи с ключевыми биомаркерами атеросклероза.

**Материалы и методы.** С помощью протеомной технологии PureProteome Protein A and Protein G Magnetic Beads прямым способом биоманнитного сепарирования белков с магнитными микросферами исследованы содержания в крови белка-маркера стромальных стволовых клеток остеоонектина у 42 мужчин с коронарным атеросклерозом (КА) с ишемической болезнью сердца (ИБС) со стабильной стенокардией напряжения II–IV ФК, у 20 мужчин с острым инфарктом миокарда (ОИМ) и у 45 контрольных по возрасту мужчин без ИБС.

**Результаты.** Определены более высокие ( $p < 0,01$ ) концентрации остеоонектина в крови у мужчин с КА и стабильной стенокардией напряжения (выше в 2,7 раза) и у мужчин с ОИМ (выше в 3,0 раза) в сравнении с мужчинами контрольной группы. Выявлены корреляционные связи ( $p < 0,05$ ) концентрации остеоонектина с некоторыми ключевыми биомаркерами атеросклероза (липидными, воспалительными и окислительными) и с наличием КА.

**Заключение.** Полученные результаты свидетельствуют, что остеоонектин как маркер стромальных стволовых клеток с остеогенной потенцией, вероятно, играет важную роль в атерогенезе и может быть одним из новых биомаркеров КА и его осложнений.

**Ключевые слова:** остеоонектин, протеомная технология, коронарный атеросклероз, липидные, воспалительные и окислительные биомаркеры атеросклероза.

## Relationship of blood osteonectin concentration with inflammatory, oxidative and lipid biomarkers in coronary atherosclerosis and its complications

Yu. I. Ragino<sup>1</sup>, E. V. Kashtanova<sup>1</sup>, A. M. Chernjavskiy<sup>2</sup>, Ya. V. Polonskaya<sup>1</sup>, M. I. Voevoda<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Internal and Preventive Medicine SB RAMS, Novosibirsk, Russia

<sup>2</sup> E. N. Meshalkin Institute of Circulatory Diseases, Ministry of Health of the Russian Federation, Novosibirsk, Russia

## Abstract

**Aim.** The studying the blood osteonectin concentration in coronary atherosclerosis and its complications, and its associations with key atherosclerosis biomarkers.

**Materials and methods.** Concentrations of stromal stem cells protein-marker osteonectin were studied with help of proteome technology «PureProteome Protein A and Protein G Magnetic Beads» by direct method of biomagnetic protein separation with magnetic microspheres in 42 men with coronary atherosclerosis (CA) with coronary heart disease (CHD) with stable angina pectoris II–IV FC, in 20 men with acute myocardial infarction (MI) and in 45 age control men without CHD.

**Results.** Concentrations of blood osteonectin were higher in men with CA and stable angina pectoris (up to 2.7-fold,  $p < 0.01$ ) and in men with MI (up to 3.0-fold,  $p < 0.01$ ) in comparison with control group men. Significant correlations ( $p < 0.05$ ) of blood osteonectin with some key biomarkers of atherosclerosis (lipid, inflammatory and oxidative) and with CA were revealed.

**Conclusion.** These results indicate that osteonectin as marker of stromal stem cells with osteogenous potential, probably, plays important role in atherogenesis and is one of the new biomarkers of CA and its complications.

**Keywords:** osteonectin, proteome technology, coronary atherosclerosis, lipid, inflammatory and oxidative biomarkers of atherosclerosis.

## Введение

Патоморфологической основой ишемической болезни сердца (ИБС) является коронарный атеросклероз (КА), в патогенезе которого играют значимую роль такие патологические процессы, как дислиппротеинемия, эндотелиальная дисфункция, воспаление, окислительный стресс и другие [1, 2]. В последние годы активно ведется поиск новых биомаркеров стенозирующего атеросклероза и кальциноза коронарных артерий, являющегося патоморфологической основой и стабильной стенокардии напряжения, и острого коронарного синдрома (в том числе острого инфаркта миокарда – (ОИМ)) в случае нарушения целостности покрышки нестабильной коронарной атеросклеротической бляшки [3–5].

