

М.С. Черканова, Т.А. Короленко, Т.Г. Филатова, И.Ю. Бравве

ЭНДОГЕННЫЙ ИНГИБИТОР ЦИСТЕИНОВЫХ ПРОТЕАЗ ЦИСТАТИН С КАК ПРЕДИКТОР РАЗВИТИЯ АТЕРОСКЛЕРОЗА И ИЗМЕНЕНИЯ ПРИ ОПЕРАЦИИ КОРОНАРНОГО ШУНТИРОВАНИЯ

ГУ НИИ физиологии СО РАМН, Новосибирск

ОГУЗ Новосибирский областной кардиологический диспансер, Новосибирск

Цистатин С — широко распространенный в различных типах клеток (макрофагах и др.) цитоплазматический белок, эндогенный ингибитор цистеиновых протеаз, относящийся вместе с цистатинами S, SA, SN ко второму типу семейства цистатинов. В настоящее время изучается роль ингибитора как возможного предиктора атеросклероза — воспалительного процесса, сопровождаемого в месте формирования бляшки активацией макрофагов с секрецией цистатина С внеклеточно. Исследованы изменения концентрации цистатина С и С-реактивного белка в сыворотке крови пациентов 50-65 лет без клинических проявлений ишемической болезни сердца и больных после операции коронарного шунтирования. По сравнению с показателями у практически здоровых людей среднего возраста (20-40 лет) обнаружено повышение концентрации цистатина С и С-реактивного белка у пациентов 50-65 лет без клинических проявлений ишемической болезни сердца (ИБС). В раннем послеоперационном периоде после операции коронарного шунтирования не обнаружили достоверных изменений концентрации цистатина С. Уровень СРБ у тех же больных увеличивался в 10 и более раз на вторые сутки после вмешательства, после чего происходило снижение концентрации СРБ, не достигавшее исходных цифр к концу третьих суток. Обсуждается значение изменений цистатина С и СРБ в сыворотке крови как возможных предикторов атеросклероза.

Ключевые слова: цистатин С, атеросклероз, С-реактивный белок.

Исследование роли протеаз и их эндогенных ингибиторов является приоритетным направлением клеточной и молекулярной патологии и медицины. Цистатин С — достаточно широко распространенный в различных типах ядерных клеток белок, эндогенный ингибитор цистеиновых протеаз, относящийся вместе с цистатинами D, S, SA, SN ко второму типу семейства цистатинов [1, 2, 3]. Молекулярная масса белка составляет 13,343 – 13,359 Da, он кодируется CST3 геном, мутации которого связаны с развитием у человека ряда врожденных заболеваний [2, 4]. Функции цистатина С связывают с участием в деградации белков внеклеточного матрикса, процессом старения клеток, клеточной дифференцировкой, процессингом и презентацией антигена и др. (Рисунок). Изменения цистатина С при старении исследованы недостаточно, почти не известна роль новых, мало изученных цистатинов (цистатина Е/М, цистатина F) при старении. Изучается роль цистатина С в развитии воспалительных процессов, сопровождающихся секрецией протеиназ и их ин-

гибиторов [5]. До настоящего времени недостаточно изучена роль цистатина С и других цистатинов при атеросклерозе как воспалительном процессе, сопровождающемся активацией макрофагов.

Известно, что С-реактивный белок (СРБ) является высокочувствительным неспецифическим маркером воспалительного процесса, синтез которого увеличивается под воздействием интерлейкинов -1, -6 и ФНО- α [5]. Показано, что уже в концентрации более 5 мг/мл СРБ обладает выраженным противовоспалительным воздействием на эндотелий коронарных сосудов человека, стимулируя экспрессию молекул адгезии, например ICAM-1, VCAM-1, Е-селектина [5]. Умеренное повышение концентрации СРБ в сыворотке крови лиц без признаков сердечно-сосудистых заболеваний и у пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС) связано с более высоким риском развития инфаркта миокарда [6, 7, 8, 9]. Повышение концентрации СРБ (в пределах, сравнимых с нормальными величинами), выявляемое при опре-

