

На правах рукописи

ПОЛОНСКАЯ ЯНА ВЛАДИМИРОВНА

**ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ
НЕСТАБИЛЬНОЙ АТЕРОСКЛЕРОТИЧЕСКОЙ БЛЯШКИ**

14.03.03 - патологическая физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

доктора биологических наук

МОСКВА - 2018

Работа выполнена в Научно-исследовательском институте терапии и профилактической медицины - филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук»

Научный консультант:

Рагино Юлия Игоревна - доктор медицинских наук, член-корреспондент РАН, заместитель руководителя по научной работе Научно-исследовательского института терапии и профилактической медицины - филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук»

Официальные оппоненты:

Метельская Виктория Алексеевна - доктор биологических наук, профессор, руководитель отдела изучения биомаркеров риска хронических неинфекционных заболеваний Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр профилактической медицины»

Сергиенко Игорь Владимирович - доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник отдела проблем атеросклероза Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, директор Национального общества по изучению атеросклероза

Сумин Алексей Николаевич - доктор медицинских наук, заведующий отделом мультифокального атеросклероза Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний»

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится « ____ » _____ 2018 года в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 001.003.01 при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» по адресу 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» адрес сайта (<http://www.niiopp.ru>) Автореферат разослан « ____ » _____ 2018 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета Д 001.003.01
кандидат медицинских наук

Скуратовская Лариса Николаевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. По данным Всемирной организации здравоохранения сердечно-сосудистые заболевания атеросклеротического генеза являются одной из ведущих причин смертности среди населения развитых стран мира. Особое внимание уделяется такому заболеванию как инфаркт миокарда, смертность от которого высока в России [Чазова И. Е., 2015; Бокерия Л. А., 2015; Капутин М. Ю., 2015]. Причиной этой патологии является тромбообразование на поверхности нестабильной атеросклеротической бляшки, которое приводит к окклюзии, ишемии и, впоследствии, к некрозу артерии [Shah P. K., 2005; Naghavi M., 2003; Waksman R., Seruys P. W., 2004]. Переход атеросклеротического очага через ряд стадий до нестабильной бляшки является неблагоприятным.

В настоящее время фундаментальные патогенетические исследования воспалительно-деструктивных, окислительных, эндотелиально-дисфункциональных, хемоаттрактантных биомолекул, а также процессов кальцификации по стадиям формирования атеросклеротического очага до нестабильных бляшек разных типов весьма немногочисленны, что делает актуальными работы в этой области. Для понимания патогенетических аспектов атеросклеротического поражения сосудистой стенки, ведущего к формированию нестабильной атеросклеротической бляшки, необходимо рассматривать не только локальные, но и системные процессы. Поэтому крайне актуальными являются исследования, проводимые параллельно и в сосудистой стенке и в крови. До настоящего времени не проводилось исследований патогенетически значимых биохимических маркеров одновременно как в сосудистой стенке, так и в крови у пациентов с коронарным атеросклерозом.

Таким образом, расшифровка механизмов, определяющих формирование нестабильной атеросклеротической бляшки или переход стабильной бляшки в нестабильное состояние, имеет существенное значение для новых подходов к лечению атеросклероза, к формированию научной платформы для разработки новых методов воздействия на молекулярном и клеточном уровне на процесс формирования атеромы.

Степень разработанности темы. В настоящее время взгляды на то, какие механизмы в формировании нестабильной атеромы являются ключевыми, неоднозначны. Важную роль в развитии нестабильной бляшки играет воспалительно-деструктивный процесс. Для нестабильных атером характерна

значительная инфильтрация моноцит/макрофагами (МФ) и Т-лимфоцитами (Т-ЛФ), которые секретируют цитокины, такие как интерлейкин-6 (ИЛ-6), ИЛ-1-β, фактор некроза опухоли альфа (ФНО-α), ИЛ-8, ИЛ-1 и другие [Libby P., 2010; Moreno P. R., 2010; Sakakura K., 2013]. Активированные МФ секретируют хемоаттрактанты, такие как молекулы адгезии эндотелиоцитов (sVCAM-1), эндотелиально-моноцитарный активирующий полипептид (EMAP-II), молекулы межклеточной адгезии (sICAM-1), моноцитарный хемотаксический протеин (MCP-1) [Шишкина В. С., 2014; Braunersreuther V., 2007; Wang X. et al, 2010].

Макрофаги, помимо хемоаттрактантов и провоспалительных цитокинов, продуцируют матриксные металлопротеиназы (ММП), действие которых приводит к деградации внеклеточного матрикса. Тканевой ингибитор металлопротеиназ-1 (ТИМП-1), взаимодействуя с активным каталитическим центром ММП, образует нековалентные комплексы и блокирует активность металлопротеиназ, что снижает риск перехода бляшки в нестабильное состояние [Пигаревский П. В., 2015; Armstrong E. J., 2006; White A. J., 2007; Ambrose J. A., Srikanth S., 2010].

Патогенетическое значение окислительного стресса, окисленных липидов и белков в процессе дестабилизации атеросклеротического очага изучены меньше. Показано, что МФ, Т-ЛФ и гладкомышечные клетки (ГМК) продуцируют активные кислородные метаболиты (АКМ), вызывающие, наряду с ММП, некроз/апоптоз ГМК, приводящий к истончению фиброзной покрышки и ее изъязвлению [Меньщикова Е. ., Зенков Н.К., 2008; Vorekci A., 2014; Stocker R., Kearney J. F., 2004].

В последнее время кальцификация коронарных артерий рассматривается как маркер риска атеросклероза и его осложнений. Однако до сих пор дискутируется, маркером чего является коронарный кальций – стабильности атеросклеротической бляшки или, наоборот, склонности ее к разрыву и развитию атеротромбоза [Alexopoulos N., 2009; Genereux P., 2014]. Механизмы формирования сосудистой кальцификации, её взаимосвязь с другими биохимическими процессами и уровень влияния на дестабилизацию атеросклеротических очагов изучены недостаточно. В ряде публикаций показано, что атеросклеротическая кальцификация тесно связана с процессами воспаления. Имеются данные о том, что кальциноз сосудов может инициировать воспаление и дальнейшую прогрессию кальцификации [Budoff M. J., 2001; Ulusoy F. R. et al., 2015], что требует дальнейшего изучения.

В последние годы появились исследования, посвящённые изучению роли ряда химических элементов в атерогенезе. Железо, цинк, свинец, бром, стронций, кальций оказывают существенное влияние на эндотелиальную дисфункцию при сердечно-сосудистых заболеваниях [Журавская Э. Я. и др., 2014]. Несмотря на проводимые исследования, остаются неясными некоторые вопросы, касающиеся механизмов формирования нестабильного атеросклеротического очага; особенностей взаимосвязи патогенетических факторов, индуцирующих дестабилизацию, что осложняет создание эффективных терапевтических и профилактических подходов, направленных на стабилизацию атеросклеротических процессов.

Цель исследования. Изучить закономерности, характеризующие активность воспалительных, окислительных, эндотелиально-дисфункциональных и деструктивных процессов, а также процессов кальцификации на разных стадиях развития атеросклеротических очагов коронарных артерий и выявить наиболее значимые при формировании нестабильной атеросклеротической бляшки.

Задачи исследования

1. Изучить активность воспалительных, окислительных, эндотелиально-дисфункциональных и деструктивных процессов, а также процессов кальцификации на разных этапах формирования атероматозных очагов коронарных сосудов (неизменная ткань интимы; липидное пятно; стабильная бляшка; нестабильная бляшка).
2. Провести сравнительный анализ параметров выраженности воспалительных, окислительных, эндотелиально-дисфункциональных и деструктивных процессов в разных типах (липидный, воспалительно-эрозивный, дистрофически-некротический) нестабильных атеросклеротических бляшек.
3. Оценить активность воспалительных, окислительных, эндотелиально-дисфункциональных и деструктивных процессов в атеросклеротических очагах с разной степенью кальцификации.
4. Изучить взаимосвязи воспалительного-деструктивного процесса с показателями кальциевого и липидного обмена в атеросклеротических очагах.
5. Исследовать связи показателей активности воспалительных, окислительных, эндотелиально-дисфункциональных и деструктивных процессов в нестабильных атеросклеротических бляшках коронарных артерий с такими же показателями в крови и определить значимые ключевые биомаркеры нестабильности атеросклеротических бляшек.

Научная новизна. Получены новые данные об изменении воспалительно-деструктивных, окислительных, эндотелиально-дисфункциональных процессов и процессов кальцификации, характерных для разных стадий эволюции атеросклеротического очага.

Впервые выявлены особенности изменений и патогенетически значимые факторы воспалительной, эндотелиально-дисфункциональной, окислительной и деструктивной активности, которые характерно отличают нестабильные атеросклеротические бляшки от стабильных.

Впервые был проанализирован элементный состав нестабильной бляшки. Выявлено повышение уровня кальция и стронция, и снижение содержания железа по сравнению со стабильной бляшкой. Так как кальций стимулирует деление фибробластов и секрецию ММП-9, повышение его уровня способствует деструкции покрышки и переходу бляшки в нестабильное состояние.

Показано, что уровень антиоксидантов в нестабильных бляшках значительно выше, что указывает на высокую потребность в антиоксидантной защите для нейтрализации повышенных окислительных процессов, характерных для данной стадии.

Дана характеристика биохимических особенностей разных типов нестабильных бляшек. В уязвимых атеросклеротических очагах воспалительно-эрозивного и липидного типа, в сравнении с дистрофически-некротическим типом, выявлено повышенное содержание хемоаттрактантов, воспалительных цитокинов и металлопротеиназ. Отличительной особенностью бляшек дистрофически-некротического типа является повышенная деструктивная активность и высокая кальцификация. Для нестабильных атеросклеротических очагов воспалительно-эрозивного типа характерно повышение окислительных изменений белковых и липидных структур. Для нестабильных бляшек с некрозом/кальцинозом – преимущественно выраженные процессы перекисного окисления липидов, для нестабильных бляшек липидного типа - окислительной модификации белков. Также в бляшках липидного типа выявлены повышенный уровень холестерина и сниженное содержание жирорастворимых антиоксидантов.

Установлено, что начальный этап формирования кальцификации атеросклеротических очагов характеризуется усилением воспалительного процесса. Также для начального этапа характерно повышение уровней ММП-3 и ММП-9. Отмечено значительное повышение содержания остеокальцина в атеросклеротических очагах с кальцификатами по сравнению с бляшками без

кальцификации (в 2,6 раза). В стабильных атеросклеротических бляшках выявлено более высокое содержание остеопротегерина.

Впервые был исследован ряд показателей, характеризующих атеросклеротический процесс одновременно не только в крови, но и в сосудистой стенке. Показано, что в крови и в сосудистой стенке из всего изученного спектра эндотелиально-дисфункциональных, воспалительных, окислительных и деструктивных биомаркеров существуют достоверные связи между такими показателями, как: СРБ, ИЛ-6, ИЛ-8, МСР-1, кальцитонин, ТИМП-1, кальций и продукты перекисного окисления липидов (ПОЛ). Это говорит о системном характере воспалительных процессов, ведущих к развитию атеросклеротического очага, в то время как локальные процессы носят воспалительно-деструктивный характер. У мужчин с атеросклерозом с нестабильными атеросклеротическими бляшками в коронарных артериях в крови были выше уровни ИЛ-8, СРБ, МСР-1, ИЛ-6, кальция, кальцитонина и липопротеина (а) (ЛП(а)), а содержание ТИМП-1, sVCAM-1, метаболитов NO, и резистентность ЛНП к окислению были ниже по сравнению с показателями этих биомаркеров у мужчин, в коронарных артериях которых были выявлены только стабильные бляшки.

Теоретическая и практическая значимость работы. Теоретическое значение работы состоит в том, что в ходе исследования получены новые данные о патогенезе коронарного атеросклероза. В результате анализа разных этапов формирования атеросклеротических бляшек в коронарных артериях мужчин с неосложненным коронарным атеросклерозом были выявлены значимые биомаркеры активности воспалительного процесса, включая деструктивные, эндотелиально-дисфункциональные, окислительные и антиоксидантные параметры, которые характерны для каждой стадии.

На начальной стадии формирования атеросклеротического очага характерно повышение уровней ФНО- α , СРБ, ЕМАР-II и окисленных белков, отмечена тенденция к снижению уровня ТИМП-1 и повышению ММП-1 и ММП-7. Для стабильных бляшек характерны усиленные процессы окисления белков и повышенные уровни параоксоназы, ФНО- α , СРБ, ИЛ-6, ИЛ-8, остеопротегерина, ММП-3. Содержание ТИМП-1 продолжает уменьшаться. В качестве стабилизирующих атеросклеротическую бляшку факторов могут выступать:

1) остеопротегерин, оказывающий защитное действие на артерии, предупреждая патологическую кальцификацию и ингибируя умеренные воспалительные

процессы; 2) параоксоназа, сдерживающая процессы окисления липидов; 3) высокий уровень ионов железа, способствующий синтезу коллагеновых волокон.

Для нестабильных очагов характерными и доминирующими являются повышенные уровни ИЛ-6, ИЛ-8, СРБ, МСР-1, ЕМАР-II, ММП-1, ММП-7, ММП-9, продуктов ПОЛ и сниженное содержание ретинола. В нестабильных атеросклеротических очагах более выражены процессы кальцификации. Повышенные уровни кальция и стронция способствуют дестабилизации бляшки.

Полученные нами результаты показали, что в зависимости от активности процессов, идущих в атеросклеротическом очаге, может сформироваться один из трех типов нестабильных атеросклеротических бляшек, для каждого из которых характерны свои особенности. При формировании бляшек дистрофически-некротического типа характерна окислительно-деструктивная активность с повышенной кальцификацией. Усиление воспалительного процесса наблюдается при формировании бляшек воспалительно-эрозивного и липидного типов.

В результате проведенных нами исследований было установлено, что начало кальцификации атеросклеротических очагов характеризуется усилением воспалительного процесса. Повышенный уровень остеокальцина способствует дальнейшей кальцификации.

Полученные в ходе нашего исследования результаты могут способствовать разработке новых подходов к лечению атеросклероза, формированию научной платформы для разработки современных методов воздействия на процесс формирования атеромы как на молекулярном, так и на клеточном уровне.

