

МАРКЕРЫ АПОПТОЗА, ПРОЛИФЕРАЦИИ КЛЕТОК, ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ ПРИ АТЕРОСКЛЕРОЗЕ АРТЕРИЙ НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ

Калинин Р.Е., Сучков И.А.*, Климентова Э.А., Пшенников А.С., Егоров А.А.

ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова», Рязань

DOI: 10.25881/BPNMSC.2021.26.94.005

Резюме. Цель: определение показателей Bcl2 и Bax, тромбоцитарного фактора роста BB (PDGF BB), метаболитов оксида азота (NO) при различных стадиях атеросклероза периферических артерий нижних конечностей.

Материалы и методы: в исследование вошли 60 пациентов со IIБ–IV стадией заболевания. Все пациенты были разделены на 3 равные группы. В группу А вошли пациенты со IIБ стадией заболевания, в группу В — со III стадией, в группу С — со IV стадией. Для определения референтных значений в исследовании были включены 20 здоровых добровольцев. У пациентов при включении в исследование мы оценивали уровни белков апоптоза (Bcl2 и Bax), маркеров дисфункции эндотелия метаболиты оксида азота (NO), пролиферации клеток (PDGF BB) в сыворотке крови методом ИФА.

Результаты: у пациентов группы А значения Bcl2 (6,5 нг/мл), Bax (13,5 нг/мл), NO (298 мкм/мл), PDGF BB (10,1 нг/мл) были сопоставимы со значениями здоровых добровольцев (5,3 нг/мл, 13,1 нг/мл, 339 мкм/мл, 8,5 нг/мл, соответственно). У пациентов группы В и С уровень белка Bcl2 (4,1, 5,0 нг/мл, соответственно), метаболитов NO (278, 202 мкм/мл) был снижен, а уровень белка Bax (22,8, 26,4 нг/мл), PDGF BB (10,3, 29,1 нг/мл) был повышен по сравнению со значениями здоровых добровольцев. У пациентов группы С был статистически значимо повышен уровень PDGF BB ($p = 0,001$), Bax ($p = 0,004$) при сниженном уровне NO по сравнению со значениями у пациентов группы А.

Заключение: У пациентов с атеросклерозом периферических артерий нижних конечностей с увеличением стадии заболевания происходит повышение уровня проапоптотического белка Bax и тромбоцитарного фактора роста BB на фоне снижения уровня метаболитов оксида азота.

Ключевые слова: белок Bcl2, белок Bax, PDGF BB, метаболиты NO.

Список сокращений: ОААНК — облитерирующий атеросклероз артерий нижних конечностей, PDGF BB — тромбоцитарный фактор роста BB, NO — метаболиты оксида азота.

Ведение

Атеросклероз является многофакторным заболеванием со сложным патогенезом, который до конца еще не изучен [1]. Система апоптоза представляет собой запрограммированную гибель клеток, которая лежит в основе развития, а также прогрессирования атеросклероза [2]. Гибель клеток при атеросклеротическом поражении запускается цитокинами через межклеточные контакты, а также окисленными липопротеидами. Апоптоз эндотелиальных клеток, макрофагов, ГМК способствует ремоделированию стенки сосуда, повышению прокоагулянтного статуса, развитию воспаления, которые сопровождают ее повреждение и изменения характера кровотока [3]. Одним из ключевых участников системы апоптоза являются белки

MARKERS OF APOPTOSIS, CELL PROLIFERATION, ENDOTHELIAL DYSFUNCTION IN PATIENTS WITH PERIPHERAL ATHEROSCLEROSIS

Kalinin R.E., Suchkov I.A.*, Klimentova E.A., Pshennikov A.S., Egorov A.A.

Ryazan State Medical University named after academician I.P. Pavlov, Ryazan

Abstract. Purpose: to determine the parameters of Bcl2 and Bax proteins, platelet growth factor BB (PDGF BB), nitric oxide (NO) metabolites in patients with peripheral atherosclerosis (PAD).