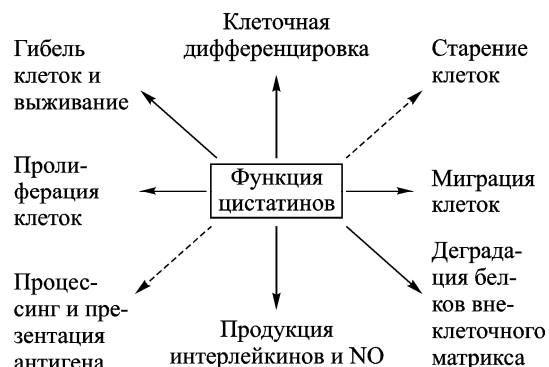


Рис. Функции цистатинов эндогенных ингибиторов цистеиновых протеаз [2, 15].

делении «высокочувствительного СРБ» (СРБ-*hs*), представляет интерес при прогнозировании дальнейшего развития заболевания, его возможного исхода [7, 8]. По мнению ряда исследователей границы нормальных значений данного показателя, как и значение его изменений при атеросклерозе, нуждаются в уточнении [10, 11].

Патогенез атеросклероза и возникновение аневризмы абдоминальной аорты связывают с повышенной деградацией внеклеточного матрикса и ремоделированием сосудистой стенки [2, 14]. При атеросклеротическом поражении сосудов человека обнаружена повышенная экспрессия эластолитических протеаз — катепсинов S и K в местах повреждения эластина артерий, с нарушением регуляции активности цистеиновых протеаз и возможным повышенным расходом цистатинов.

Методика

Использовали сыворотку крови практически здоровых доноров 20-40 лет, пациентов в возрасте 50-65 лет без клинических проявлений ИБС и у поступивших в клинику ОГУЗ НОККД для проведения коронарного шунтирования (КШ).

Сыворотку крови получали путем центрифугирования образцов (1500 об/мин, 10-15 мин) и хранили при температуре -20°C .

Концентрацию цистатина С в сыворотке крови определяли методом иммуноферментного анализа с использованием коммерческих наборов реактивов Biovendor (Чехия) для количественного определения цистатина С человека. Экстинцию образцов оценивали с помощью планшетного ридера (MULTISKAN EX Termo Electron Corp., Финляндия). Результаты выражали как концентрацию цистатина С в расчете на мл биологического образца (нг/мл). Концентрацию СРБ в сыворотке крови оценивали, ис-

пользуя коммерческие наборы BioSystems (Испания) для определения СРБ и СРБ — *hs* человека (иммунотурбидиметрия, высокочувствительный латекс). Экстинцию измеряли с помощью полуавтоматического биохимического фотометра с проточной термостатируемой кюветой Screen Master (Hospitex Diagnostics, Швейцария) при 540 нм. Концентрацию СРБ выражали в мг/мл биологического образца. Концентрацию креатинина определяли с помощью коммерческих наборов фирмы Вектор-Бест (Кольцово, НСО, Россия) при 540 нм, кинетическим методом с использованием полуавтоматического фотометра Screen Master.

Данные обрабатывали статистическим методом параллельных рядов вариационной статистики с использованием t-критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты исследования

Концентрация цистатина С в сыворотке крови практически здоровых лиц в возрасте 20-45 лет соответствовала литературным данным (740,0-1555,0 нг/мл) и составляла в среднем 846,0 нг/мл (Табл. 1). В сыворотке крови пациентов 50-65 лет отмечено достоверное повышение концентрации этого ингибитора по сравнению с группой обследуемых среднего возраста (Табл. 1). В группе пациентов с ИБС, поступивших в стационар для оперативного лечения, достоверные различия в концентрации цистатина С в сыворотке крови до КШ обнаружены только при сравнении результатов с группой обследованных среднего возраста. Непосредственно после перевода из операционной в отделение реанимации наблюдали снижение концентрации ингибитора до значений, практически сравнимых с нормальными, на 2 сут. концентрация цистатина С повышалась, достигая предоперационных значений. Для исключения влияния на результаты определения концентрации цистатина С нарушений клубочковой фильтрации у всех пациентов проводили исследование концентрации креатинина в сыворотке крови и в моче. У всех обследованных пациентов концентрация креатинина в сыворотке крови колебалась в интервале от 0,068 до 0,102 ммоль/л и не отличалась от контрольных показателей креатинина сыворотки крови у практически здоровых лиц (до 0,120 ммоль/л).