Практическое значение работы состоит в том, что благодаря параллельно проведенным исследованиям сосудистой стенки (атеросклеротические бляшки в коронарных артериях) и крови был определен комплекс ключевых биомаркеров – СРБ, ИЛ-6, ИЛ-8, МСР-1, кальций, кальцитонин, ТИМП-1 и продукты ПОЛ, который может использоваться для неинвазивной лабораторной диагностики вероятности наличия нестабильных атеросклеротических бляшек в коронарных артериях.

Материалы диссертации внедрены в учебный процесс в отделе образования НИИТПМ – филиал ИЦиГ СОРАН и научные исследования лаборатории клинических, биохимических и гормональных исследований терапевтических заболеваний НИИТПМ – филиал ИЦиГ СОРАН.

Положения, выносимые на защиту.

1. Нестабильная атеросклеротическая бляшка характеризуется повышением содержания в ней воспалительных цитокинов ИЛ-6 и ИЛ-8, СРБ, хемоаттрактантов MCP-1, EMAP-II, продуктов перекисного окисления липидов, металлопротеиназ MMP-7, MMP-1 и MMP-9, что отражает усиление в нестабильной бляшке воспалительной, окислительной, хемоаттрактантной и деструктивной активности и свидетельствует о ключевой роли воспаления в механизме развития нестабильной бляшки.
2. В формировании нестабильных атеросклеротических очагов липидного и воспалительно-эрозивного типа ключевое значение имеет воспаление, активность которого проявляется в повышении содержания воспалительных цитокинов, хемоаттрактантов, окисленных липидов и белков. При формировании дистрофически-некротических нестабильных бляшек характерно усиление кальцификации, выражающееся в увеличении уровня кальция, кальцитонина и остеокальцина и повышение показателей, характеризующих деструктивно-окислительные изменения.
3. Начальный этап формирования кальцификации атеросклеротических очагов характеризуется усилением в них воспалительной активности. Нестабильность атеросклеротических очагов ассоциируется с более высоким уровнем кальцификации. Увеличение степени кальцификации атеросклеротических очагов сопровождается повышением в них содержания кальцитонина, остеопротегерина и остеокальцина.
4. Между исследуемыми показателями в крови и в сосудистой стенке имеются связи таких биомаркеров нестабильности атеросклеротического очага как СРБ, ИЛ-6, ИЛ-8, MCP-1, кальция, кальцитонина, TIMP-1 и продуктов ПОЛ, что свидетельствует о значимости этих биомаркеров в определении вероятности наличия в коронарных артериях нестабильных атеросклеротических очагов. Концентрации в крови СРБ, ИЛ-6, ИЛ-8, MCP-1, sVCAM, метаболитов NO, окисленных протеинов связаны с гистологическими показателями, характеризующими тип бляшки в коронарных артериях.

Степень достоверности и апробация результатов. Материалы, которые представлены в диссертации, были основаны на исследовании 415 образцов атеросклеротических очагов из коронарных артерий и 130 образцов крови мужчин с коронарным атеросклерозом без острого коронарного синдрома (ОКС).

Для выполнения биохимических исследований и статистической обработки полученных данных в работе использовались современные стандартизованные методы.

Результаты работы доложены автором и обсуждены на следующих форумах: Российский национальный Конгресс кардиологов (Томск, 2004; Москва, 2005–2017; Санкт-Петербург, 2013; Казань, 2014; Екатеринбург, 2016); Международный конгресс «Кардиология на перекрестке наук» (Тюмень, 2010–2015); Международный симпозиум «Молекулярные механизмы регуляции функции клетки» (Тюмень, 2005); Симпозиум памяти Н. Н. Аничкова в рамках Международного конгресса по атеросклерозу (Санкт-Петербург, 2016), Всероссийская конференция «Вопросы патогенеза типовых патологических процессов» (Новосибирск, 2009–2011); Всероссийская конференция «Фундаментальные аспекты компенсаторно-приспособительных процессов» (Новосибирск, 2009–2013); Международная конференция «Современная кардиология: эра инноваций» (Томск, 2010); Всероссийская конференция «Алмазовские чтения» (Санкт-Петербург, 2011); Международный образовательный форум «Российские дни сердца» (Москва, 2013, 2015; Санкт-Петербург, 2014); III Евразийский Конгресс кардиологов (Москва, 2014); Европейский Конгресс по атеросклерозу и Международный Симпозиум по атеросклерозу (Прага, Италия, Германия, Швеция, Франция, Испания, Австрия – 2007–2017).

Объем и структура диссертации. Диссертация состоит из следующих разделов: введение; обзор литературы; материалы и методы исследования; результаты исследования; обсуждение; вывод; список используемой литературы. Диссертационная работа изложена на 188 страницах машинописного текста, иллюстрирована 19 таблицами и 20 рисунками. Список цитируемой литературы включает 493 источника, в том числе 121 российских и 372 зарубежных авторов.

Публикации. По материалам диссертационной работы издано 79 научных работ на русском и английском языках, из них 31 статья в журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве образования и науки Российской Федерации.

Личный вклад автора. Совместно с научным консультантом д.м.н., членом-корреспондентом РАН Рагино Ю. И. была разработана концепция исследования. Лично автором разработан план исследований, проведены подготовка и биохимические анализы образцов. Автором создана база данных на основе

протоколов и полученных результатов, выполнена статистическая обработка и анализ результатов. Автором, совместно с Рагино Ю. И., Каштановой Е. В., Журавской Э. Я., Чернявским А. М., Стахнёвой Е. М. и другими, были написаны статьи, отражающие результаты исследований.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проводились в рамках: 1) программы научно-исследовательских работ «НИИТПМ – филиал ИЦиГ СО РАН» (руководитель программы проф. Рагино Ю.И.) совместно с ФГБУ «НМИЦ им. акад. Е. Н. Мешалкина» Минздрава России (руководитель программы проф. Чернявский А. М.), на работы было получено одобрение Этическими комитетами учреждений (протоколы № 01 от 14.09.2005 г. и № 4 от 28.09.2005 г.); 2) бюджетных НИР ФГБНУ «НИИ терапии и профилактической медицины» (2004–2006, 2007–2009, 2011–2012, 2013–2017 гг.); 3) гранта Мэрии Новосибирска, № 22–08 (2008–2009 гг.); 4) гранта РФФИ, № 09–04–00374а (2009–2010 гг.); 5) гранта Президента РФ, № МД–539.2007.7 (2007–2008 гг.).

В исследование включили 130 мужчин в возрасте 46–79 лет, с коронароангиографически верифицированным коронарным атеросклерозом и стабильной стенокардией напряжения II–III функционального класса (без ОКС). Пациенты поступили на операцию коронарного шунтирования в Клинику ФГБУ «НМИЦ им. акад. Е. Н. Мешалкина» Минздрава России. Критериями исключения из исследования были: обострение хронических и острые воспалительные заболевания; ИМ давностью менее 6 месяцев; почечная недостаточность; онкологические заболевания; болезни печени в стадии обострения. Все пациенты заполняли Информированное согласие по участию в исследовании. По интраоперационным показаниям проводилась эндартерэктомия из коронарной/-ых артерии/-ий (рук. исследования в ФГБУ «НМИЦ им. акад. Е. Н. Мешалкина» Минздрава России – д.м.н., проф. Чернявский А. М.). Все материалы эндартерэктомии, содержащие интиму/медиа коронарных артерий были поперечно и продольно симметрично разделены на 6–10 фрагментов, в которых проводились гистологические и биохимические исследования.

После макроскопического описания образцов (распространенность бляшки, кровоизлияния в структуры бляшки, степень стенозирования просвета артерии, наличие участков обызвествления и тромбов) и стандартной окраски гематоксилин-эозином и по Ван Гизону проводился гистологический анализ участков коронарных артерий, забранных во время операции. Гистологический

анализ выполнялся в патоморфологической лаборатории ФГБУ «НМИЦ им. акад. Е. Н. Мешалкина» Минздрава России (рук. лаборатории д.м.н., проф. Волков А. М.).

Было получено 415 образцов, из них 32 – условно неизменная ткань интимы, 41 образец – липидное пятно/полоска, 177 – атероматозная стабильная бляшка, 165 образцов – нестабильная атеросклеротическая бляшка. Нестабильная атеросклеротическая бляшка определялась как повреждённая бляшка с крупным липидным ядром (> 40 %), толщиной фиброзной покрышки меньше 65 мкм; инфильтрированная МФ и Т-ЛФ (в поле зрения 0,3 мм более 25 клеток) [Waksman R., Seruys P.W., 2004]. Определялся тип нестабильных атеросклеротических очагов [Waksman R., Seruys P. W., 2004; Шлычкова Т. П. и др., 2005]: 1) дистрофически-некротический тип – бляшки с выраженными дистрофическими изменениями и некрозами в толстых фиброзных покрышках, часто встречаются очаги кальцификации, липидное ядро отсутствует или его размеры не превышают 20 %, коллагеновые волокна некротизированы и истончены; 2) бляшка с воспалением/эрозией – повышенное содержание протеогликанов или воспаление, которое приводит к эрозии и тромбозу, липидное ядро небольших размеров; 3) липидный тип – фиброатерома с крупным атероматозным ядром и истончённой фиброзной покрышкой (15–45 мкм), которая часто в значительном количестве содержит клетки воспаления и единичные гладкомышечные клетки. Среди образцов нестабильных бляшек было дистрофически-некротического типа – 59 бляшек (40 %), воспалительно-эрозивного – 57 (35 %), липидного типа – 49 (25 %). Также, согласно гистологическому анализу, все образцы для проведения дальнейших исследований были разделены на 3 группы: 1) без выявленных кальцификатов – 189 (46 %), 2) очаги с мелкими и пылевидными кальцификатами – 139 (33 %), 3) с крупными кальцификатами – 87(21 %).

Образцы интимы/медии замораживали в жидком азоте и гомогенизировали в растворе фосфатно-солевого буфера. Были получены 5 %-е гомогенаты, которые делили на аликвоты, чтобы в дальнейшем провести биохимические анализы. Измерение белка в гомогенатах образцов проводили по методу Лоури [Lowry H., Roenbrought N. J. et al., 1951]. Другие биохимические показатели в гомогенатах рассчитывались относительно белка.

Все нижеперечисленные фундаментально-биохимические исследования были выполнены и в гомогенатах образцов интимы/меди коронарных артерий, и в сыворотке крови мужчин, включенных в исследование.

Ферментативным методом с использованием стандартных реактивов «Thermo Fisher» на автоматическом анализаторе Konelab 300i (Thermo Fisher, Финляндия) проводили измерение холестерина (ХС).

Уровни процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в гомогенатах образцов оценивали по концентрации малонового диальдегида (МДА) флуориметрическим методом на спектрофлуориметре «Versafluor», Bio-Rad [Schuh J., Fairclough G. F., 1978] при длинах волн E_x 515 нм и E_m 553 нм. Исходный уровень продуктов ПОЛ в липопротеинах низкой плотности (ЛНП) и окислительную резистентность ЛНП *in vitro* в сыворотке определяли по оригинальному способу Рагино Ю. И. и Душкина М. И. (1998, 2005). Определение содержания МДА проводили на спектрофлуориметре «Hitachi F-300» флуориметрическим методом [Schuh J., Fairclough G. F., 1978].

В сыворотке крови и гомогенатах образцов по концентрации карбонильных групп оценивали степень окислительной модификации белков. Для этого измеряли оптическую плотность после реакции с 0,1 М раствором 2,4-динитрофенилгидразина в 2 М растворе соляной кислоты спектрофотометрическим методом, длина волны 363 нм (Дубинина Е. Е. и др., 1995). Результаты выражались в ЕД оптической плотности на мг белка.

Исходный уровень активности параоксоназы (ПО) в гомогенатах образцов определялся в трис-НСl буфере, который содержал 2 ммоль/л $CaCl_2$ и 5,5 ммоль/л параоксона спектрофотометрическим методом (Sigma) [Mackness B., Mackness M. I. et al., 1998].

Жирорастворимые антиоксиданты – α -токоферол и ретинол определяли флуориметрическим методом на спектрофлуориметре "Versafluor" (Bio-Rad). Для α -токоферола длина волн – E_x 290 нм и E_m 334 нм, для ретинола – E_x 340 нм и E_m 490 нм. Содержание жирорастворимого антиоксиданта β -каротина определяли спектрофотометрически при длинах волн 450 нм и 475 нм [Taylor S. L. et al., 1976].

Изучение общей антиоксидантной способности проводилось при помощи теста FORD, который основан на использовании предварительно образованных радикалов и снижении абсорбции пропорционально концентрации антиоксидантов в крови на анализаторе FORM Plus (Callegari, Италия).

Уровень метаболитов NO (нитратов/нитритов) в сыворотке определяли после депротеинизации плазмы и восстановления NO^{3-} до NO^{2-} с помощью гранулированного кадмия спектрофотометрическим методом [Голиков П. П. и соавт., 2004]

Иммуноферментным анализом с использованием стандартных наборов (ELISAs) на ИФА-анализаторе Multiscan EX (Thermo Fisher, Финляндия) в гомогенатах образцов и в сыворотке крови был определен уровень ИЛ-1-РА, ИЛ-1- β и ФНО- α , (Biosource), ИЛ-2, ИЛ-8 и ИЛ-6 (Cytimmune), СРБ (Biomerica), ТИМП-1 (Biosource), ММП-9 (RD), ММП-3 (Biosource), ММП-1 (RayBiotech), ММП-7 (BCM Diagnostics наборы), эндотелина-1 (Biomedica), остеопротегерина (Bioscience), кальцитонина (Biomerica), остеокальцина (Immunodiagnostic Systems Ltd наборы), хемоаттрактантов MCP-1 (Bender MedSystems), ЕМАР-II (Biosource), адгезивных молекул sVCAM-1 (Biosource), GM-CSF (Bender MedSystems), гиалуроновой кислоты (Corgenix), sGAG (Euro Diagnostica). В качестве контролей были использованы контрольные сыворотки с высоким и низким значением исследуемых показателей, которые поставляются с наборами ELISAs.

Элементный состав образцов биосубстратов определяли рентгенофлуоресцентным анализом с использованием синхротронного излучения (РФА СИ) [Baryshev V. V., Kulipanov G. N., Skrinisky A.N., 1986] на станции элементного анализа (накопитель ВЭПП-3) в ЦКП «Сибирский Центр Синхротронного и Терагерцового Излучения» Института ядерной физики им. Г. И. Будкера СО РАН (к.х.н. Савченко Т.И., Чанкина О.В.). Образцы для определения химических элементов получали нанесением 25 мкл гомогената на бумажный фильтр (Whatman grade 41) площадью 1 см и высушиванием на воздухе. Измерения проводились при энергии возбуждения 22 кэВ с применением внешнего стандарта [Baryshev V. V., Bufetov N. S. et al, 1995]. Точность содержания химических элементов определялась двадцатикратным измерением одного и того же образца. В образцах были измерены Ca, Fe, Br, Pb, Sr, Zn.