Materials and methods: The study included 60 patients with stage IIB–IV disease. All patients were divided into 3 groups. Group A included 20 patients with stage IIB disease, group B included 20 patients with stage III, and group C included 20 patients with stage IV. To determine the reference values, 20 healthy volunteers were included in the study. At inclusion in the study, we assessed the level of apoptosis proteins Bcl2 and Bax, endothelial dysfunction markers (NO), cell proliferation markers (PDGF BB) in blood serum by ELISA.

Results: In group A the values of Bcl2 (6.5 ng/ml), Bax (13.5 ng/ml), NO (298 μ M/ml), PDGF BB (10.1 ng/ml) were comparable with the values of healthy volunteers (5.3 ng/ml, 13.1 ng/ml, 339 μ M/ml, 8.5 ng/ml respectively). In group B and C patients, the level of Bcl2 protein (4.1, 5.0 ng/ml, respectively), NO metabolites (278, 202 μ M/ml) was reduced, while the level of Bax protein (22.8, 26.4 ng/ml), PDGF BB (10.3, 29.1 ng/ml) was increased compared to the values of healthy volunteers. In patients of group C, the level of PDGF BB ($p = 0,001$), Bax ($p = 0,004$) was statistically significantly increased with a reduced level of NO compared with the values in patients of group A.

Conclusions: In patients with peripheral arterial disease with an increase in the stage of the disease, an increase in the level of proapoptotic protein Bax and platelet growth factor BB occurs against the background of a decrease in the level of nitric oxide metabolites.

Keywords: protein Bcl2, protein Bax, PDGF BB, NO metabolites.

семейства Bcl2. Оно включает в себя как ингибиторы (Bcl2 и др.), так и активаторы (Bcl-xS и др.) запрограммированной клеточной гибели. Соотношение между данными маркерами является определяющим в дальнейшей судьбе клетки [4].

Дисбаланс между пролиферацией и апоптозом клеток является ключевым фактором возникновения и прогрессирования атеросклероза. Одним из главных факторов, способствующих пролиферации клеток сосудистой стенки, является тромбоцитарный фактор роста BB (PDGF BB). Его повышенная экспрессия была обнаружена почти во всех типах клеток атеросклеротически измененной артериальной стенки. Выделено четыре лиганда тромбоцитарного фактора роста: PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C, PDGF-D и два рецептора: PDGFR- α и PDGFR- β [5]. PDGF-B обладает более сильным пролиферативным и митогенным эффектами по сравнению с другими лигандами [6]. В ряде работ была показана взаимосвязь между высокой экспрессией PDGF BB в артериях нижних конечностей и тяжестью ОААНК [7].

* e-mail: suchkov_med@mail.ru

В настоящее время многочисленные работы направлены на изучение дисфункции эндотелия с позиций выработки NO, в то время как его взаимосвязь с показателями митохондриального пути апоптоза и пролиферации клеток остается до конца не исследованной у пациентов с атеросклерозом артерий нижних конечностей [8].

Цель исследования: определение показателей Bcl2 и Bax, PDGF BB, NO при различных стадиях ОААНК.

Материалы и методы

Исследование было выполнено в соответствии со стандартами надлежащей клинической практики GCP (Good Clinical Practice) и принципами Хельсинской Декларации. Протокол исследования одобрен локальным этическим комитетом.