Нами показано, что концентрация СРБ в сыворотке крови пациентов 50-65 лет без клинических проявлений ИБС и у пациентов, поступивших для выполнения шунтирования, досто-

Таблица 1
Концентрация цистатина С в сыворотке крови обследованных

Группы, число обследованных	Концентрация цистатина С, нг/мл
Практически здоровые, 20-45 лет N=26	846,0±124,1
Пациенты 50-65 лет, N=15	1704,5±235,0 P < 0,05
Пациенты 50-65 лет, коронарное шунтирование (КШ): До КШ N=17	1824,7±256,9 P < 0,05
Непосредственно после КШ N=16	933,5±199,3
2 сут после КШ N=17	1572,2±278,4 P < 0,05
3 сут после КШ N=17	1605,0±222,9 P < 0,05

Примечание: сравнение с группой практически здоровых лиц 20-45 лет.

Таблица 2
Концентрация С-реактивного белка в сыворотке крови обследованных лиц

Группы, число обследованных	Концентрация С-реактивного белка, мг/мл
Практически здоровые, 20-45 лет, N=26	3,24±0,70
Пациенты 50-65 лет N=15	6,20±1,77 P < 0,05
Пациенты 50-65 лет коронарное шунтирование (КШ): До КШ, N=17	7,35±1,80 P < 0,05
Непосредственно после КШ N=16	226,5±54,2 P < 0,05
2 сут после КШ N=17	92,8±19,9 P < 0,05
3 сут после КШ N=17	32,0±7,3 P < 0,05

Примечание: сравнения с группой практически здоровых лиц 20-45 лет.

верно выше, чем у лиц среднего возраста (Табл. 2). В раннем послеоперационном периоде концентрация СРБ возрастала в десятки раз и достигала максимальных значений на вторые сутки после операции. В дальнейшем, спустя 3 сут. после КШ, уровень СРБ существенно снижался, не достигая, однако, исходных значений (Табл. 2). Таким образом, обнаружено повышение концентрации цистатина С в сыворотке крови пациентов 50-65 лет, несколько бо-

лее выраженное у больных с клиническими проявлениями ИБС. Подобное умеренное повышение концентрации цистатина С в сыворотке крови у лиц пожилого возраста рассматривается отдельными авторами в качестве фактора риска развития сердечно-сосудистых заболеваний. В раннем послеоперационном периоде мы наблюдали незначительные изменения концентрации ингибитора (умеренное снижение непосредственно после окончания вмешательства с последующим повышением практически до исходных цифр) (Табл. 1).

Концентрация СРБ в сыворотке крови у представленной выше группы также достоверно выше, чем у лиц среднего возраста, причем различия между пациентами в группе с клиническими проявлениями ИБС и без проявлений ИБС были не столь значительными, как различия при сравнении показателей пациентов и практически здоровых лиц. Возможно, это связано с развитием атеросклеротических изменений сосудов.

После оперативного вмешательства отмечен рост концентрации СРБ. Максимальные значения СРБ наблюдали на вторые сут. после КШ, далее концентрация СРБ снижалась, не достигая, однако, в течение последующих 3 сут. исходных значений (Табл. 2).

Учитывая, что макрофаги человека при стимуляции секретируют цистатин С *внеклеточно*, представляется перспективным исследование изменений концентраций СРБ и цистатина С локально, в зоне расположения атеросклеротической бляшки.

Хотя цистатин С обнаружен во всех ядерных клетках тканей человека и млекопитающих, ингибитор локализован преимущественно *внеклеточно* [2]. У человека наиболее высокая его концентрация отмечена в ликворе, молоке, семенной жидкости, сыворотке крови и существенно более низкая — в моче [1, 2, 3, 12, 13]. В последнее время определение концентрации цистатина С в сыворотке крови рассматривают как более чувствительный, по сравнению с креатинином, показатель для выявления ранних нарушений клубочковой фильтрации при различных заболеваниях почек (значительная часть этого низкомолекулярного белка выводится из циркуляции именно посредством гломерулярной фильтрации) [12].