Статистический анализ выполнен с использованием программы SPSS для Windows. Для каждого показателя вычисляли, в зависимости от вида распределения, среднее арифметическое (M), стандартное отклонение (σ), ошибку среднего (m), медиану (Me) максимальное и минимальное значения. С помощью t-критерия Стьюдента (нормальное распределение) или критерия Манна-Уитни оценивали достоверность различий между средними значениями. С помощью

критериев Спирмена оценивали корреляционные связи. Методом дисперсионного анализа (One-Way-ANOVA) проводили множественное сравнение между группами с использованием критерия Даннета. В системе линейного регрессионного анализа, мультивариантного регрессионного анализа в GLM оценивали ассоциативные связи. Критерием статистической значимости был уровень ($p < 0,05$).

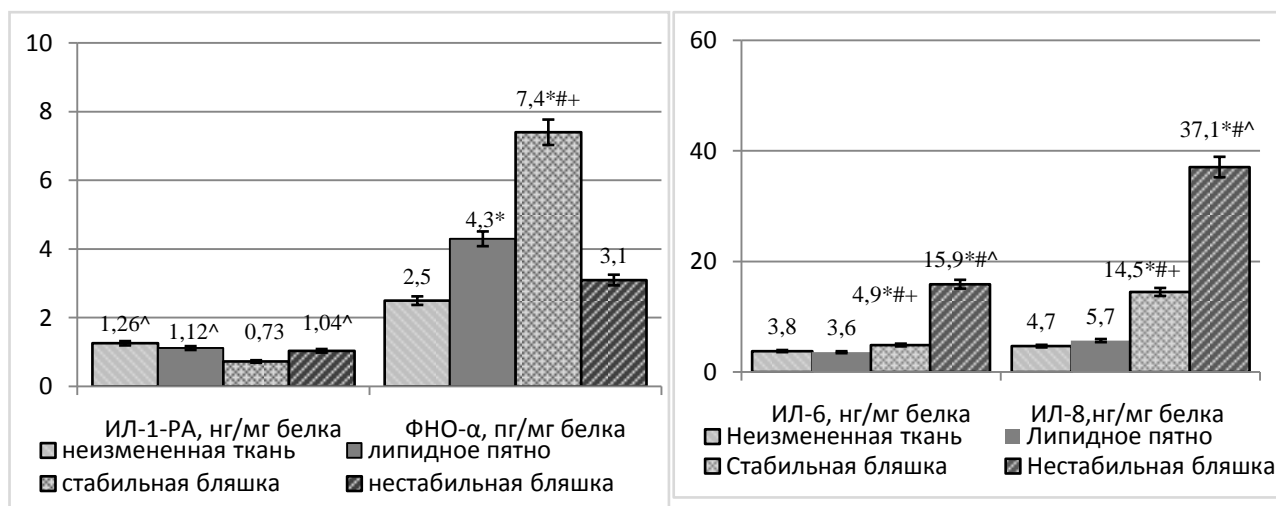
РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Воспалительно-деструктивные, окислительные, эндотелиально-дисфункциональные процессы и кальцификация на разных стадиях эволюции атеросклеротических очагов коронарных артерий

Для оценки воспалительной активности на разных этапах формирования атеромы были исследованы уровни некоторых цитокинов, хемоаттрактантов и С-реактивного белка (табл. 1; рис. 1).

При формировании липидного пятна по сравнению с неизменной тканью повышались уровни ФНО- α (на 65 %) и СРБ (на 60 %) (табл.1, рис.1).

На стадии стабильной бляшки практически в 3 раза, по сравнению с условно неизменённой тканью, был повышен уровень ФНО- α , который играет важную роль на этом этапе, индуцируя пролиферацию Т-ЛФ, ГМК и экспрессию эндотелиальными клетками молекул адгезии [Libby P., 2002; Puddu G. M. et al., 2005]. В нестабильных бляшках воспалительная активность характеризовалась повышенными уровнями ИЛ-6 и ИЛ-8 (рис. 1).



Примечание: ($p < 0,05$) по сравнению: * – с неизменённой тканью интимы, # – с липидным пятном, ^ – со стабильной бляшкой, (+) – с нестабильной бляшкой.

Рисунок 1 – Содержание ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-1-РА и ФНО- α в атеросклеротических очагах разных стадий развития

Преобладание активности ИЛ-1 и ФНО- α на ранних стадиях, способствует секреции МФ и эндотелиоцитами ИЛ-8, увеличение уровня которого проявляется на этапе нестабильной бляшки. Уровень СРБ возрастал от начальной стадии до нестабильной бляшки (табл.1).

МСР-1, экспрессирующийся МФ в ответ на воздействие на них таких цитокинов как ФНО- α , ИЛ-1- β и ИЛ-6, является моноцит- и Т-ЛФ- специфическим хемоаттрактантом [Проваторов С. И. и соавт., 2006; Braunersreuther V. et al., 2007]. Исследование содержания МСР-1 на разных этапах формирования атеромы показало повышение уровня данного маркера к стадии уязвимой бляшки (табл. 1).

Эндотелиально-моноцитарный активирующий полипептид (ЕМАР-II), секретирующийся МФ и Т-ЛФ, который относится к провоспалительным цитокинам и хемоаттрактантам, индуцирует образование на поверхности эндотелиоцитов прокоагулянтного тканевого фактора, активирует нейтрофилы, апоптоз, ингибирует неоваскуляризацию интимы/медии [Murray J. C. et al., 2004; Schwarz M. A. et al., 2005]. Уровень ЕМАР-II (табл.1) постепенно повышался по мере развития атеросклеротического очага.

Таблица 1 – Содержание исследуемых биомаркеров в атеросклеротических очагах разных стадий развития ($M \pm \sigma$)

Показатели (единицы измерения)	Неизменная ткань	Липидное пятно	Стабильная бляшка	Нестабильная бляшка
ИЛ-2(пг/мг белка)	16,7 \pm 2,2	17,8 \pm 2,5	18,7 \pm 2,9	21,9 \pm 3,4
СРБ(нг/мг белка)	7,0 \pm 1,0	11,2 \pm 1,6*	17,5 \pm 1,8*#+	28,7 \pm 2,1*#^
МСР-1(пг/мг белка)	208,9 \pm 21,0	218,9 \pm 20,5	277,7 \pm 27,3*#+	401,7 \pm 39,8*#^
ЕМАР-II (пг/мг белка)	510,1 \pm 46,1	901,8 \pm 76,6*	1396,9 \pm 123,0*#+	2007,8 \pm 189,5*#^
Продукты ПОЛ (нМ МДА/мг белка)	0,6 \pm 0,3	0,5 \pm 0,1	0,95 \pm 0,25	2,0 \pm 0,3*#^
Окисленные белки (ЕД/мг белка)	16,6 \pm 1,9	49,4 \pm 4,1*^+	207,8 \pm 33,4*#+	131,4 \pm 19,1*#^
Альфа-токоферол (мкг/мг белка)	330,9 \pm 36,4	357,0 \pm 35,2	385,0 \pm 31,8	346,9 \pm 31,0
Бета-каротин (ЕД/мг белка)	92,6 \pm 10,1	98,1 \pm 10,3	105,3 \pm 11,6	96,4 \pm 10,7
Примечание: ($p < 0,05$) по сравнению: * – с неизменённой тканью интимы, # – с липидным пятном, ^ – со стабильной бляшкой, (+) – с нестабильной бляшкой.				

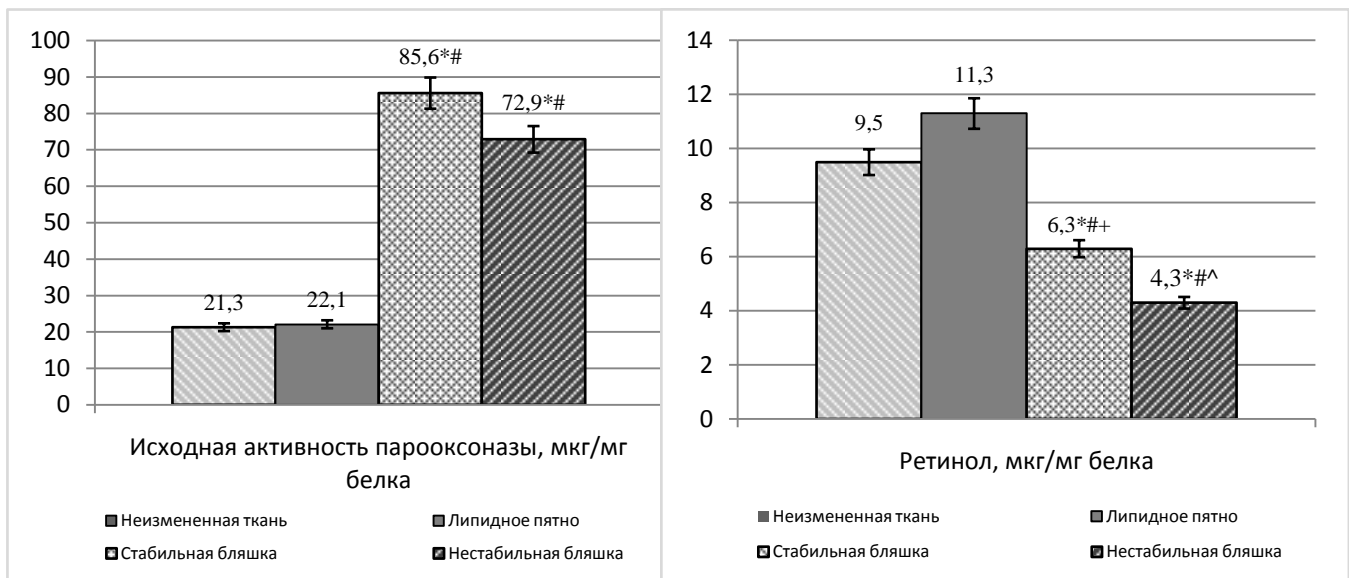
Таким образом, для нестабильных очагов характерно повышение уровней ИЛ-6, ИЛ-8, СРБ, МСР-1, ЕМАР-II и снижение уровня ФНО- α .

Были изучены изменения уровней окислительных и антиоксидантных показателей как маркеров окислительного стресса при атеросклерозе на разных этапах формирования атеромы.

Самый высокий уровень продуктов ПОЛ был в нестабильных бляшках (табл. 1). Исследование окисленных белков такой особенности не выявило. Содержание карбонильных групп белков - маркеров их окислительной модификации [Levine R. L. et al., 1990] было наибольшим в стабильных бляшках, выше, чем в липидных пятнах и нестабильных бляшках. Также нами были исследованы некоторые показатели антиоксидантного потенциала в атеросклеротических очагах, отражающие степень защиты сосудистой стенки от окисления [Зенков Н. К. и соавт., 2001; Madamanchi N.R. et al., 2005]. Показатель исходного уровня активности параоксоназы (ПО) – фермента, связанного с частицами липопротеинов высокой плотности (ЛВП), свидетельствует об активности этого антиоксидантного фермента *in vivo*, то есть на момент забора биологического материала [Gupta N. et al., 2009; Mackness B. et al., 1999]. В нашем исследовании в стабильных и нестабильных бляшках в сравнении с липидными пятнами исходный уровень активности ПО был выше более чем в 3 раза (рис. 2), что указывает на высокую потребность в антиоксидантном эффекте ПО для нейтрализации повышенных окислительных процессов.

Такие же данные были получены для общей антиоксидантной защиты (FORD), при повышении степени окислительного стресса в сосуде происходило повышение общей антиоксидантной способности. Уровень FORD в нестабильных бляшках был в 1,5 и в 7 раз выше, чем в стабильных бляшках и условно неизменной интима соответственно, видимо, это связано с усилением компенсаторных процессов.

Уровни α -токоферола и β -каротина на разных этапах формирования атеромы не имели достоверных отличий. Содержание ретинола (рис. 2) постепенно снижалось от стадии липидного пятна к стадии нестабильной бляшки. Таким образом, из изученных окислительно-антиоксидантных показателей, наиболее характерными для нестабильного очага являются: высокий уровень продуктов окисления липидов, повышение общей антиоксидантной способности и низкое содержание ретинола.



Примечание: ($p < 0,05$) по сравнению: * – с неизменённой тканью интимы, # – с липидным пятном, ^ – со стабильной бляшкой, (+) – с нестабильной бляшкой.

Рисунок 2 – Исходная активность параксоназы и содержание ретинола в атеросклеротических очагах разных стадий развития.

Выявленные корреляционные связи активности процессов ПОЛ с содержанием α -токоферола, ретинола и β -каротина, а окислительной модификации белков с исходным уровнем активности ПО соответствуют изменениям окислительной и антиоксидантной активности в стабильной бляшке, когда повышены процессы окисления белков, а окисление липидов еще не достигло максимальной активности, возможно, из-за достаточно выраженной антиоксидантной функции ПО.