В проспективное, открытое исследование было включено 60 пациентов с ОААНК IIБ–IV стадией заболевания, которые проходили лечение в отделении сосудистой хирургии «Областной клинической больницы» г. Рязань. Средний возраст пациентов составил $64,3 \pm 6,5$ лет. Количество мужчин — 34 (57 %). Для определения референтных значений в исследование были включены 20 здоровых добровольцев, у которых отсутствовали признаки атеросклеротического поражения. Средний возраст составил $65,4 \pm 7,3$ лет, количество мужчин — 10 (50%). Критерии включения в исследование: мужчины или женщины старше 40 лет; наличие заболевания периферических артерий атеросклеротического генеза. Критерии исключения: оперативное лечение на магистральных артериях нижних конечностей в анамнезе, декомпенсированная соматическая патология, сахарный диабет, активный рак или период ремиссии менее 5 лет. Все пациенты получали традиционную консервативную терапию, согласно «Национальным рекомендациям по ведению пациентов с заболеваниями артерий нижних конечностей» [10].

Пациенты были разделены на три равные группы. В группу А вошли пациенты со IIБ стадией, в группу В — III стадией, в группу С — IV стадией заболевания. Все некротические изменения у пациентов с IV стадией заболевания представлены сухими некрозами без перифокального поражения, глубина некроза по Wagner 0–1 степени [9]. Давность заболевания у пациентов составляла от 6 до 12 месяцев. Группы были сопоставимы по возрасту и гендерному составу.

Характеристика пациентов различных групп представлена в таблице 1.

Исходно у всех пациентов получено информированное согласие. В образцах периферической венозной крови проанализировали 2 маркера апоптоза: проапоптотический белок Bax и антиапоптотический белок Bcl2, пролиферации клеток — PDGF BB, дисфункции эндотелия — NO.

В сыворотке крови количество белков Bcl2 (Human Bcl-2 ELISA Kit, «ThermoFisherScientific», Китай) и Bax (Enzyme — Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Kit For

Табл. 1. Клиническая характеристика пациентов

Исходная анатомо-ангиографическая характеристика пациентов			
Показатель, единицы измерения	Группа А	Группа В	Группа С
Аорто-подвздошный сегмент, n(%)	10 (50%)	13 (65%)	11 (55%)
Бедренно-подколенный сегмент, n(%)	10 (50%)	7 (35%)	9 (45%)
Сопутствующие заболевания			
Ишемическая болезнь сердца, n(%)	10 (50%)	9 (45%)	11 (55%)
Постинфарктный кардиосклероз, n(%)	5 (25%)	4 (20%)	5 (25%)
Перенесенный ишемический инсульт в каротидном бассейне, n(%)	3 (15%)	5 (25%)	2 (10%)

Bcl2 Associated X Protein (Bax) «Cloud — CloneCorp», Китай), PDGF BB (Human PDGF-BB ELISA, Китай) определяли методом ИФА коммерческими наборами. Определение метаболитов NO в сыворотке крови проводилось фотоколориметрическим методом с помощью иммуноферментного анализатора StatFax 3200 («AwarenessTecholog, Inc.»).

Статистический анализ данных проводился с использованием пакета статистических программ STATISTICA 10,0. В связи с отклонением от нормального распределения данных (использовался критерий Шапиро-Уилка, $p > 0,05$) для дальнейшего анализа применялись непараметрические тесты: для сравнения двух независимых групп — U-критерий Манна-Уитни, в качестве корреляционного использовался тест Спирмена, при дисперсионном анализе применялся критерий Краскела-Уоллиса. Равенство дисперсий определялось по критерию Левина. Апостериорные сравнения в группах производились с использованием критерия Манна-Уитни с поправкой Бонферрони. Общий принятый уровень статистической значимости — $p < 0,05$.

Результаты

У пациентов группы А (IIБ стадия заболевания) исследуемые показатели Bcl2 ($p = 0,554$), Bax ($p = 1,0$), NO ($p = 0,276$), PDGF BB ($p = 0,278$) статистически значимо не отличались по сравнению со значениями здоровых добровольцев (табл. 2).

