

ZNAČAJ ODREĐIVANJA ADHEZIONIH MOLEKULA U AKUTNOM KORONARNOM SINDROMU

Goran Damnjanović*, Ružica Janković**, Zoran Damnjanović***, Dragan Jovović*, Biljana Jovović#, Nevena Lečić#, Marija Jelić#, Boris Đinđić##, Dušan Sokolović### i Dimitrios Koutsonanos[§]

Adhezioni molekuli igraju važnu ulogu u razvoju i progresiji koronarne ateroskleroze. U ovom istraživanju ispitivana je solubilna forma vaskularnog ćelijskog adhezionog molekula-1 i intraćelijskog adhezionog molekula-1 kod bolesnika sa akutnim koronarnim sindromom i komparirana kod bolesnika sa stabilnom anginom pectoris i bolesnicima bez koronarne bolesti. Venski uzorak plazme je uzet od 15 bolesnika sa akutnim infarktom miokarda (AMI), 15 sa nestabilnom anginom pectoris (NAP), 15 sa stabilnom anginom pectoris (SAP) i 15 ispitanika bez dokumentovane koronarne bolesti. Nivo VCAM-1 je signifikantno viši kod bolesnika sa AMI (799.8 ± 26.3 ng/ml) u odnosu na one sa nestabilnom anginom pectoris (644.2 ± 26.7 ng/ml), stabilnom anginom pectoris (526 ± 32.5 ng/ml) i kontrole (270 ± 26.8 ng/ml). Kod bolesnika sa NAP, VCAM-1 je signifikantno povišen u odnosu na SAP i kontrolu. Nivo VACM-1 je takođe viši u grupi sa SAP u odnosu na kontrolnu grupu. Serumski nivo ICAM-1 je sličan kod bolesnika sa AMI (424.1 ± 15.2 ng/ml), NAP (403 ± 12.3 ng/ml) i SAP (381.2 ± 16.2 ng/ml), međutim nivo ICAM-1 je signifikantno viši u ovim grupama u poređenju sa kontrolom (244.3 ± 11). Određivanje serumskog nivoa VCAM-1 je korisno za detekciju koronarne destabilizacije plaka, dok je nivo ICAM-1 koristan pokazatelj postojanja aterosklerotskih promena na krvnim sudovima srca. *Acta Medica Medianae* 2006;45(4):28-31.

Ključne reči: adhezivni molekuli i akutni koronarni sindrom

Interno odeljenje Vojne bolnice u Nišu*
Klinika za kardiovaskularne bolesti Kliničkog centra u Nišu**
Sanofi Aventis u Beogradu***
Kliničko biohemijska laboratorija Vojne bolnice u Nišu#
Institut za patološku fiziologiju Medicinskog fakulteta u Nišu##
Institut za biohemiju Medicinskog fakulteta u Nišu###
Bolnica u Solunu[§]

Kontakt: Goran Damnjanović
Bulevar dr Zorana Đinđića bb
18000 Niš, Srbija
Tel.: 018 508-834
E-mail: GORAN7328@bankerinter.net

Uvod

Marginacija, adhezija i delimično transendotelna migracija cirkulišućih leukocita su vrlo važni procesi u inicijaciji i progresiji aterosklerotске bolesti (1). Svi ovi procesi su posredovani i preko različitih grupa ćelijskih adhezivnih molekula (2). Selektini, uključujući E selektin i P selektin, posreduju u prvom koraku leukocitne adhezije na mestu inflamacije i povrede. Kotrljajući leukociti se zahvaljujući kontaktu sa njima vezuju za površinu endotela, trombocita ili drugih leukocita (3). Prototip ovih članova imunoglobulinske superfamilije gena je vaskularni ćelijski adhezioni molekul-1 (VCAM-1) i interćelijski adhezioni molekul-1 (ICAM-1). Ova dva adhezijska molekula služe kao endotelni ligandi za ekspresiju integrina na leukocitima i trombocitima i posreduju u uspostavljanju čvrstog kontakta leukocita