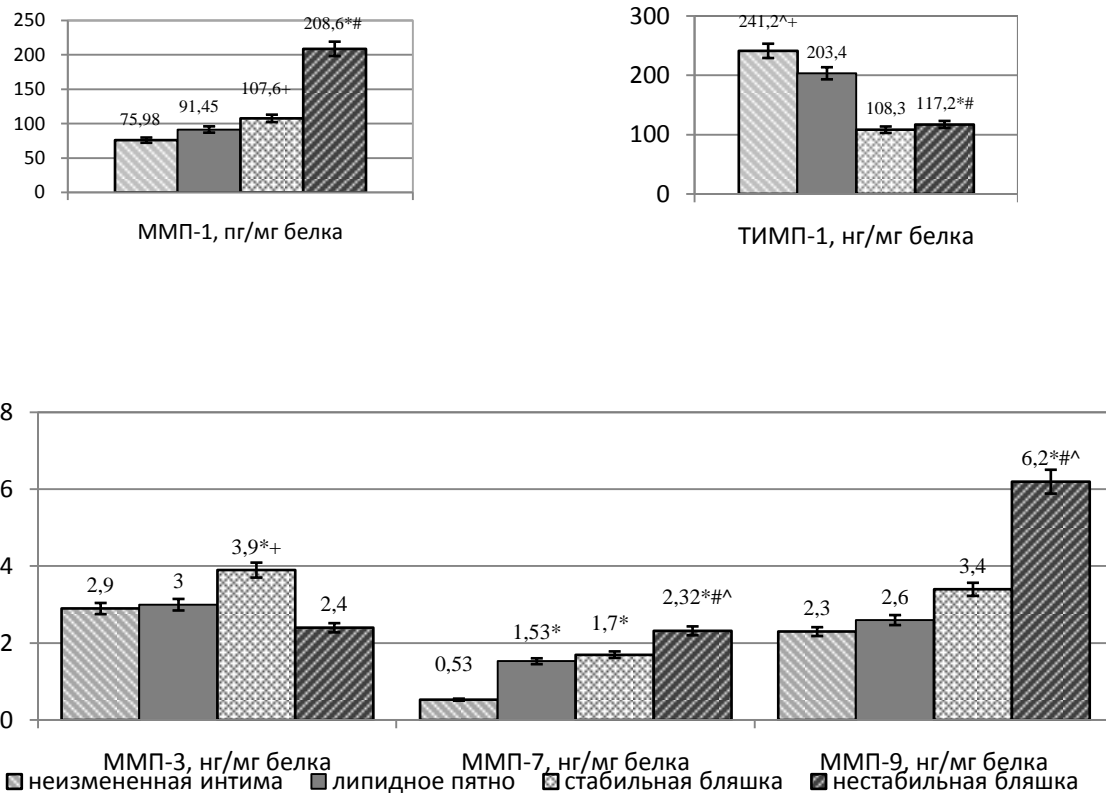
Для исследования активности деструктивного процесса на разных этапах формирования атеросклеротического очага, нами изучены изменения уровней ТИМП-1 и металлопротеиназ как маркеров этого процесса (рис. 3).

Уровень ТИМП-1 был выше в неизменной интиме и в липидных пятнах. Значимых различий этого показателя между нестабильными и стабильными бляшками выявлено не было. Активность ТИМП-1 может ингибироваться повышенным уровнем ИЛ-8 [Daskalopoulou S.S. et al., 2007; Newby A.C., 2005], что согласуется с полученными нами результатами по уровню ИЛ-8 в бляшках.

Сниженное содержание ТИМП-1 в сформированных атеросклеротических бляшках (и стабильных и нестабильных) свидетельствует о большей потенциальной возможности ферментативной активности деструктивных ММП.

Исследование содержания ММП-7, разрушающей протеогликаны,

фибронектин, ламинин, версикан и др. [Carbone G.L. et al., 2003; Newby A.C., 2005], и являющейся активатором про-ММП-9; а также содержания самой ММП-9, желатиназы, гидролизующей коллаген базальных мембран [Katsuda S. et al., 2003; Newby A.C., 2005]), выявило их явное повышение именно в нестабильных бляшках в сравнении с неизменной интимой, липидными пятнами и стабильными бляшками (рис. 3).



Примечание: ($p < 0,05$) по сравнению: * – с неизменённой тканью интимы, # – с липидным пятном, ^ – со стабильной бляшкой, (+) – с нестабильной бляшкой.

Рисунок 3 – Уровни металлопротеиназ и ТИМП-1 в атеросклеротических очагах разных стадий развития

Относительно ММП-3 нами были получены не совсем ожидаемые результаты. Уровень ММП-3 (стромелизин, разрушающий эластин, протеогликаны, фибронектин и др. [Newby A.C., 2005; Uzuji H. et al., 2002]) оказался выше только в стабильных бляшках, причем в сравнении, как с неизменной интимой, так и с нестабильными бляшками (в 2,4 раза), что свидетельствует об отсутствии повышенной активности ММП-3 в нестабильных

бляшках даже при сниженной активности в них ТИМП-1.

При исследовании ММП-1, разрушающей коллагеновые волокна, было выявлено её повышение в 1,9 раза ($p < 0,05$) в нестабильных атеросклеротических очагах, по сравнению со стабильными и в 2,7 раза выше по сравнению с условно неизменённой тканью интимы. Таким образом, для липидного пятна характерно повышение уровня ММП-7. В стабильных бляшках был самый высокий уровень ММП-3, а для нестабильных бляшек характерно усиление деструктивной активности, проявляющееся самыми высокими уровнями ММП-7, ММП-9 и ММП-1.

При изучении кальцификации в атеросклеротических очагах был выявлен более высокий уровень кальцификации в нестабильных бляшках. Кальцифицированными, по данным гистологических исследований, оказались 77 % нестабильных бляшек, причём крупноглыбчатые кальцификаты в них выявлены в 39 % случаев. Среди стабильных бляшек было кальцифицировано 52 %, на крупноглыбчатые кальцификаты приходилось 23 %. При биохимическом исследовании было выявлено значительное повышение уровня кальция в нестабильных бляшках – в 1,72 раза выше, чем в стабильных, в неизменённой ткани содержание кальция было значительно ниже. 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 Ca^{2+} через клеточные мембраны. Он стимулирует поглощение ионов Ca^{2+} митохондриями и тем самым задерживает отток ионов Ca^{2+} из клетки, что может отражаться на кальцификации сосудистой стенки. Содержание кальцитонина было в 2,1 раза выше в нестабильных атеросклеротических очагах по сравнению с неизменной интимой (табл. 2).

Повышенный уровень кальцитонина стимулирует остеобласты, которые синтезируют основные компоненты межклеточного вещества – коллаген I типа, щелочную фосфатазу, остеокальцин, остеоонектин и другие [Wookey P.J. et al., 2009]. По нашим данным по мере развития очага от условной интимы к нестабильной бляшке не только возрастал уровень кальцитонина, но и значительно увеличивалось содержание остеокальцина. Уровень остеокальцина

был выше в 1,86 раза в нестабильных бляшках по сравнению со стабильными и более чем в 4 раза по сравнению с неизменной интимой.

Таблица 2 – Уровни маркеров кальцификации и холестерина на разных этапах развития атеросклеротического очага ($M \pm \sigma$)

Показатель (единицы измерения)	Неизменённая интима (1)	Стабильная бляшка (2)	Нестабильная бляшка (3)	* ($p < 0,05$) **($p < 0,01$)
Кальцитонин (пг/мг белка)	13,4 ± 3,1	20,63 ± 4,1	28,29 ± 3,6	3–1*
Остеопротегерин (пг/мг белка)	171,0 ± 14,0	276,7±25,9	220,2 ± 20,6	2–1*
Остеокальцин (нг/мг белка)	26,9 ± 16,1	69,1 ± 17,1	128,4 ± 19,0	1–2,3* 2–3*
Са (мкг/г)	147 ± 79,2	1521,3 ± 403,4	2614,3 ± 630,1	1–2,3**
Холестерин (мг/мг белка)	4,4 ± 2,9	36,9 ± 8,9	33,9 ± 9,9	1–2,3**

Рядом авторов [Davaine J.-M. et al., 2016; Schoppet M. et al., 2002] было показано, что остеопротегерин является модулятором кальцификации стенки сосудов, так как у мышей с делецией гена остеопротегерина развивается кальцификация артерий. Данные артерии являются местами экспрессии остеопротегерина. В нашем исследовании максимальный уровень остеопротегерина был выявлен в стабильных бляшках. Нами также выявлена связь между уровнями остеопротегерина и ИЛ-6. Видимо, повышение уровня остеопротегерина - компенсаторный процесс, который может оказывать защитное действие на артерии, предупреждая патологическую кальцификацию и стабилизируя атеросклеротическую бляшку ингибируя умеренные воспалительные процессы.

Холестерин (ХС), как и ожидалось, оказался почти в 8 раз выше в атеросклеротических очагах, по сравнению с неизменённой интимой. При проведении корреляционного анализа была выявлена средняя связь ХС с кальцитонином и остеокальцином ($r = 0,474$ и $0,459$ ($p < 0,01$)), соответственно.

При исследовании микроэлементного состава в нестабильных бляшках, по сравнению со стабильными, было выявлено повышение уровня кальция и стронция в 1,7 и 1,9 раза, соответственно, и снижение уровня железа в 2 раза ($p < 0,05$).

Выявлены связи уровня кальция с остеокальцином, СРБ и ТИМП-1 (коэффициенты $0,757^{**}$; минус $0,443^{*}$; минус $0,610^{*}$); свинца с

остеопротегерином, ИЛ-8, ТИМР-1, sGAG (минус 0,533*; 0,757**; минус 0,692*; минус 0,786*); цинка с остеокальцином и СРБ (0,653** и минус 0,759**), меди с остеопротегерином и СРБ (минус 0,504**; 0,731**); Fe с ИЛ-8 (0,437**). Кальций является антагонистом цинка, который стимулирует регенеративные процессы, кроме этого, повышенный уровень Са ведёт к снижению ТИМР-1, поэтому избыток Са вызывает сдвиг в системе синтез-деструкция, что, в свою очередь, ведёт к переходу атеросклеротической бляшки в нестабильное состояние.

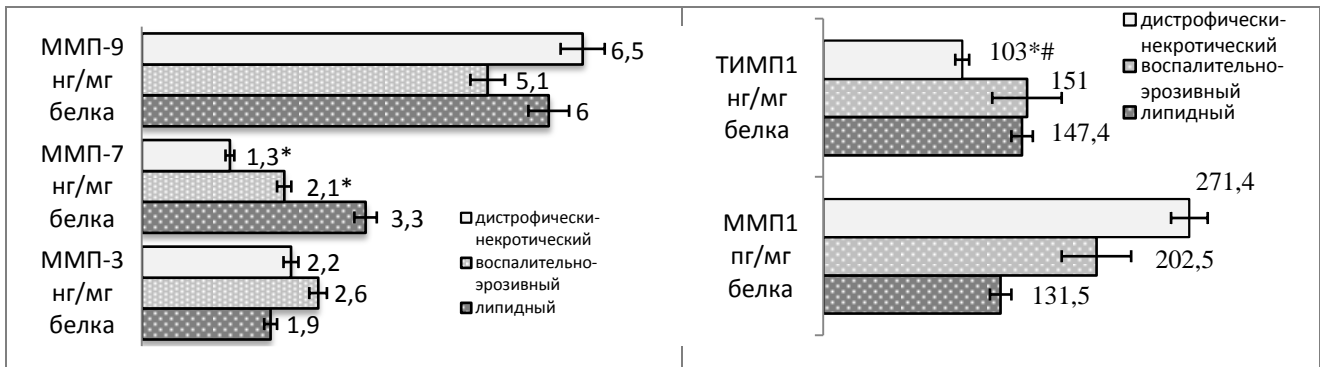
Параметры выраженности воспалительно-деструктивных, окислительных, эндотелиально-дисфункциональных процессов в разных типах нестабильных бляшек

Проведено сравнительное исследование воспалительно-деструктивных, окислительных, эндотелиально-дисфункциональных изменений в нестабильных бляшках разных типов (табл. 3).

Таблица 3 – Содержание биомаркеров в нестабильных бляшках разных типов (M ± m)

Показатели (единицы измерения)	Липидный тип	Воспалительно-эрозивный тип	Дистрофически-некротический тип
ИЛ-1-РА (пг/мг белка)	1218,1 ± 101,3	707,6 ± 70,2*^	1269,4 ± 115,5
ФНО-альфа (пг/мг белка)	2,3 ± 0,2	2,6 ± 0,2	3,9 ± 0,4*#
ИЛ-6 (нг/мг белка)	27,6 ± 2,4	14,2 ± 1,3*^	6,3 ± 0,6#
ИЛ-8 (пг/мг белка)	38,9 ± 5,4	36,1 ± 5,4	20,9 ± 2,1*#
МСР-1 (пг/мг белка)	470,6 ± 41,6	598,0 ± 54,1	159,7 ± 13,8*#
ЕМАР-II (пг/мг белка)	2099,3 ± 197,0	2180,4 ± 200,1^	1701,1 ± 165,5
СРБ (нг/мг белка)	33,4 ± 9,2	29,5 ± 3,5	11,8 ± 1,0*#
GM-CSF (пг/мг белка)	4,33 ± 1,39	2,15 ± 0,45	10,2 ± 2,21*#
sGAG (мкг/мг белка)	44,91 ± 14,19	26,83 ± 7,61	89,91 ± 18,29
Гиалуроновая (нг/мг белка)	249,37 ± 67,08	173,2 ± 26,9	258,46 ± 50,9#
Холестерин (мг/мг белка)	37,5 ± 9,3	19,4 ± 3,8*^	30,61 ± 7,3
Продукты ПОЛ (нМ МДА/мг белка)	1,0 ± 0,1	1,8 ± 0,4*	2,9 ± 0,7*
Окисленные белки (ЕД/мг белка)	145,3 ± 18,5	143,6 ± 17,1	85,1 ± 7,3*#
Активность ПО (мкг/мг белка)	79,2 ± 12,1	88,8 ± 16,5	44,4 ± 5,4
Примечание: (p < 0,05) в сравнении: * – с липидным типом, # – в сравнении с воспалительно-эрозивным типом, ^ – в сравнении с дистрофически-некротическим типом.			

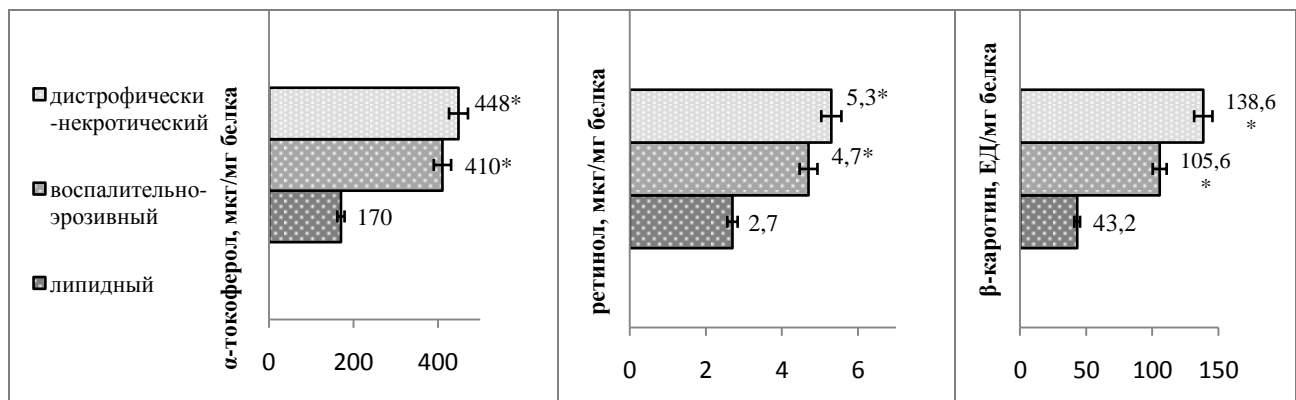
При воспалительно-эрозивном типе выявлено более низкое содержание ИЛ-1-РА и повышенное содержание СРБ, ИЛ-6, ИЛ-8, МСР-1 и ЕМАР-II в сравнении с дистрофически-некротическим типом. В бляшках дистрофически-некротического типа повышен уровень ФНО- α по сравнению с липидным типом и снижен ТИМП-1 по сравнению с воспалительно-эрозивным. Содержание ММП-7 было выше в бляшках липидного типа. Уровни ММП-3 и ММП-9 в бляшках разных типов не отличались (рис. 4).