Известны данные об участии в атерогенезе костно-мозговых стволовых клеток стромальной линии дифференцировки, которые имеют 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 периферическом кровотоке остеонектин-положительных клеток может отражать наличие продуктивного этапа воспалительного процесса в сосудистой стенке [6–11].

Целью настоящего исследования было с помощью протеомной технологии биомагнитного сепарирования белков с магнитными микросферами изучить концентрацию в крови остеонектина у мужчин с КА с и без острого коронарного синдрома (ОКС), а также его связи с ключевыми биомаркерами атеросклероза.

## Материалы и методы

В исследование было включено 107 мужчин 40–73 лет (в среднем  $56,0 \pm 4,2$  года). Всеми обследованными заполнялась форма информированного согласия на участие в исследовании.

Первую группу составили 42 пациента с верифицированным КА при проведении селективной коронароангиографии, без ОКС со стабильной

стенокардией напряжения II–IV ФК. Вторую группу составили 20 пациентов с ОИМ. Диагноз ИМ устанавливался по совокупности критериев Европейского общества кардиологов и Американской коллегии кардиологов (2000), включающих: а) типичный болевой приступ, б) изменения ЭКГ в двух и более последовательных отведениях с характерной для ОИМ эволюцией (высокоамплитудный Т, отрицательный Т, подъем сегмента ST, патологический Q, депрессия сегмента ST, наличие QR), в) динамические изменения уровня ферментов (креатинфосфокиназа, креатинкиназы MB-фракция, тропонины Т и I, миоглобин).

Контрольную группу составили 45 мужчин без ИБС, согласно данным клинико-функциональных исследований, включая запись ЭКГ с расшифровкой по Миннесотскому коду. Группы мужчин были сопоставимы по возрасту.

У всех мужчин однократно забирали кровь из локтевой вены утром натощак через 12 часов после приема пищи. Показатели липидного профиля (общий холестерин (ОХС), триглицериды (ТГ), холестерин липопротеинов низкой плотности (ЛНП-ХС) и холестерин липопротеинов высокой плотности (ЛВП-ХС) сыворотки крови измеряли энзиматическими методами на биохимическом анализаторе KoneLab 300i (Финляндия). Показатели активности процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ), такие как исходный уровень продуктов ПОЛ в выделенных из крови ЛНП (по концентрации конечного продукта окисления липидов – малондиальдегида) и резистентность ЛНП к окислению (оцениваемая по уровню продуктов ПОЛ в ЛНП через 30 минут их инкубации *in vitro* с катализаторами окисления ионами меди) определяли флуориметрическими методами [2] на спектрофлуориметре Versafluor (BioRad, США). Методами иммуноферментного анализа с использованием стандартных тест-систем ELISAs (Biomerica, BCM Diagnostics, DSL) определяли в сыворотке крови уровни 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 биомагнитного сепарирования

белков с магнитными микросферами Protein A and Protein G Magnetic Beads и магнитным сепаратором Magna GriPTM Rack.