Табл. 2. Показатели Bcl2, Bax, тромбоцитарный фактор роста BB, метаболиты оксида азота у пациентов группы А

Стадия заболевания	Показатели	Bcl 2 (нг/мл)	Bax (нг/мл)	NO (мкм/мл)	PDGF BB (нг/мл)
Здоровые добровольцы	Медиана	5,3	13,1	339	8,5
	Нижняя и верхняя квартиль	[5,0; 5,8]	[12,5; 14,1]	[329; 350]	[7,5; 9,4]
Группа А	Медиана	6,5	13,5	298	10,1
	Нижняя и верхняя квартиль	[4,3; 9,4]	[10,3; 15,3]	[266; 346]	[8,7; 10,6]
p		0,554	1,0	0,276	0,278

Примечание: * — статистически значимые изменения, PDGF BB — тромбоцитарный фактор роста BB, NO — метаболиты оксида азота.

Табл. 3. Показатели Bcl2, Вах, тромбоцитарный фактор роста BB, метаболиты оксида азота у пациентов группы В

Стадия заболевания	Показатели	Bcl 2 (нг/мл)	Вах (нг/мл)	NO (мкм/мл)	PDGF BB (нг/мл)
Здоровые добровольцы	Медиана	5,3	13,1	339	8,5
	Нижняя и верхняя квартиль	[5,0 ;5,8]	[12,5; 14,1]	[329; 350]	[7,5; 9,4]
Группа В	Медиана	4,1	22,8	278	10,3
	Нижняя – квартиль	[2,1; 5,6]	[15,3; 28,8]	[91,4; 403]	[4,2; 17,1]
p		0,155	0,008*	0,299	0,677

Примечание: * — статистически значимые изменения, PDGF BB — тромбоцитарный фактор роста BB, NO — метаболиты оксида азота.

Табл. 4. Показатели Bcl2, Вах, тромбоцитарный фактор роста BB, метаболиты оксида азота у пациентов группы С

Стадия заболевания	Показатели	Bcl 2 (нг/мл)	Вах (нг/мл)	NO (мкм/мл)	PDGF BB (нг/мл)
Здоровые добровольцы	Медиана	5,3	13,1	339	8,5
	Нижняя и верхняя квартиль	[5,0; 5,8]	[12,5; 14,1]	[329; 350]	[7,5; 9,4]
Группа С	Медиана	5,0	26,4	202	29,1
	Нижняя и верхняя квартиль	[1,2; 6,3]	[14,4; 31,4]	[119; 272]	[12,4; 53,1]
p		0,576	0,007*	0,02	0,005*

Примечание: * — статистически значимые изменения, PDGF BB — тромбоцитарный фактор роста BB, NO — метаболиты оксида азота.

У пациентов группы В (III стадия заболевания) уровень PDGF BB и Вах был повышен при сниженном уровне NO и Bcl2 по сравнению со значениями здоровых добровольцев, но статистически значимая разница была получена только для белка Вах ($p = 0,008$, табл. 3).

У пациентов группы С (IV стадия заболевания) также прослеживалась тенденция к увеличению значений показателей PDGF BB ($p = 0,005$) и Вах ($p = 0,007$) при дальнейшем снижении значения показателей NO по сравнению со значениями здоровых добровольцев (табл. 4).

При сравнении исследуемых показателей между группами А и В статистически значимая разница было получена только по показателю Вах ($p = 0,004$), а между группами В и С только по PDGF BB ($p < 0,001$).

При сравнении показателей между группами А и С получены различия по показателям: PDGF BB ($p = 0,001$), Вах ($p = 0,004$).

Корреляционного анализа показал прямую взаимосвязь между показателями PDGF BB и Bcl2 ($r = +0,394$) у пациентов группы В.

У пациентов групп С выявлена обратная корреляционная взаимосвязь между показателями PDGF BB и NO ($r = -0,491$) и между Bcl2 и Вах ($r = -0,517$).