Примечание: ($p < 0,05$) в сравнении: * – с липидным типом, # – в сравнении с воспалительно-эрозивным типом.

Рисунок 4 – Уровни металлопротеиназ и ТИМП-1 в нестабильных атероматозных бляшках разных типов

Сравнительный анализ биомаркеров окисления выявил повышенное содержание продуктов ПОЛ в дистрофически-некротических и воспалительно-эрозивных очагах. Более высокое содержание окисленных белков было в бляшках липидного и воспалительно-эрозивного типа. Уровни жирорастворимых антиоксидантов в нестабильных бляшках липидного типа были снижены (рис. 5).



Примечание: ($p < 0,05$) в сравнении: * – с липидным типом.

Рисунок 5 – Уровни антиоксидантов в нестабильных атероматозных бляшках разных типов

Если рассматривать уровень кальцификации в зависимости от типа нестабильной бляшки, то оказывается, 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 %. Самый высокий уровень кальцитонина и остеокальцина был выявлен, как и ожидалось, в бляшках дистрофически-некротического типа (табл. 4). Самые низкие уровни как кальцитонина, так и остеокальцина были в бляшках воспалительно-эрозивного типа. Это согласуется с нашими данными о связи кальцификации атеросклеротических бляшек с повышенным уровнем остеокальцина. Самый высокий уровень остеопротегерина был в бляшках липидного типа.

Таблица 4 – Содержание маркеров кальцификации в нестабильных бляшках разных типов ($M \pm m$)

Показатели (единицы измерения)	Липидный тип	Воспалительно- эрозивный тип	Дистрофически- некротический тип
Кальцитонин (пг/мг белка)	14,6 ± 2,3	9,3 ± 2,6	41,2 ± 9,3*#
Остеопротегерин (пг/мг белка)	277,1 ± 29,6	186,7 ± 32,7*	203,5 ± 40,9
Остеокальцин (нг/мг белка)	96,27 ± 23,79	35,4 ± 1,1*^	131,8 ± 17,61
Примечание: ($p < 0,05$ в сравнении: * – с липидным типом, # – в сравнении с воспалительно-эрозивным типом, ^ – в сравнении с дистрофически-некротическим типом.			

Таким образом, в зависимости от активности процессов, идущих в атеросклеротическом очаге, может сформироваться один из трёх типов нестабильных атеросклеротических бляшек, для каждого из которых характерны свои особенности (рис. 6).

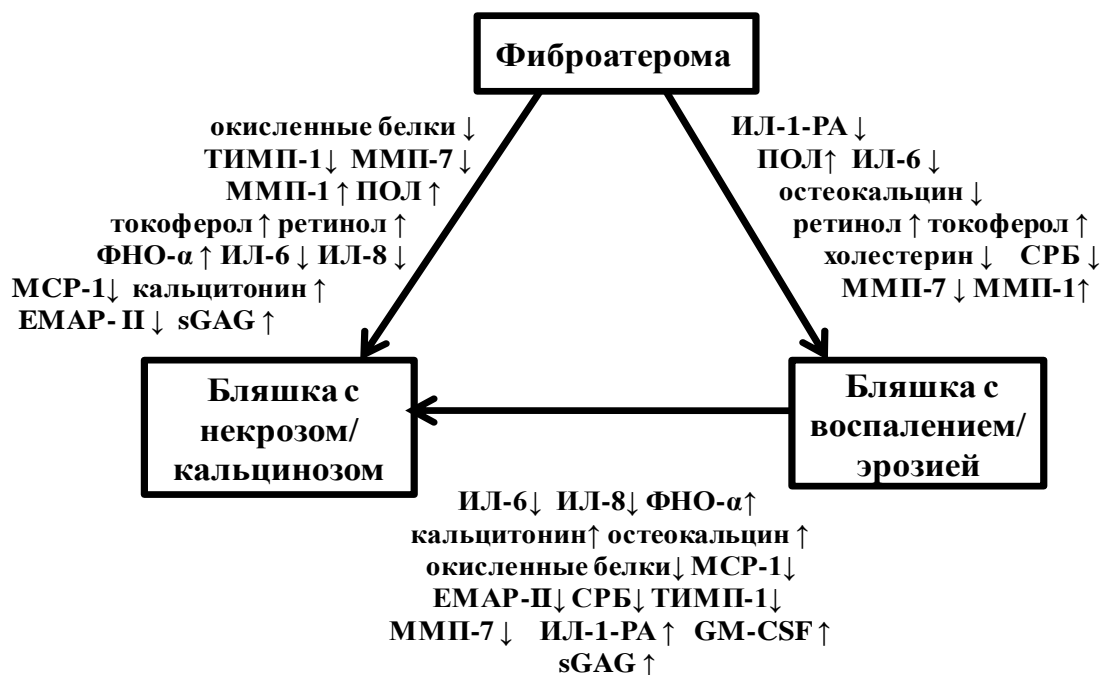


Рисунок 6 – Значимые отличия исследуемых показателей в разных типах нестабильных бляшек

Параметры выраженности воспалительно-деструктивных, окислительных, эндотелиально-дисфункциональных процессов в атеросклеротических очагах с разной степенью кальцификации

В ряде публикаций показано, что атеросклеротическая кальцификация тесно связана с процессами воспаления, имеются данные о том, что кальциноз сосудов может инициировать воспаление и дальнейшую прогрессию кальцификации [Budoff M.J., Raggi P., 2001; Ulusoy F.R. et al., 2015], поэтому мы изучили воспалительные маркеры в зависимости от степени кальцификации атеросклеротического очага (табл. 5).

О наличии воспалительного процесса в очагах с пылевидными и мелкими кальцификатами свидетельствуют повышенные уровни ИЛ-6, ИЛ-8 и ФНО-α (табл. 5). Полученные нами данные согласуются с результатами Chatrou M.L. и соавт. (2015), в которых показано усиление воспалительных процессов на стадии микрокальцификации. Также в очагах с пылевидными и мелкими кальцификатами выявлено повышение уровней ММП-3, ММП-9 и холестерина, отмечена тенденция к повышению гиалуроновой кислоты.

Таблица 5 – Уровень исследуемых показателей в атеросклеротических очагах с разной степенью кальцификации ($M \pm \sigma$)

Показатель (единицы измерения)	Нет кальцификации	Пылевидные и мелкие кальцификаты	Крупные кальцификаты	P < 0,05
Кальцитонин (пг/мг белка)	22,9 ± 5,4	24,7 ± 3,8	28,1 ± 9,3	—
Остеопротегерин (пг/мг белка)	240,4 ± 27,6	228,1 ± 30,3	277,8 ± 52,4	—
Остеокальцин (нг/мг белка)	49,7 ± 23,0	131,5 ± 36,0	130,9 ± 40,2	1–2,3
ФНО-α (пг/мг белка)	5,4 ± 0,5	9,7 ± 0,9	5,4 ± 0,6	2–1,3
ИЛ-1 бета, (пг/мг белка)	46,7 ± 11,9	31,4 ± 4,9	13,7 ± 3,4	1–3
ИЛ-6 (нг/мг белка)	10,4 ± 1,3	17,1 ± 2,3	13,4 ± 2,2	1–2
ИЛ-8 (пг/мг белка)	56,7 ± 10,2	73,5 ± 14,5	42,9 ± 9,1	2–3
СРБ (мкг/мг белка)	17,3 ± 3,8	13,5 ± 3,7	27,7 ± 4,9	2–3
МСР-1 (пг/мг белка)	193,5 ± 33,1	272,8 ± 86,1	337,5 ± 61,6	1–3
ТИМП-1 (нг/мгбелка)	73,5 ± 7,5	62,1 ± 17,8	88,68 ± 15,5	—
ММП-3 (нг/мг белка)	2,4 ± 0,3	3,7 ± 1,1	2,1 ± 0,3	2–3
ММП-9 (нг/мг белка)	2,5 ± 0,3	6,4 ± 1,5	4,1 ± 0,7	2–1,3
ММП-1 (пг/мг белка)	183,0 ± 67,2	113,7 ± 36,7	212,8 ± 46,5	2–3
GM-CSF (пг/мг белка)	12,3 ± 5,6	8,4 ± 2,1	25,3 ± 9,7	3–1,2
sGAG (мкг/мг белка)	53,3 ± 8,5	81,6 ± 12,7	73,2 ± 9,3	—
Холестерин (мг/мг белка)	296,0 ± 46,9	910,1 ± 182,2	426,0 ± 162,7	1–2,3 2–3
Гиалуроновая (нг/мг белка)	250,0 ± 51,1	319,4 ± 61,8	223,2 ± 40,6	—
Ca (мкг/г)	1350,53 ± 431,5	2392,34 ± 423,0	2948,67 ± 797,7	1-2,3
Fe (мкг/г)	52,07 ± 18,06	115,04 ± 27,13	20,75 ± 12,7	2-1,3
Br (мкг/г)	0,47 ± 0,11	0,68 ± 0,08	0,67 ± 0,17	1-2,3
Cu (мкг/г)	1,39 ± 0,28	1,23 ± 0,23	1,1 ± 0,27	—
Zn (мкг/г)	1,68 ± 0,58	2,45 ± 0,35	1,84 ± 0,78	—

В исследовании Wang и соавт. (2002) уровень СРБ в крови коррелировал с индексом кальцификации коронарных артерий. В нашем исследовании самый высокий уровень СРБ также обнаружен в очагах с наиболее выраженной кальцификацией, что свидетельствует о нарастании в них нестабильности. Это согласуется с нашими результатами, в которых показана связь уровня СРБ с наличием нестабильных атеросклеротических очагов. Также в очагах с более выраженной кальцификацией выше уровень MCP-1, MMP-1 и GM-CSF.

В очагах с кальцификатами были выше уровни кальция, брома, стронция, железа. Причём наиболее высокий уровень железа был в очагах с мелкими кальцификатами. Нами выявлена тенденция к повышению уровней кальцитонина и остеопротегерина в атеросклеротических бляшках с крупноглыбчатыми кальцификатами. Так как крупные кальцификаты содержались, главным образом, в нестабильных атеросклеротических очагах, то полученные нами данные о повышении остеопротегерина согласуются с результатами исследования Kiechl S. и соавт. (2004).

Исследование Zhang H. и соавт. (2015) показало положительную корреляцию между числом эндотелиальных клеток-предшественников, несущих остеокальцин и кальцификацией коронарных сосудов у пациентов с ИБС. Нами отмечено значимое повышение уровня остеокальцина в атеромах с кальцификатами в – 2,6 раза по сравнению с очагами без кальцификации, причём повышение отмечено в бляшках как с пылевидными, так и с крупными кальцификатами. Также в атеросклеротических очагах с кальцификацией были выше уровни Ca, Bg и Sr ($p < 0,05$), что согласуется с полученными нами данными о повышении уровня Ca и Sr в нестабильных бляшках.

Таким образом, начальный этап формирования кальцификации атеросклеротических очагов характеризуется усилением воспалительных процессов, о чём свидетельствуют повышенные уровни таких биомаркеров как ИЛ-6, ИЛ-8, ФНО- α и ИЛ-1. Концентрация остеокальцина значительно повышена в кальцифицированных бляшках.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что наличие выраженной сосудистой кальцификации можно рассматривать как неспецифический маркер атеросклероза и ИБС, однако отсутствие кальцификации не исключает риска прогрессирования коронарного атеросклероза.

Корреляционный анализ показал выраженные связи исследуемых параметров деструктивных изменений с воспалительными и окислительными изменениями в атеромах (табл. 6).

Таблица 6 – Корреляционные связи (коэффициент Спирмена) параметров воспалительных и деструктивных изменений в атеросклеротических бляшках

Значение	ММП-3	ММП-9	ТИМП-1	ИЛ-8	СРБ	Ок-белки
ММП-7	—	0,310**	0,607**	0,705**	0,330**	—
ММП-3	—	0,498**	—	—	—	—
ИЛ-1-РА	—	-0,458**	0,387**	-0,408*	—	-0,392**
ФНО- α	0,436**	0,198*	-0,179*	-	0,175*	—
ИЛ-6	—	0,352**	0,357*	0,333*	0,379**	—
ИЛ-8	—	0,331**	-0,213**	—	0,425**	-0,263*
ИЛ-18	0,346*	0,354*	0,599**	0,706**	0,425**	—
ХС	—	—	-0,324**	0,345**	—	0,332**
ПОЛ	0,291*	0,305**	-0,378**	—	—	—
СРБ	—	0,232**	0,313**	0,425**	—	—
МСР-1	—	0,348**	0,601**	0,597**	0,399**	—
Примечание: * – ($p < 0,05$); ** – ($p < 0,01$).						

Методом регрессионного и мультивариантного в модели GLM (General Linear Model) анализов оценивалась достоверность взаимосвязей деструктивных изменений с воспалительными и окислительными процессами в атеросклеротических очагах коронарных сосудов (зависимые переменные – биомаркеры деструктивной активности, независимые – воспалительные и окислительные показатели).

Выявлена достоверная зависимость ММП-9 от ИЛ-8 ($B = 0,329$; $p < 0,05$), ИЛ-6 ($B = 0,343$; $p < 0,05$), и ИЛ-18 ($B = 0,372$; $p < 0,05$), что соответствует выявленным особенностям воспалительных и деструктивных изменений в нестабильных атеромах. Показано, что уровень ММП-3 зависит от уровня ФНО- α ($B = 0,517$; $p < 0,001$); уровень ТИМП-1 от уровня ИЛ-1-РА ($B = 0,677$; $p < 0,01$) и

содержания продуктов окисления липидов ($B = -0,251$, $p < 0,01$), а уровень продуктов ПОЛ, в свою очередь – от ФНО- α ($B = 0,355$; $p < 0,05$), что соответствует особенностям воспалительных и деструктивных изменений, которые были выявлены в стабильных бляшках.