### Методика определения

Для соединения магнитных микросфер с антителами к специфическим антигенам 50 мкл суспензии с магнитными микросферами переносили в пробирки Eppendorf, помещали их в магнитный сепаратор, через 2 мин. удаляли буфер. Далее магнитные микросферы промывали 500 мкл раствора фосфатного буфера, pH 7,4, содержащего 0,1% «Твин-20», пробирки встряхивали 10 сек., помещали в магнитный сепаратор и через 2 мин. удаляли буфер. После двукратной процедуры промывания магнитных микросфер 100 мкл фосфатного буфера к ним добавляли 25 мкл кроличьих поликлональных антител к остеоонектину человека (Chemicon, США). Далее пробы инкубировали при комнатной температуре 10 мин., непрерывно перемешивая на миниротаторе Bio RS-24 с платформой PRS-22 («Биосан», Латвия). Полученные комплексы промывали 3 раза раствором фосфатного буфера. Затем пробирки удаляли из магнитного сепаратора и добавляли 1 мл сыворотки крови обследуемых. Далее пробы инкубировали при 4 °С, непрерывно перемешивая на миниротаторе Bio RS-24 с платформой PRS-22 в течение 1 часа (для образования комплекса иммуномагниточувствительных микросфер с рецепторами к CD34 или остеоонектину человека). Затем пробирки помещали в магнитный сепаратор, супернатант удаляли, пробы промывали 3 раза раствором фосфатного буфера, удаляли из магнитного сепаратора и добавляли буфер для элюции – 60 мкл 0,2 М глицин (pH 2,5), инкубировали при комнатной температуре 2 мин., пробирки помещали в магнитный сепаратор, переносили супернатанты в новые пробирки, добавляя по 5 мкл 1 М трис (pH 8,5).

Количественную оценку выделенного белка остеоонектина в супернатантах проводили 1) измерением

белка по общепринятому методу Лоури и соавт. (1951) и 2) методом электрофореза в 6%-ном полиакриламидном геле на аппарате SE600 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 кDa), содержащий кроличий миозин 200 кDa, бета-галактозидазу *E. coli* 116 кDa, кроличью фосфорилазу-б 97 кDa, БСА 66 кDa, печеночную глутаминдегидрогеназу 55 кDa, яичный овальбумин 45 кDa, кроличью глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу 36 кDa). Учитывалось, что молекулярный вес остеоонектина – 43 кDa.

Статистическую обработку результатов проводили в лицензионной версии программы SPSS for Windows, используя критерий статистической достоверности –  $p < 0,05$ .

### Результаты исследования

При оценке содержания остеоонектина в сыворотке крови по методу Лоури выявлено, что этот показатель был выше в 2,1 раза у мужчин с КА без ОКС в сравнении с мужчинами с ОИМ и с мужчинами контрольной группы.

Согласно данным оценки содержания остеоонектина в сыворотке крови методом электрофореза обнаружены значимые различия обеих групп мужчин с ИБС с контрольной группой (табл.1). Так, концентрация остеоонектина у мужчин с КА без ОКС была выше в 2,7 раза, а у мужчин с ОИМ – в 3,0 раза в сравнении с мужчинами контрольной группы. Полученные результаты протеомных исследований свидетельствуют о повышенном содержании в крови при КА и его осложнении – ОИМ – маркера стромальных стволовых клеток остеоонектина и не противоречат данным мировой и отечественной литературы, в которых указывается

**Таблица 1.** Содержание белка остеоонектина в сыворотке крови у мужчин с коронарным атеросклерозом и стабильной стенокардией напряжения (n = 42), у мужчин с острым инфарктом миокарда (n = 20) и у мужчин контрольной группы (n = 45).

Методы оценки белка	Группы лиц	Средняя	Ошибка средней	Стандартное отклонение	Минимум-максимум	P
Метод Лоури	КА	6,39*	0,49	1,19	3,15–11,69	0,01
	ОИМ	2,93	0,23	0,82	1,63–4,19	
	Контроль	3,01	0,24	0,61	1,85–5,77	
Метод электрофореза	КА	5,75*	0,49	1,45	2,22–9,35	0,01
	ОИМ	6,31*	0,57	1,98	2,66–21,27	0,01
	Контроль	2,11	0,35	1,36	0,15–3,91	

22 Примечание: \* – в сравнении с контролем; КА – коронарный атеросклероз; ОИМ – острый инфаркт миокарда.

**Таблица 2.** Сравнение биомаркеров липидного обмена, воспаления и окисления между группами мужчин с коронарным атеросклерозом и стабильной стенокардией напряжения, с острым инфарктом миокарда и контрольной группы.