Обсуждение

Система апоптоза активно принимает участие в развитии и прогрессировании атеросклероза. В ходе нашего исследования мы показали, что активность системы апоптоза клеток также тесно связана со стадией развития заболевания. Так, при IIБ стадии заболевания значения двух белков апоптоза были сопоставимы со значениями здоровых добровольцев. При дальнейшем повышении стадии заболевания происходит повышение уровня проапоптотического белка Вах, что свидетельствует об активации системы апоптоза при прогрессировании заболевания. Это согласуется с зарубежными исследованиями, которые показали, что при адаптивном утолщении интимы и образовании жировых полос определяется незначительная экспрессия белков Bcl2 и Вах в сосудистой стенке. В прогрессирующих поражениях были выявлены очаги апоптоза, которые связаны с участками инфильтрации макрофагами и характеризовались серьезной потерей ГМК стенки артерии, что может привести к дестабилизации атеросклеротической бляшки [11].

В нашем исследовании показатель PDGF BB возрастал при увеличении стадии заболевания, что может быть обусловлено его функцией управления пролиферации клеток сосудистой стенки. Кроме того, PDGF повышает активность ядерного фактора-кВ (NF-кВ), который является ключевым регулятором атеросклероза [12]. Zhang Y, et al. (2015) показал, что высокие уровни экспрессии PDGF-A и PDGF-B присутствуют в атеросклеротических бляшках у пациентов с ОААНК [13].

Повышенная концентрация NO у пациентов со IIБ стадии заболевания говорят о высоком функциональном резерве эндотелия сосудов на ранних стадиях заболевания атеросклероза с последующим его истощением [14].

Выявленные корреляционные связи между Bcl2 и PDGF BB можно объяснить тем, что Bcl2 ингибирует гибель клеток, тем самым увеличивая количество клеток, которые подвергнутся пролиферации под воздействием PDGF BB. Полученная нами обратная взаимосвязь между NO и PDGF BB отражает функцию NO ингибировать пролиферацию клеток сосудистой стенки [15]. С ростом тяжести заболевания происходит активация как системы апоптоза, так и пролиферации клеток, что может выразиться в повышении показателя проапоптотического белка Вах и маркера пролиферации клеток PDGF BB.

На наш взгляд перспективным направлением является дальнейшие исследования данных показателей у пациентов, прошедших оперативное лечение, для изучения их влияния на развитие таких осложнений, как рестеноз и тромбоз зоны вмешательства.

Заключение

У пациентов с атеросклерозом периферических артерий нижних конечностей с увеличением стадии заболевания происходит повышение уровня проапоптотического белка Вах и тромбоцитарного фактора роста BB на фоне снижения уровня метаболитов оксида азота.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов (The authors declare no conflict of interest).**ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES**