Также нами был проведён корреляционный анализ для выявления связей между исследуемыми показателями и маркерами кальциноза в атеросклеротических бляшках (табл. 7). При проведении анализа была выявлена умеренная связь остеопротегерина, остеокальцина и кальцитонина с маркерами воспаления. Выявлены ассоциации маркеров воспаления между собой.

Таблица 7 – Корреляционные связи (коэффициент Спирмена) между маркерами кальцификации и исследуемыми показателями

Значение	Остеопротегерин	Кальцитонин	Остеокальцин	Гиалуроновая кислота
ХС	—	0,474**	0,459**	—
остеокальцин	—	—	—	0,369**
ФНО- α	—	—	—	0,322**
ИЛ-1	—	0,474**	0,305*	0,425**
ИЛ-6	0,302**	—	—	0,413**
ММП-3	—	—	0,398*	0,461**
GM-CSF	—	0,559**	—	—
sGAG	—	0,333**	0,306*	—
Значение	Остеопротегерин	Кальцитонин	Остеокальцин	Гиалуроновая кислота
MCP-1	0,423**	0,348**	—	—
ТИМП-1	0,812**	—	—	—
Примечание: * – ($p < 0,05$); ** – ($p < 0,01$).				

На стадии стабильной бляшки проявления деструктивной активности, такие как повышенное содержание ММП-3 и сниженное ТИМП-1, достоверно зависят от воспалительных и окислительных изменений, определяющими из которых

являются снижение уровня ИЛ-1-РА и резистентности ЛНП к окислению и повышение уровня ФНО- α , ПО, продуктов окисления белков.

В нестабильной бляшке проявления деструктивной активности (повышенные уровни ММП-7, ММП-1 и ММП-9) статистически значимо зависят от воспалительных изменений (повышенные уровни ИЛ-6, ИЛ-8, ПОЛ, МСР-1 и ЕМАР-II). В нестабильной бляшке более выражены процессы кальцификации, проявляющиеся повышением уровней Са и остеокальцина (рис. 7)

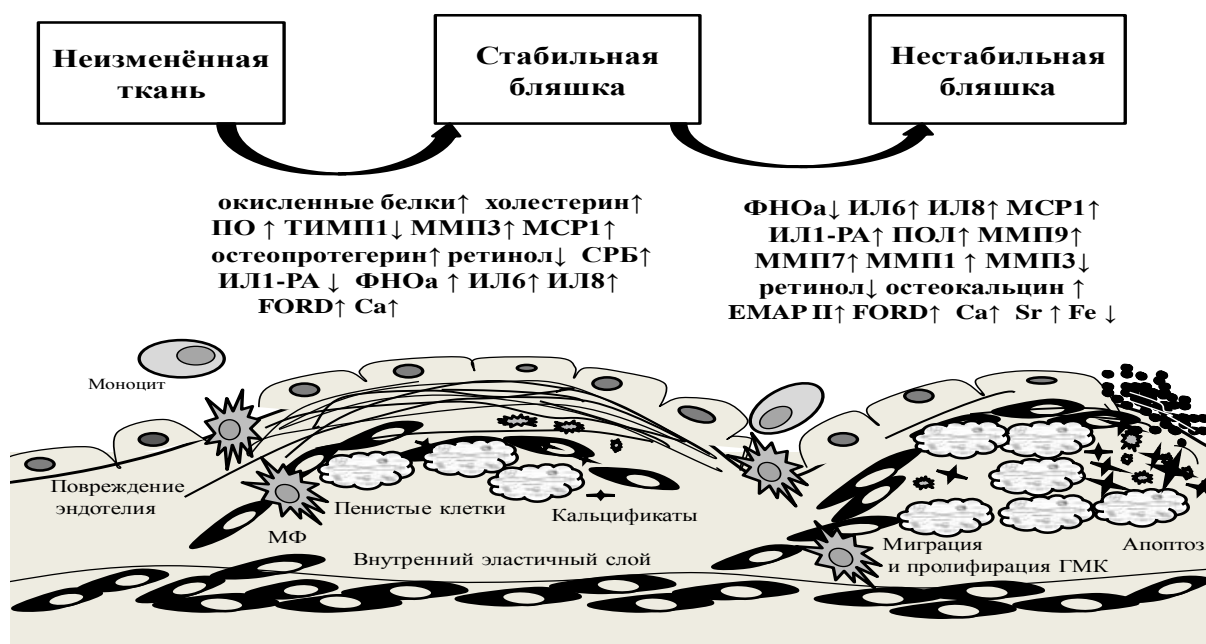


Рисунок 7 – Изменения показателей воспалительной, окислительно-антиоксидантной и деструктивной активности в процессе формирования стабильной и нестабильной бляшки

Ассоциации показателей активности эндотелиально-дисфункциональных, воспалительных, окислительных и деструктивных процессов в нестабильных атеросклеротических очагах с показателями этих процессов в крови

Для понимания патогенетических аспектов атеросклеротического поражения сосудистой стенки, ведущего к формированию нестабильной атеросклеротической бляшки, необходимо рассматривать не только локальные, но и системные процессы. Поэтому крайне актуальными являются исследования, проводимые параллельно в сосудах и в крови.

Из всего изученного спектра воспалительно-деструктивных биомаркеров между показателями в сосудистой стенке и в крови была выявлена значимая корреляционная связь для СРБ ($r = 0,495$; $p < 0,01$), ИЛ-6 ($r = 0,471$; $p < 0,01$), ИЛ-8 ($r = 0,397$; $p < 0,01$), TIMP-1 ($r = -0,248$; $p < 0,05$) и для МСР-1 ($r = 0,375$; $p < 0,05$). Также выявлена связь между уровнями в сосудистой стенке и в крови кальцитонина ($r = -0,310$; $p < 0,05$) и кальция ($r = -0,475$; $p < 0,05$)

Обсуждая полученный результат важно отметить, что СРБ может синтезироваться как гепатоцитами под влиянием ИЛ-6, так и МФ и лимфоцитами в атеросклеротических бляшках [Libby P. et al., 2010; Luc G. et al., 2003]. В настоящем исследовании определить источник повышенного ($> 2,0$ мг/л) уровня СРБ в крови (СРБ из гепатоцитов или СРБ из сосудистой стенки) было сложно. Скорее всего, СРБ поступал и из того и из другого источника, поскольку в нашем исследовании концентрации ИЛ-6 и СРБ коррелировали между собой не только в крови (r Спирмена $0,521$; $p < 0,001$), но и в сосудистой стенке (r Спирмена $0,379$; $p < 0,001$), а также была выявлена связь концентрации СРБ в сосудистой стенке и ИЛ-6 в крови.

Также выявлены корреляционные связи концентрации в крови СРБ с содержанием в сосудистой стенке ММП-3, концентрации в крови ИЛ-8 с содержанием в сосудистой стенке ФНО- α и МСР-1. Концентрация в крови ММП-9 коррелировала с содержанием в сосудистой стенке ИЛ-1-РА, ИЛ-8, СРБ, ЕМАР-II и МСР-1, а концентрация в крови ММП-3 – только с содержанием в сосудистой стенке СРБ.

Для выявления в крови значимых биомаркеров, характерных для наличия нестабильных атеросклеротических бляшек в коронарных артериях были проведены дальнейшие исследования. Пациенты, включённые в исследование, были разделены на 2 группы. Первая – 43 пациента, у которых во фрагментах интима/медиа, согласно данным гистологического исследования, встречались только стабильные бляшки, вторая – 42 пациента, у которых гистологически были выявлены нестабильные бляшки.

Из изученных маркеров воспаления у мужчин с нестабильными бляшками оказались выше концентрации в крови СРБ, ИЛ-6 и ИЛ-8 в сравнении с пациентами первой группы. Содержание СРБ оказалось выше на 30 %, ИЛ-6 – на 29 %, а уровень ИЛ-8 оказался выше в 3,42 раза (рис. 8).

Эти данные согласуются с результатами изучения нами содержания воспалительных цитокинов на разных стадиях развития атеросклеротических

очагов. Именно в нестабильных очагах были выше концентрации ИЛ-6, СРБ и особенно ИЛ-8, и именно для этих показателей были выявлены прямые связи между уровнями в атеросклеротических очагах и в крови.

По другим изучаемым маркерам воспаления значимых отличий выявлено не было.

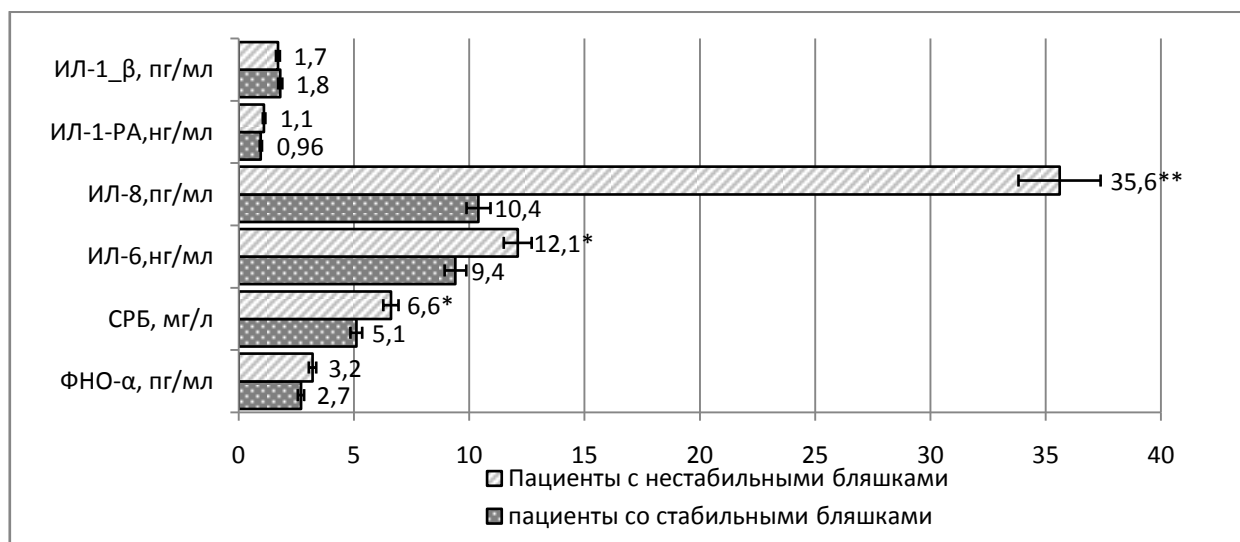


Рисунок 8 – Уровни маркеров воспаления в крови у пациентов с разными типами атером в коронарных сосудах

При исследовании маркеров деструкции (табл.8) была выявлена разница между группами только для ТИМП-1, что также согласуется с полученными нами результатами, так как связей в содержании ММП-3 и ММП-9 между сосудом и кровью выявлено не было. Уровень ТИМП-1, как и ожидалось, был выше у мужчин 1-й группы, что соответствует полученным нами ранее результатам для атеросклеротических очагов; уровень ТИМП-1 был выше в стабильных бляшках по сравнению с нестабильными. Полученные результаты подтверждают связь между ТИМП-1 и ИЛ-8, высокий уровень которого может подавлять проявление активности ТИМП-1 [Newby A.C., 2005; Armstrong E.J. et al., 2006;]. Такая связь была подтверждена нами и в атеросклеротических очагах.

Согласно данным таблицы 8, у пациентов с нестабильными бляшками по сравнению с пациентами первой группы, из исследованных окислительно-антиоксидантных показателей в крови был выше уровень окисленных белков и ниже резистентность ЛНП к окислению. Эти данные согласуются с полученными нами результатами изучения окислительных биомаркеров на разных стадиях развития атеромы и свидетельствуют о значимой роли повышенной

окислительной модификации липидов и протеинов в формировании нестабильности бляшек.

Таблица 8 – Уровни изученных показателей ($M \pm \sigma$) в крови у пациентов с разными типами атером в коронарных сосудах

Показатели (единицы измерения)	1-я группа (стабильные бляшки)	2-я группа (нестабильные бляшки)
ММП-9 (нг/мл)	482,4 ± 56,3	441,2 ± 40,7
ММП-3 (нг/мл)	9,2 ± 0,8	9,4 ± 0,7
ТИМП-1 (нг/мл)	449,6 ± 14,0	405,3 ± 14,9*
sVCAM (нг/мл)	915,1 ± 57,8	750,7 ± 61,5*
МСР-1(пг/мл)	447,5 ± 59,94	619,96 ± 81,67*
Общий ХС (мм/л)	5,4 ± 0,4	5,8 ± 0,5
Уровень МДА через 30 минут окисления (нМ МДА/мг белка ЛНП)	23,3 ± 1,5	30,1 ± 2,0*
Окисленные протеины (Ед/мг белка)	27,5 ± 3,4	46,4 ± 6,2*
ЛП(а) (мг/дл)	8,7 ± 0,5	15,5 ± 1,5*
ТГ (мм/л)	2,0 ± 0,2	2,0 ± 0,3
Активность параоксоназы (нМ/мин/мл)	328,2 ± 25,7	291,1 ± 22,7
Метаболиты NO (нитриты/нитраты) (мкМ/л)	4,5 ± 0,3	3,1 ± 0,3*
Кальцитонин (пг/мл)	1,95 ± 0,16	2,64 ± 0,36*
Са (моль/л)	2,29 ± 0,03	2,41 ± 0,04*
GM-CSF (пг/мл)	1,5 ± 0,39	1,08 ± 0,45
sGAG (мкг/мл)	13,53 ± 2,18	15,92 ± 3,34
FORD (моль/л)	0,64 ± 0,1	0,75 ± 0,08
Примечание:* – ($p < 0,05$).		

Анализ биомаркеров эндотелиальной дисфункции показал, что у мужчин второй группы в сравнении с пациентами первой группы в крови было ниже содержание метаболитов NO (нитратов/нитритов), что указывает на более

выраженные нарушения функций эндотелиоцитов при нестабильном состоянии атероматозных очагов. Содержание в крови sVCAM было выше у мужчин со стабильными бляшками. Важно, что более значимую роль адгезивные молекулы играют на начальных стадиях формирования бляшки, а не на стадии её дестабилизации, это связано с хемотаксисом, адгезией и миграцией моноцитов в субэндотелий [Wang X., Connolly T.M., 2010].