Показатель	КА (n = 42)	ОИМ (n = 20)	Контроль (n = 45)
Общий ХС, мг/дл	223,2 ± 30,6	194,5 ± 34,2	215,1 ± 31,5
ЛВП-ХС, мг/дл	40,1 ± 10,2*	45,9 ± 9,9	56,1 ± 9,6
ТГ, мг/дл	178,4 ± 73,6*	161,8 ± 70,9*	112,3 ± 61,7
ЛНП-ХС, мг/дл	147,2 ± 35,1	134,2 ± 32,7	140,3 ± 33,9
вчСРП, мг/л	5,5 ± 3,1*	9,7 ± 2,6*	1,2 ± 0,6
ФНО-альфа, пг/мл	3,7 ± 1,3*	2,4 ± 1,5*	1,8 ± 0,8
ИЛ-1-бета, пг/мл	1,8 ± 0,7	1,4 ± 0,9	1,6 ± 0,7
ИЛ-6, пг/мл	10,9 ± 2,5*	14,6 ± 4,3*	5,2 ± 1,3
ИЛ-8, пг/мл	33,4 ± 13,8*	12,4 ± 8,9	17,1 ± 5,9
Уровень продуктов ПОЛ в ЛНП, нМ МДА/мг ЛНП	3,5 ± 1,3*	5,1 ± 2,1*	2,0 ± 1,0
Резистентность ЛНП к окислению, нМ МДА/мг ЛНП	26,9 ± 8,8*	31,1 ± 12,4*	18,4 ± 6,5

Примечание: данные представлены как средняя ± стандартное отклонение ( $M \pm \sigma$ ); \* – различие с контрольной группой при  $p < 0,05$ .

ХС – холестерин; ЛВП-ХС – липопротеины высокой плотности; ТГ – триглицериды; ЛНП-ХС – липопротеины низкой плотности; вчСРП – высокочувствительный С-реактивный протеин; ФНО-альфа – фактор некроза опухоли альфа; ИЛ – интерлейкин; ПОЛ – перекисное окисление липидов; МДА – малондиальдегид.

на значительное увеличение количества клеток, экспрессирующих антиген к остеоонектину, при ИБС и предлагается рассматривать повышенное количество остеоонектин-положительных клеток как новый показатель наличия и развития атеросклеротического поражения сосудов человека [6–8].

У всех мужчин, включенных в исследование, были определены уровни в крови ключевых липидных (общий ХС, ЛВП-ХС, ЛНП-ХС, ТГ), воспалительных (вчСРП, ФНО-альфа, ИЛ-1-бета, ИЛ-6, ИЛ-8) и окислительных (уровень продуктов ПОЛ в ЛНП и резистентность ЛНП к окислению) биомаркеров атеросклероза (табл. 2). В сравнении с контрольной группой мужчин уровень ЛВП-ХС был ниже только у мужчин с КА без ОКС (в 1,4 раза), уровень ТГ был выше у мужчин с КА и у мужчин с ОИМ (в 1,6 и 1,4 раза соответственно). Воспалительные биомаркеры в сравнении с контрольной группой были выше в группах мужчин с КА и ОИМ: вчСРП – в 4,6 и 8,1 раза соответственно, ФНО-альфа – в 2,1 и 1,3 раза соответственно, ИЛ-6 – в 2,1 и 2,8 раза соответственно. Уровень в крови ИЛ-8 был выше почти в 2 раза только при КА без ОКС в сравнении с контролем. Показатели окисления частиц ЛНП в сравнении с контролем

были выше в обеих группах мужчин с КА и ОИМ: исходный уровень продуктов ПОЛ в ЛНП – в 1,75 и 2,55 раза соответственно, стимулированный катализаторами окисления уровень продуктов ПОЛ в ЛНП – в 1,5 и 1,7 раза соответственно.