В литературе исследовали роль изменений цистатина С при атеросклерозе у человека и на моделях атеросклероза у экспериментальных животных. Катепсины В, L, S, обладая выра-

женной эласто- и коллагенолитической активностью, экспрессируются как в пораженных атеросклерозом сосудах человека, так и у экспериментальных животных [14]. Полагают, что атеросклеротические бляшки характеризуются увеличением активности цистеиновых протеаз и снижением концентрации их основного ингибитора — цистатина С. Возможно, что такое локальное нарушение баланса протеазы/ингибиторы протеаз приводит в последующем к активации металлопротеаз-1, 2, 7, 9 типов и деградации внеклеточного матрикса сосудистой стенки. Согласно экспериментальным данным, атеросклероз рассматривают как следствие снижения экспрессии цистатина С, кроме того, дефицит лизосомальной цистеиновой протеазы — катепсина S — способствует предупреждению развития атеросклероза у мышей [14]. Обнаружены реципрокные взаимоотношения в ткани артерий мышей с экспериментальным атеросклерозом между уровнем цистеиновых протеаз и цистатином С [2]. Обнаружено значительное снижение концентрации цистатина С как в ткани пораженных атеросклерозом артерий человека при аневризме, так и снижение концентрации цистатина С в сыворотке крови пациентов с абдоминальной дилатацией аорты [7]. Возможно, что регуляторные функции цистатина С проявляются не только локально, в месте формирования атеросклеротической бляшки, но и системно (следовательно, изменения его концентрации в сыворотке крови отражают повреждение сосудов при атеросклерозе). Очевидно, что повышенная экспрессия, увеличенная концентрация цистатина С и изменения соотношения цистеиновые протеазы/цистатин С являются одним из ключевых моментов в регуляции ремоделирования стенки артерий при атеросклерозе [7].

Синтезирующийся в печени СРБ — один из наиболее чувствительных белков острой фазы при поражении тканей и воспалении [10, 11]. Этот белок запускает активацию комплемента по классическому пути в ответ на воспалительную реакцию. Повышение концентрации СРБ в сыворотке крови человека до 2000 раз можно ожидать в первые 24-48 ч после инфаркта миокарда, травмы, инфекционных поражениях тканей, стрессорной реакции, неопластической пролиферации, других поражениях тканей, рассматривающихся как неспецифические.

В настоящей работе нами обнаружено умеренное повышение концентраций СРБ и цистатина С в сыворотке крови лиц 50-65 лет по

сравнению с практически здоровыми лицами 20-40 лет (Табл. 2), что подтверждает данные, полученные в последние годы [9, 10].

После выполнения КШ в раннем послеоперационном периоде не наблюдали значительных изменений концентрации цистатина С в сыворотке крови; концентрация же СРБ изменялась значительно. Представляется интересным изучение изменений концентрации цистатина С и СРБ в сыворотке крови тех же групп больных в более поздние сроки после вмешательства и проб сыворотки крови, отобранных локально в зоне атеросклеротической бляшки.

Определение концентрации цистатина С в сочетании с оценкой уровня СРБ является новым современным подходом, позволяющим уточнить особенности протекающего у пациента патологического процесса, прогнозировать возможные риски развития кардиоваскулярных событий.

CYSTATIN C — ENDOGENOUS INHIBITOR OF CYSTEINE PROTEASES AS A PREDICTOR OF ATHEROSCLEROSIS AND CHANGES AFTER OPERATION OF AORTIC SHUNTING

M.S. Cherkanova, T.A. Korolenko, T.G. Filatova, I.Yu. Bravve

Cystatin C is widespread endogenous inhibitor of cysteine proteases found in the most types of cells (macrophages etc.). Cystatin C concentration in serum of healthy persons and patients with atherosclerosis was assayed by ELISA method, using BioVendor kits for human (Czechia). C-reactive protein concentration was measured with help of BioSystems kits (Spain) for hs-CRP. It was shown that mild elevation of cystatin C was noted in aged persons without atherosclerosis development. After operation of aortic shunting there was rapid increase of hs-CRP concentration without significant changes of cystatin C. The role of cystatin C and hs-CRP as possible predictors of cardio-vascular events is discussed.