Также в крови у мужчин из второй группы были выше уровни ЛП(а), что согласуется с литературными данными о важном патофизиологическом значении ЛП(а) в развитии ОКС. Содержание кальция и кальцитонина также было выше в крови мужчин с нестабильными бляшками, что соответствует полученным нами данным о повышенном уровне этих биомаркеров именно в нестабильных атероматозных очагах.

Таким образом, у мужчин с нестабильными атеросклеротическими бляшками в коронарных артериях (согласно гистологическим заключениям) в крови было выше содержание Са, кальцитонина, ИЛ-6, ИЛ-8, СРБ, МСР-1, продуктов ПОЛ и ЛП(а), а уровни метаболитов NO, ТИМП-1 и sVCAM ниже, чем у мужчин, в коронарных артериях которых преобладают стабильные бляшки. Восемь из изученных биомаркеров (Са, кальцитонин, СРБ, ИЛ-6, ИЛ-8, МСР-1, ТИМП-1 и уровень продуктов ПОЛ) коррелируют не только с показателями нестабильности атеросклеротических бляшек в коронарных артериях, но и, что особенно важно, с их же содержанием в нестабильных бляшках коронарных артерий, то есть, имеет место корреляция между показателями сосудистой стенки и крови. Полученные нами данные говорят о системном характере воспалительных процессов, ведущих к развитию нестабильного атеросклеротического очага.

Согласно полученным результатам, повышенные уровни ИЛ-6, МСР-1, ИЛ-8, СРБ, Са и кальцитонина, а также сниженная резистентность ЛНП к окислению и уровень ТИМП-1 в крови являются ключевыми биомаркерами нестабильности атеросклеротических бляшек коронарных артерий. Такой вывод можно сделать, в том числе, на основании корреляционных связей между их содержанием в крови и в атеросклеротических бляшках коронарных артерий.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, изучив изменения активности эндотелиально-дисфункциональных; воспалительных; окислительных и деструктивных процессов

на разных этапах развития атеромы мы выявили особенности, характерные для каждой стадии и, прежде всего для нестабильной бляшки.

На начальной стадии формирования атеросклеротического очага окислительно-воспалительный процесс характеризуется повышением уровней ФНО- α , СРБ, ЕМАР-II и окисленных белков. Также, на стадии липидного пятна отмечена ярко выраженная тенденция к снижению уровня ТИМП-1 и повышению ММП-1 и ММП-7.

Характерным для стабильных бляшек являются: повышение уровня ФНО- α , усиленные процессы окисления белков и повышенный уровень параоксоназы, сдерживающей процессы окисления липидов, но не влияющий на максимально выраженное окисление белков. Также для данного типа бляшек характерен повышенный уровень остеопротегерина, который оказывает защитное действие на артерии, предупреждая патологическую кальцификацию и стабилизируя атеросклеротическую бляшку, ингибируя умеренные воспалительные процессы. Проявление деструктивных процессов выражается снижением уровня ТИМП-1 и повышением содержания ММПЗ.

Для нестабильных очагов из изученных воспалительных цитокинов и хемоаттрактантов характерными и доминирующими являются повышенные уровни ИЛ-6, ИЛ-8, СРБ, МСР-1 и ЕМАР-II, из окислительно-антиоксидантных факторов – повышенный уровень ПОЛ и сниженное содержание ретинола, из маркеров деструкции – повышенный уровень ММП-1, ММП-7, ММП-9. В нестабильных атеросклеротических очагах более выражены процессы кальцификации, что проявляется более высоким содержанием кальция и остеокальцина. Также для нестабильных атеросклеротических очагов характерен более высокий уровень стронция и сниженный уровень железа.

На стадии стабильной бляшки проявления деструктивной активности, такие как: повышенное содержание ММП-3 и сниженное ТИМП-1, достоверно зависят от воспалительной и окислительной активности, определяющими показателями которой являются снижение уровня ИЛ-1-РА и резистентности ЛНП к окислению и повышение уровня ФНО- α . В нестабильной бляшке проявления деструктивной активности (повышенные уровни ММП-7, ММП-1 и ММП-9) статистически значимо зависят от воспалительных изменений (повышенные ИЛ-6, ИЛ-8, МСР-1 и ЕМАР-II).

В зависимости от активности процессов, идущих в атеросклеротическом очаге, может сформироваться один из трёх типов нестабильных

атеросклеротических бляшек, для каждого из которых характерны свои особенности.

1. Для нестабильных бляшек липидного типа характерно высокое содержание холестерина, сниженное содержание жирорастворимых антиоксидантов, окислительные изменения, затрагивают прежде всего белковый компонент. Воспалительные процессы характеризуются повышением уровня ИЛ-6, ИЛ-8, МСР-1, СРБ, деструктивные – ММП-7.

2. При воспалительно-эрозивном типе нестабильности выявлены повышенные окислительные изменения и липидного и белкового компонентов, воспалительные процессы характеризуются низким содержанием ИЛ-1-РА и повышенным содержанием СРБ, ИЛ-6, ИЛ-8, МСР-1 и ЕМАР-II. Эти бляшки характеризуются самым низким уровнем кальцификации среди нестабильных бляшек. В бляшках этого типа выявлены самые низкие уровни остеокальцина, кальцитонина и гиалуроновой кислоты.

3. Отличительными особенностями нестабильных бляшек с некрозом/кальцинозом являются выраженные процессы ПОЛ, повышение уровня ФНО- α и снижение уровня ТИМП-1. В бляшках этого типа ярко выражены процессы кальцификации (кальцификаты содержат 88 % атеросклеротических очагов данного типа), а так же выявлены самые высокие уровни кальцитонина и остеокальцина.

Начальный этап формирования кальцификации атеросклеротических очагов – воспалительный процесс, о чём свидетельствуют повышенные уровни таких биомаркеров как ИЛ-6, ИЛ-8, ФНО- α и ИЛ-1. Кальцификация атеросклеротических очагов сопровождается повышением в них уровней кальцитонина и остеопротегерина и значительным повышением остеокальцина.

У мужчин с преобладанием нестабильных атеросклеротических бляшек в коронарных артериях (согласно гистологическим заключениям) уровни в крови СРБ, ИЛ-8, ИЛ-6, продуктов ПОЛ, ЛП(а), Са и кальцитонина выше, а sVCAM, метаболитов NO и ТИМП-1 ниже по сравнению с мужчинами со стабильными бляшками. Са, кальцитонин, ТИМП-1, СРБ, ИЛ-6, ИЛ-8, МСР-1 и уровень продуктов ПОЛ в крови коррелируют не только с показателями нестабильности атеросклеротических бляшек в коронарных артериях, но и, что особенно важно, с их же содержанием в нестабильных бляшках коронарных артерий, то есть имеет место связь между показателями сосудистой стенки и крови. Эти биомаркеры

модификации (прежде всего окислению) и захватываются макрофагами и ГМК, которые в результате превращаются в пенистые клетки. Окисленные ЛНП и цитокины способствуют дальнейшей пролиферации и миграции клеток.

Усиленный синтез ИЛ-1 и ФНО- α способствует увеличению продукции ИЛ-6, ИЛ-8, которые стимулируют секрецию гепатоцитами и макрофагами СРБ, что, в свою очередь, ведёт к дальнейшему увеличению синтеза цитокинов.

Активированный макрофаг синтезирует хемоаттрактанты, которые способствуют дальнейшему проникновению моноцитов в стенку сосуда, также начинается активный синтез ММП, разрушающих компоненты внеклеточного матрикса и ЕМАР-II, вызывающего апоптоз эндотелиальных клеток. Макрофагами и остеобластами вырабатывается GM-CSF, который стимулирует пролиферацию макрофагов, их дифференцировку в пенистые клетки и удлиняет их жизненный цикл. Также GM-CSF стимулирует ангиогенез.

Фибробласты и ГМК, под воздействием цитокинов, начинают активный синтез коллагена и эластина, формируя покрышку атеросклеротической бляшки, этому процессу способствует наличие достаточного количества Fe.

Повышенный уровень кальцитонина задерживает отток ионов Ca^{2+} и стимулирует остеобластоподобные клетки, которые начинают синтезировать остеопротегерин, остеокальцин и основные компоненты межклеточного вещества – коллагены и эластины – в месте формирования атеросклеротического очага. Высокий уровень остеопротегерина может оказывать защитное действие на артерии, предупреждая патологическую кальцификацию и снижая секрецию воспалительных цитокинов макрофагами.

Повышенный синтез остеокальцина, усиливает поступление в атеросклеротический очаг Ca. Увеличение количества Ca и Sr стимулирует процессы окисления, что, в свою очередь, вызывает усиление воспалительного ответа. Также Ca способствует делению фибробластов и снижению секреции ТИМП-1 и повышению секреции ММП-3 и ММП-9, что способствует переходу бляшки в нестабильное состояние.

Таким образом, в ходе инфильтрации МФ и Т-ЛФ покрышки атеросклеротической бляшки в ней увеличивается продукция воспалительных цитокинов, которые ингибируют пролиферацию ГМК и синтез коллагена и индуцирующих протеолитическую активность МФ и апоптоз ГМК. МФ и ГМК в результате синтезируют протеолитические ММП, которые разрушают эластин и коллагены в покрышке бляшки, а это, в свою очередь, приводит к истончению

покрышки, её изъязвлению и, далее – к тромбозу и соответствующим клиническим проявлениям.

ВЫВОДЫ

1. На начальной стадии формирования атеросклеротического очага окислительно-воспалительный процесс характеризуется повышением уровня ФНО- α , СРБ, ЕМАР-II и окисленных белков. Также на стадии липидного пятна отмечена ярко выраженная тенденция к снижению уровня ТИМП-1 и повышению ММП-1 и ММП-7.

2. Характерными для стабильных бляшек являются усиленные процессы окисления белков и повышенный уровень параоксоназы, сдерживающий процессы окисления липидов, но не влияющий на максимально выраженное окисление белков. Воспалительные процессы выражаются резким повышением уровня ФНО- α и постепенным СРБ, ИЛ-6 и ИЛ-8. Также для данного типа бляшек характерен повышенный уровень остеопротегерина, который оказывает защитное действие на артерии, предупреждая патологическую кальцификацию и стабилизируя атеросклеротическую бляшку, ингибируя умеренные воспалительные процессы. Проявление деструктивных процессов выражается снижением уровня ТИМП-1 и повышением содержания ММП-3.

3. Для нестабильных очагов из изученных воспалительных цитокинов и хемоаттрактантов характерными и доминирующими являются повышенные уровни ИЛ-6, ИЛ-8, СРБ, МСР-1 и ЕМАР-II, из окислительно-антиоксидантных факторов – повышенный уровень ПОЛ и сниженное содержание ретинола, из маркеров деструкции – повышенные уровни ММП-1, ММП-7, ММП-9. В нестабильных атеросклеротических очагах более выражены процессы кальцификации, что проявляется более высоким содержанием кальция и остеокальцина. Также для нестабильных атеросклеротических очагов характерен более высокий уровень стронция и сниженный уровень железа.

4. Для каждого типа нестабильных атеросклеротических бляшек характерны свои особенности.

Для бляшек липидного типа характерны высокое содержание холестерина, сниженное содержание жирорастворимых антиоксидантов, окислительные изменения затрагивают, прежде всего, белковый компонент. Воспалительные процессы характеризуются повышением уровней ИЛ-6, ИЛ-8, МСР-1, СРБ, деструктивные – ММП-7.

При воспалительно-эрозивном типе нестабильных бляшек выявлены повышенные окислительные изменения и липидного, и белкового компонентов, воспалительные процессы характеризуются низким содержанием ИЛ-1-РА и повышенным содержанием СРБ, ИЛ-6, ИЛ-8, МСР-1 и ЕМАР-II. Эти бляшки характеризуются самым низким уровнем кальцификации среди нестабильных бляшек. В бляшках этого типа выявлены самые низкие уровни остеокальцина, кальцитонина и гиалуроновой кислоты.

Отличительными особенностями бляшек с некрозом/кальцинозом являются выраженные процессы окисления липидов, повышенное содержание ФНО- α и сниженное ТИМП-1. В бляшках этого типа ярко выражены процессы кальцификации – кальцификаты содержали 88 % атеросклеротических очагов данного типа, также здесь выявлены самые высокие уровни кальцитонина и остеокальцина.

5. Начальный этап формирования кальцификации атеросклеротических очагов характеризуется усилением воспалительных процессов, о чем свидетельствуют повышение уровней ИЛ-6, ИЛ-8, ФНО- α и ИЛ-1 β . Увеличение степени кальцификации атеросклеротических очагов сопровождается повышением содержания кальцитонина и остеокальцина и изменением элементного состава бляшки.

6. На стадии стабильной бляшки проявления деструктивной активности, такие как повышенное содержание ММП-3 и сниженное ТИМП-1, достоверно зависят от воспалительных и окислительных изменений, определяющими из которых являются снижение уровня ИЛ-1-РА и резистентности ЛНП к окислению и повышение уровня ФНО- α . В нестабильной бляшке проявления деструктивной активности: повышенные уровни ММП-7, ММП-1 и ММП-9, статистически значимо зависят от воспалительных изменений: повышенные ИЛ-6, ИЛ-8, МСР-1 и ЕМАР-II.

7. У пациентов с нестабильными атероматами в коронарных артериях в крови уровни СРБ, ИЛ-8, ИЛ-6, ЛП(а), кальцитонина и Са выше, а sVCAM, метаболитов NO и ТИМП-1 ниже по сравнению с мужчинами с преобладанием стабильных бляшек.

8. В крови и в сосудистой стенке из всего изученного спектра эндотелиально-дисфункциональных, воспалительных, окислительных и деструктивных биомаркеров выявлены достоверные связи между такими

показателями как СРБ, ИЛ-6, ИЛ-8, МСР-1, кальцитонин, ТИМП-1, Са и продукты ПОЛ, что свидетельствует о значимости этих биомаркеров в определении вероятности наличия нестабильных атеросклеротических бляшек в коронарных артериях.