У мужчин, включенных в исследование, все оцениваемые в крови показатели имели непараметрическое распределение, поэтому для проведения корреляционного анализа использовался коэффициент корреляции Спирмена. Были выявлены следующие значимые ( $p < 0,05$ ) корреляционные связи между содержанием в крови остеоонектина и уровнями в крови таких биомаркеров атеросклероза, как ЛВП-ХС ( $r = -0,497$ ), ТГ ( $r = 0,424$ ), вчСРП ( $r = 0,247$ ), ФНО-альфа ( $r = 0,355$ ), ИЛ-6 ( $r = 0,299$ ), исходный уровень продуктов ПОЛ в ЛНП ( $r = 0,445$ ), резистентность ЛНП к окислению ( $r = -0,391$ ). Значимая ( $p < 0,01$ ) корреляция была также отмечена между содержанием в крови остеоонектина и наличием КА –  $r = 0,317$ .

Таким образом, на основании проведенного исследования можно заключить, что остеоонектин как маркер стромальных стволовых клеток с остеогенной потенциальностью, вероятно, играет важную роль в атерогенезе и может быть одним из новых био-

маркеров КА и его осложнения – ОИМ. Об этом свидетельствуют, во-первых, его повышенные концентрации в крови при КА с и без ОКС и, во-вторых, его корреляционные связи с некоторыми ключевыми липидными, воспалительными и окислительными биомаркерами атеросклероза.

### Конфликт интересов

Конфликт интересов отсутствует.

### Список литературы

1. *Diagnosis and correction of lipid disorders for the prevention and treatment of atherosclerosis. Russian recommendations. V revision. Moscow. Russ Card Journal. 2012;4(96), Suppl 1:32. Russian (Диагностика и коррекция нарушений липидного обмена с целью профилактики и лечения атеросклероза. Российские рекомендации. V пересмотр. Москва, ВНОК. Росс Кард журнал. 2012;4(96), Приложение 1:32 с).*
2. *Tabet F, Rye KA. High-density lipoproteins, inflammation and oxidative stress. Clin Sci. 2009;116(2):87-98.*
3. *Ragino YuI, Cherniavskiy AM, Eremenko NV, et al. Key laboratory diagnostic biomarkers of coronary atherosclerosis. Kardiologiya. 2011;51(3):42-47. Russian (Рагино ЮИ, Чернявский АМ, Еременко НВ, с соавт. Ключевые лабораторно-диагностические биомаркеры коронарного атеросклероза. Кардиология. 2011;51(3):42-7).*
4. *Empena JP, Canoui-Poitrine F, Luc G, et al. Contribution of novel biomarkers to incident stable angina and acute coronary syndrome: the PRIME Study. Eur Heart J. 2008;29(16):1966-74.*
5. *Messika-Zeitoun D, Bielak LF, Peyser PA, et al. Aortic valve calcification: determinants and progression in the population. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2007;27:642-8.*
6. *Gabbasov ZA, Agapov AA, Saburova OS, et al. Circulating stromal osteonectin-positive progenitor cells and stenotic coronary atherosclerosis. Can J Physiol Pharmacol. 2007;85(3-4):295-300.*
7. *Gadeau AP, 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.*
8. *Gossl M, Modder UI, Atkinson EJ, et al. Osteocalcin expression by circulating endothelial progenitor cells in patients with coronary atherosclerosis. J Am Coll Cardiol. 2008;52(16):1314-25.*
9. *Ragino YuI, Chernyavskiy AM, Tsimbal SYu, et al. Relationship of Blood Levels of Inflammatory and Destructive Biomarkers in Coronary Atherosclerosis with Long-Term Results of Surgical Revascularization. Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2013;155(3):314-7.*
10. *Ragino YuI, Kashtanova EV, Chernjavski AM, et al. Blood level of osteonectin in stenosing atherosclerosis and calcinosis of coronary arteries. Bulletin of Experimental Biology and Medicine, 2011;(151)3:370-3.*
11. *Trion A, van der Laarse A. Vascular smooth muscle cells and calcification in atherosclerosis. Am Heart J. 2004;147(5):808-14.*