Литература

1. Chitotriosidase as a new marker of macrophage stimulation in a tumor model treated with cyclophosphamide / T.A. Korolenko, S.J. Djanayeva, O.V. Falameeva, et al. // Drugs Exptl. Clin. Res. — 2000. — Vol. 27. — P. 279-283.
2. Cystatin C deficiency in human atherosclerosis and aortic aneurysms / G.-P. Shi, G. Sukhova, A. Grubb, et al. // J. Clin. Invest. — 1999. — Vol. 104. — № 9. — P. — 1191-1197.
3. Serum chitotriosidase activity is increased in subjects with atherosclerosis disease M. Artieda, A. Cenarro, A. Ganant, et al. // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. — 2003. — Vol. 23. — P. 1645-1652.

4. Pinon P., Kaski J.C. Inflammation, atherosclerosis and cardiovascular disease risk: PAPP-A, Lp-PLA2 and cystatin C. New insights or redundant information? / P. Pinon, J.C. Kaski // *Rev. Esp. Cardiol.* – 2006. – Vol. 59. – № 3. – P. 247-258.
5. Dallegrì F., Ottonello L. Pharmacological implications in the switch from acute to chronic inflammation / F. Dallegrì, L. Ottonello // *Inflammopharmacology.* – 2002. – Vol. 10. – № 3. – P. 159-171.
6. Evaluation of a high-sensitive turbidimetric immunoassay for serum C-reactive protein: application to the study of longitudinal changes throughout normal pregnancy / N. Bertran, J. Camps, J. Fernandez-Ballart, et al. // *Clin. Chem. Lab. Med.* – 2005. – Vol. 43. – № 3. – P. 308-313.
7. High sensitivity C-reactive protein: an emerging role in cardiovascular risk assessment / L.R. Benzaquen, H. Yu, N. Rifai // *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences.* – 2002. – Vol. 39. – № 4-5. – P. 459-497.
8. Serum C-reactive protein in elderly men and women: association with mortality, morbidity and various biochemical values / P.E. Evrin, S.E. Nilsson, T. Oberg, B. Malmberg // *Scand. J. Lab. Invest.* – 2005. – Vol. 65. – P. 25-31.
9. Evaluation of rapid bedside test for the quantitative determination of C-reactive protein / S. Esposito, E. Tremolati, E. Begliatti, et al. // *Clin. Chem. Lab. Med.* – 2005. – Vol. 43. – P. 438-440.
10. High-sensitive C-reactive protein: biological variations and reference limits / O. Chenilliot, J. Henny, J. Steinmets, et al. // *Clin. Chem. Lab. Med.* – 2000. – Vol. 38. – P. 1003-1011.
11. High-sensitivity C-reactive protein: a novel and promising marker of coronary heart disease / N. Rifai, R.P. Tracy, P. Ridker // *Clin. Chem.* – 2001. – Vol. 47. – P. 403-411.
12. Genotype and plasma concentration of cystatin C in patients with coronary heart disease and risk for secondary cardiovascular events / M. Loew, M.M. Hoffmann, W. Koenig, et al. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2005. – Vol. 25. – № 7. – P. 1470-1474.
13. Cystatin C, a novel measure of renal function, is an independent predictor of cardiac events in patients with heart failure / T. Arimoto, Y. Takeishi, T. Niizeki, et al. // *J. Card. Fail.* – 2005. – Vol. 11. – P. 595-601.
14. Cystatin C deficiency increased elastic lamina degradation and aortic dilatation in apolipoprotein E-null mice / G.K. Sukhova, B. Wang, P. Libby, et al. // *Circulation Research.* – 2005. – Vol. 96. – P. 368-375.