СПИСОК ОСНОВНЫХ ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

- 1 Рагино Ю. И., Баум В. А., **Полонская Я. В.**, Воевода М. И., Никитин Ю. П. Атеросклероз и окислительные процессы. Новые способы оценки окислительной модификации белков // Сибирский научный медицинский журнал. – 2006. – № 4. – С. 67–74.
- 2 Рагино Ю. И., **Полонская Я. В.**, Садовский Е. В. Способ определения окислительной модификации апопротеинов в липопротеинах низкой плотности // Клиническая лабораторная диагностика. – 2007. – 6. – С. 13–17.
- 3 Рагино Ю. И., Чернявский А. М., **Полонская Я. В.**, Волков А. М., Семаева Е. В., Воевода М. И. Активность воспалительно-деструктивных изменений в процессе формирования нестабильной атеросклеротической бляшки // Кардиология. – 2007. – № 9. – С. 62–67.
- 4 Рагино Ю. И., Чернявский А. М., **Полонская Я. В.**, Волков А. М., Семаева Е. В., Воевода М. И. Окислительно-антиоксидантные изменения при формировании нестабильной атеросклеротической бляшки // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2007. – № 11. – С. 500–503.
- 5 Рагино Ю. И., **Полонская Я. В.**, Семаева Е. В., Каштанова Е. В., Куликов И. В., Чернявский А. М., Воевода М. И. Атерогенные окислительная и структурная модификации липопротеинов низкой плотности у мужчин с коронарным атеросклерозом // Кардиология. – 2007. – № 11. – С. 14–19.
- 6 Рагино Ю. И., Баум В. А., **Полонская Я. В.**, Садовский Е. В., Баум С. Р., Никитин Ю. П. Взаимосвязь окисленного фибриногена с нарушениями гемостаза и функции эндотелия при инфаркте миокарда // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2008. – № 4. – С. 389–392.
- 7 **Полонская Я. В.**, Рагино Ю. И., Чернявский А. М., Волков А. М., Цымбал С. Ю., Семаева Е. В., Воевода М. И. Изменения окислительной и антиоксидантной активности в процессе стадийного развития атеросклеротической бляшки // Региональное кровообращение и микроциркуляция. – 2008. – № 2. – С. 48–50.
- 8 Рагино Ю. И., Чернявский А. М., Тихонов А. В., Цымбал С. Ю., **Полонская Я. В.**, Семаева Е. В., Иванова М. В., Воевода М. И. Уровни липидных и нелипидных биомаркеров в крови у мужчин с коронарным атеросклерозом в Новосибирске // Российский кардиологический журнал. – 2009. – № 2. – С. 31–36.

- 9 Рагино Ю. И., Чернявский А. М., **Полонская Я. В.**, Волков А. М., Семаева Е. В., Цымбал С. Ю., Воевода М. И. Изменение содержания провоспалительных цитокинов и деструктивных металлопротеиназ в процессе развития атеросклеротического очага до нестабильной бляшки // Кардиология. – 2009. – № 6. – С. 43–50.
- 10 Рагино Ю. И., Чернявский А. М., Тихонов А. В., Цымбал С. Ю., **Полонская Я. В.**, Семаева Е. В., Иванова М. В., Воевода М. И. Уровни липидных и нелипидных биомаркеров в крови у мужчин с коронарным атеросклерозом в Новосибирске // Российский кардиологический журнал. – 2009. – № 2. – С. 31–36.
- 11 Рагино Ю. И., Баум В. А., **Полонская Я. В.**, Баум С. Р., Никитин Ю. П. Окисленный фибриноген и его связь с нарушениями гемостаза и функции эндотелия при ишемической болезни сердца и инфаркте миокарда // Кардиология. – 2009. – № 9. – С. 4–8.
- 12 Рагино Ю. И., Чернявский А. М., **Полонская Я. В.**, Цымбал С. Ю., Редькин Д. А., Семаева Е. В., Каштанова Е. В., Воевода М. И. Уровни воспалительных и деструктивных биомаркеров в крови при коронарном атеросклерозе разной степени выраженности // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2010. – № 5. – С. 520–524.
- 13 Рагино Ю. И., Чернявский А. М., **Полонская Я. В.**, Волков А. М., Каштанова Е. В. Содержание провоспалительных цитокинов, хемоаттрактантов и деструктивных металлопротеиназ в разных типах нестабильных атеросклеротических бляшек // Атеросклероз и дислипидемии. – 2011. – № 1. – С. 23–28.
- 14 **Полонская Я. В.**, Чернявский А. М., Волков А. М., Каштанова Е. В., Цымбал С. Ю., Рагино Ю. И. Корреляции биомаркеров воспаления и деструкции в крови и в сосудистой стенке у мужчин с коронарным атеросклерозом // Сибирский научный медицинский журнал. – 2011. – № 5. – С. 25–31.
- 15 Рагино Ю. И., Чернявский А. М., Еременко Н. В., Шахтшнейдер Е. В., **Полонская Я. В.**, Цымбал С. Ю., Иванова М. В., Воевода М. И. Ключевые лабораторно-диагностические биомаркеры коронарного атеросклероза // Кардиология. – 2011. – №3. – С. 42–46.
- 16 Рагино Ю. И., Куимов А. Д., **Полонская Я. В.**, Каштанова Е. В., Ложкина Н. Г., Балабушевич Т. А., Еременко Н. В., Негмаджонов У. Н. Динамика изменений воспалительно-окислительных биомаркеров в крови при остром коронарном синдроме // Кардиология. – 2012. – № 2. – С. 18–23.
- 17 Рагино Ю. И., Чернявский А. М., **Полонская Я. В.**, Волков А. М., Каштанова Е. В., Цымбал С. Ю., Половникова Е. М. Воспалительно-деструктивные биомаркеры нестабильности атеросклеротических бляшек:

- исследования сосудистой стенки и крови // Кардиология. – 2012. – № 5. – С. 37–41.
- 18 Рагино Ю. И., Садовский Е. В., Кривчун А. С., Баум В. А., **Полонская Я. В.** Окислительная модификация липидов и протеинов при осложнении коронарного атеросклероза // Атеросклероз и дислипидемии. – 2012. – № 2. – С. 27–31.
- 19 Рагино Ю. И., Чернявский А. М., **Полонская Я. В.**, Волков А. М., Каштанова Е. В. Активность воспалительного процесса в разных типах нестабильных атеросклеротических бляшек // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2012. – № 2. – С. 150–154.
- 20 Рагино Ю. И., Чернявский А. М., **Полонская Я. В.**, Волков А. М., Каштанова Е. В., Тихонов А. В., Цымбал С. Ю. Окислительные и эндотелиально-дисфункциональные биомаркеры нестабильности атеросклеротических бляшек. Исследования сосудистой стенки и крови // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2012. – № 3. – С. 308–312.
- 21 Рагино Ю. И., Чернявский А. М., Цымбал С. Ю., Щербакова Л. В., **Полонская Я. В.**, Каштанова Е. В. Связь уровней воспалительно-деструктивных биомаркеров в крови при коронарном атеросклерозе с отдаленными результатами хирургической реваскуляризации миокарда // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2013. – № 3. – С. 289–292.
- 22 **Полонская Я. В.**, Каштанова Е. В., Мурашев И. С., Кургузов А. В., Волков А. М., Каменская О. В., Чернявский А. М., Рагино Ю. И. Взаимосвязь основных показателей кальциевого и липидного обмена с атеросклерозом коронарных артерий // Атеросклероз и дислипидемии. – 2015. – № 1. – С. 24–30.
- 23 Каштанова Е. В., **Полонская Я. В.**, Кургузов А. В., Каменская О. В., Рагино Ю. И., Чернявский А. М. Воспалительные биомаркеры коронарного атеросклероза // Молекулярная медицина. – 2015. – № 5. – С. 62–64.
- 24 **Полонская Я. В.**, Каштанова Е. В., Стахнева Е. М., Кургузов А. В., Каменская О. В., Рагино Ю. И., Чернявский А. М. Связь гормонов жировой ткани с липидным и углеводным обменом у мужчин с коронарным атеросклерозом // Атеросклероз и дислипидемии. – 2015. – № 4. – С. 46–53.
- 25 Каштанова Е. В., Чернявский А. М., **Полонская Я. В.**, Стахнёва Е. М., Кургузов А. В., Мурашов И. С., Каменская О. В., Рагино Ю. И. Исследование комплекса биомаркеров в крови у мужчин с коронарным атеросклерозом // Российский кардиологический журнал. – 2016. – № 2. – С. 60–64.
- 26 **Полонская Я. В.**, Каштанова Е. В., Стахнева Е. М., Мурашов И. С., Волков А. М., Чернявский А. М., Рагино Ю. И. Влияние остеокальцина, остеопротегерина и кальцитонина на нестабильность атеросклеротического

- очага в сосудистой стенке у мужчин с коронарным атеросклерозом // Российский кардиологический журнал. – 2016. – № 4, прил. 1. – С. 68.
- 27 Стахнева Е. М., Каштанова Е. В., **Полонская Я. В.**, Каменская О. В., Садовский Е. В., Кургузов А. В., Чернявский А. М., Рагино Ю. И. Оценка окислительного стресса и степени антиоксидантной способности у пациентов с коронарным атеросклерозом // Молекулярная медицина. – 2016. – № 2. – С. 56–59.
- 28 Zhuravskaya E. Ya., Savchenko T. I., Chankina O. V., **Polonskaya Ya. V.**, Chernyavskii A. M., Ragino Yu. I., Shchrbakova L. V. SRXRF study of chemical elements content in the atherosclerotic plaque of heart vessels // Physics Procedia. – 2016. – Vol. 84. – P. 270–274.
- 29 **Полонская Я. В.**, Каштанова Е. В., Мурашов И. С., Волков А. М., Кургузов А. В., Чернявский А. М., Рагино Ю. И. Биохимические маркеры метаболизма костной ткани и их влияние на нестабильность атеросклеротических очагов в сосудистой стенке // Российский кардиологический журнал. – 2016. – № 11. – С. 66–69.
- 30 **Полонская Я. В.**, Каштанова Е. В., Мурашов И. С., Волков А. М., Кургузов А. В., Чернявский А. М., Рагино Ю. И. Ассоциации остеокальцина, остеопротегерина и кальцитонина с воспалительными биомаркерами в атеросклеротических бляшках коронарных артерий // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2016. – № 12. – С. 691–694.
- 31 Яковина И. Н., Баннова Н. А., Каштанова Е. В., **Полонская Я. В.**, Рагино Ю. И. Новые методы и модели оценки риска развития ишемической болезни сердца // Анализ риска здоровью. – 2017. – № 3. – С. 40–47.
- 32 Мурашов И. С., Волков А. М., Кливер Е. Э., Казанская Г. М., Савченко С. В., **Полонская Я. В.**, Каштанова Е. В., Чернявский А. М. Иммуногистохимическая оценка процесса формирования нестабильной атеросклеротической бляшки // Вестник судебной медицины. – 2017. – № 2. – С. 36–40.
- 33 Каштанова Е. В., **Полонская Я. В.**, Яковина И. Н., Баннова Н. А., Рагино Ю. И. Разработка калькулятора для лабораторной диагностики риска развития коронарного атеросклероза // Атеросклероз и дислипидемия. – 2017. – № 4. – С. 62–68.
- 34 **Полонская Я. В.**, Рагино Ю. И. Металлопротеиназы и атеросклероз // Атеросклероз. – 2017. – № 3. – С. 50–55.
- 35 **Полонская Я. В.**, Шрамко В. С., Морозов С. В., Черняк Е. И., Чернявский А. М., Рагино Ю. И. Баланс жирных кислот и их ассоциации с показателями липидного обмена и маркерами воспаления у мужчин с коронарным атеросклерозом // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2017. – № 7. – С. 42–45.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АКМ	активные кислородные метаболиты
ГАГ	гликозаминогликаны
ГМК	гладкомышечные клетки
ГХС	гиперхолестеринемия
ИЛ	интерлейкин
ИЛ-1-РА	рецепторный антагонист интерлейкина-1
ИМ	инфаркт миокарда
ИФА	иммуноферментный анализ
КА	коронарный атеросклероз
ЛВП	липопротеины высокой плотности
ЛНП	липопротеины низкой плотности
ЛП(а)	липопротеин (а)
ЛФ	лимфоциты
МДА	малоновый диальдегид
ММП	металлопротеиназа
МФ	макрофаги
ОКС	острый коронарный синдром
ПО	параоксоназа
ПОЛ	перекисное окисление липидов
СРБ	С-реактивный белок
ТИМП	тканевой ингибитор металлопротеиназ
Т-ЛФ	Т-лимфоциты
ФНО- α	фактор некроза опухоли альфа
ХС	холестерин
ЭХС	эстерифицированный холестерин
EMAP-II	эндотелиально-моноцитарный активирующий пептид
FORD	общая антиоксидантная активность
GM-CSF	гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор
MCP-1	моноцитарно-хемоаттрактантный протеин
NO	оксид азота
sICAM-1	растворимый фактор межклеточной адгезии
sVCAM-1	эндотелиоцитарные молекулы адгезии I типа
sGAG	сульфатированный гликозаминогликан

Polonskaya Yana Vladimirovna

**PATHOGENETIC REGULARITIES OF FORMATION OF UNSTABLE
ATHEROSCLEROTIC PLAQUES**

The aim of the investigation was to study the regularities characterizing the activity of inflammatory, oxidative, endothelial-dysfunctional and destructive processes, as well as calcification processes at different stages of atherosclerotic plaques in coronary arteries and to identify the most significant ones in the formation of unstable atherosclerotic plaque.

At the initial stage of the atherosclerotic plaque formation, the oxidative-inflammatory process is characterized by increasing of the level of TNF- α , CRP, EMAP-II and oxidized proteins, and decreasing of the level of TIMP-1, increasing of MMR-1 and MMR-7.

Stable plaques are characterized by active processes of protein oxidation, elevated levels of paraoxonase, significant increasing of levels of TNF- α and the gradual increasing of CRP, IL-6 and IL-8, elevated levels of osteoprotegerin and MMP-3, and reduced level of TIMP-1.

Unstable plaque are characterized by elevated levels of IL-6, IL-8, CRP, MMP-1, MMP-7, MMP-9, MCP-1, EMAR-II, lipid peroxidation (LPO) level, calcitonin, Ca, Sr and reduced levels of retinol and Fe, calcification processes are more pronounced.

In depending on the activity of the processes in the atherosclerotic plaque, one of three types of unstable atherosclerotic plaques can be formed, each of which has its own characteristics.

The processes of inflammation, destruction and calcification are linked.

In the blood and in the vascular wall there were found significant associations between indicators such as: CRP, IL-6, IL-8, MCP-1, calcitonin, TMP-1, Ca and LPO products, which indicates the importance of these biomarkers in determining the probability of unstable atherosclerotic plaques in the coronary arteries.