- Meng LB, Shan MJ, Yu ZM, et al. Chronic stress: a crucial promoter of cell apoptosis in atherosclerosis. *J Int Med Res.* 2020; 48(1): 300060518814606. doi: 10.1177/0300060518814606.
- Калинин Р.Е., Сучков И.А., Климентова Э.А., и др. Апоптоз в сосудистой патологии: настоящее и будущее // Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова. — 2020. — Т.28. — №1. — С. 79–87. [Kalinin RE, Suchkov IA, Klimentova EA, et al. Apoptosis in vascular pathology: present and future. *I.P. Pavlov Medical Biological Herald.* 2020; 28(1): 79–87. (In Russ).] doi: 10.23888/PAVLOVJ202028167-75.
- Grootaert MOJ, Moulis M, Roth L, et al. Vascular smooth muscle cell death, autophagy and senescence in atherosclerosis. *Cardiovasc Res.* 2018; 114(4): 622–634. doi: 10.1093/cvr/cvy007.
- Калинин Р.Е., Сучков И.А., Климентова Э.А., и др. К вопросу о роли апоптоза в развитии атеросклероза и рестеноза зоны реконструкции // Новости хирургии. — 2020. — Т.28. — №4. — С. 418–427. [Kalinin RE, Suchkov IA, Klimentova EA, et al. On the role of apoptosis in the development of atherosclerosis and restenosis of the reconstruction zone. *Surgery news.* 2020; 28(4): 418–427. (In Russ).] doi: 10.18484/2305-0047.2020.4.418.
- Bowen-Pope DF, Raines EW. History of Discovery: Platelet-derived Growth Factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011; 31(11): 2397–2401. doi: 10.1161/ATVBAHA.108.179556.
- Wang JJ, Zhang SX, Lu K, et al. Decreased expression of pigment epithelium-derived factor is involved in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Diabetes.* 2005; 54: 243–250. doi: 10.2337/diabetes.54.1.243.
- Zhang LY, Zhang DW, Wu XJ, et al. Expression of platelet-derived growth factor-A in atherosclerosis plaque of arteriosclerosis obliterans patient. *Zhongguo Dong Mai Ying Hua Za Zhi.* 2006; 14: 61–63.
- Стрельникова Е.А., Трушкина П.Ю., Суков И.Ю. Эндотелий in vivo и in vitro. Часть 1: гистогенез, структура, цитофизиология и ключевые маркеры. *Наука молодых.* — 2019. — Т.7. — №3. — С. 450–465. [Strelnikova EA, Trushkina PYu, Surov IYu. Endothelium in vivo and in vitro. Part 1: histogenesis, structure, cytophysiology and key marker. *Eruditio Juvenium.* 2019; 7(3): 450–465 (In Russ).] doi: 10.23888/HMJ201973450-465.
- Галстян Г.Р., Токмакова А.Ю., Егорова Д.Н. и др. Клинические рекомендации по диагностике и лечению синдрома диабетической стопы. *Журнал им. Проф. Б.М. Костюченко.* — 2015. — №2. — С.63–83. [Galstjan GR, Tokmakova AJu, Egorova DN, et al. Clinical practice guidelines for the diagnosis and treatment of diabetic foot syndrome. *ZHurnal im. Prof. B.M. Kostyuchyonka.* 2015; 2: 63–83 (In Russ)]
- Сапелькин С.В., Кузнецов М.Р., Калашников В.Ю., и др. Национальные рекомендации по диагностике и лечению заболевания артерий нижних конечностей. М., 2018. 111 с. [Capelkin SV, Kuznecov MR, Kalashnikov VJu, et al. National guidelines for the diagnosis and treatment of lower limb artery disease. Moscow; 2018. 111p. (In Russ).]
- Gonzalez L, Trigatti BL. Macrophage Apoptosis and Necrotic Core Development in Atherosclerosis: A Rapidly Advancing Field with Clinical Relevance to Imaging and Therapy. *Can J Cardiol.* 2017; 33(3): 303–312. doi:10.1016/j.cjca.2016.12.010.
- Mo B, Liu W, Yang L, et al. Modulation of expression of platelet-derived growth factor by nuclear transcription factor-kappab in rats retina. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi.* 2007; 43: 49–54.
- Zhang Y, Zhang W, Wang KQ, et al. Expression of platelet-derived growth factor in the vascular walls of patients with lower extremity arterial occlusive disease. *Exp Ther Med.* 2015; 9(4): 1223–1228. doi: 10.3892/etm.2015.2275.
- Пшеничников А.С., Деев Р.В. Морфологическая иллюстрация изменений артериального эндотелия на фоне ишемического и реперфузионного повреждений // Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова. — 2018. — Т.26. — №2. — С. 184–94. [Pshennikov AS, Deev RV. Morphological illustration of alterations in the arterial endothelium in ischemic and reperfusion injuries. *I.P. Pavlov Medical Biological Herald.* 2018; 26(2): 184–94 (In Russ).] doi:10.23888/PAVLOVJ2018262184-19.
- Lee M, Rey K, Besler K, et al. Immunobiology of Nitric Oxide and Regulation of Inducible Nitric Oxide Synthase. *Results Probl Cell Differ.* 2017; 62: 181–207. doi: 10.1007/978-3-319-54090-0_8.