za endotel, čime se stvaraju uslovi da leukociti otpočnu transendotelnu migraciju (2,4,5). U koronarnim arterijama kod bolesnika sa transplantacijom srca VCAM-1, ICAM-1 i selektini su promenljivo ispoljeni u 20-70% na fibroznoj aterosklerotskoj leziji, dok je ispoljavanje ovih molekula vrlo retko na normalnim koronarnim arterijama (6). Solubilne forme adhezivnih molekula se sreću u plazmi i one su povišene u različitim inflamatornim bolestima (7,8,9). Povišen nivo solubilnih adhezivnih molekula je prisutan kod bolesnika sa akutnim i hroničnim koronarnim sindromom, ali je stepen njihove ekspresije vrlo različit u literaturnim podacima (10,11,12,13,14). Pored toga, patogenetska uloga različitih solubilnih adhezivnih molekula u različitim stadijumima koronarne bolesti nije potpuno definisana.

Cilj rada bio je određivanje nivoa adhezivnih molekula VACM-1 i ICAM-1 u akutnom koronarnom sindromu i njihovog značaja kao dijagnostičkih markera.

Metode

Istraživanjem je obuhvaćeno 60 bolesnika lečenih u Vojnoj Bolnici u Nišu. U istraživanje nisu uključeni bolesnici sa akutnim i hroničnim inflamatornim bolestima, malignitetima, renalnom insuficijencijom, značajnom bolešću jetre, vezivno tkivnim bolestima, kao ni bolesnici sa kardiogenim šokom, perifernom arterijskom bo-

lešču, preležanim infaktom miokarda tokom godinu dana i revaskularizacijom miokrada. Svi bolesnici su u zavisnosti od tipa koronarne bolesti podeljeni u četiri grupe:

I grupa - 15 bolesnika sa akutnim infarktomiokarda (AMI). Akutni infarkt miokarda je dijagnostikovao upotrebom sledećih kriterijuma: 1. Prolongirani bol u grudima više od 30 min. i rezistentan na lingvaletu NTG, 2. Elevacija ST segmenta više od 0,1 mV u najmanje dva EKG odvođa ili pojava novog bloka leve grane, 3. povišenje serumske kreatin kinaze-MB više od dva puta od normalnih vrednosti, 4. Povišene vrednosti troponina.

II grupa - 15 bolesnika sa nestabilnom anginom pectoris (NAP). Svi bolesnici su imali prolongirani bol u grudima, u miru, u poslednjih 48 sati i dinamiku, u smislu ishemije, ST segment u 12 odvodnom EKG-u pre prijema u intenzivnu negu. Bolesnici koji su imali CK-MB i troponin preko granice normale nisu uključivani u ovo istraživanje.

III grupa - 15 bolesnika sa stabilnom anginom pectoris (SAP) koji su imali tipičnu spoljašnjiju manifestaciju angine pectoris i pozitivan test opterećenja. Bolesnici sa anginom u miru isključeni su iz ove grupe.

IV grupa (kontrolna) - 15 bolesnika sa tipičnim ili atipičnim bolom u grudima. Svi bolesnici su bez EKG i enzimske dinamike u smislu koronarne bolesti. Urađeni test opterećenja kod ovih bolesnika nije ukazivao na njeno postojanje.

Kod svih bolesnika je uzeta detaljna anamneza, a zatim, iz kubitalne vene uzorak krvi pre otpočinjanja terapije. Za određivanje adhezionih molekula ICAM-1 i VCAM-1 korišćen je serum kao uzorak koji je odvojen u prvom satu posle uzimanja od uobličjenih elemenata (nakon koagulacije i

centrifugiranja) u plastične epruvete (250-500 μ L) i čuvan na -80°C . Nakon odmrzavanja, uz korišćenje kitova firme "Beckman Coulter Company" i očitavanja na "Bio Systems"- elisa rider-u, dobijene su vrednosti izražene u ng/mL.

Rezultati

U Tabeli 1 data je polna distribucija bolesnika u ispitivanim grupama.

Tabela 1. Karakteristike ispitanika

Ispitanici	AMI		NAP		SAP		kontrola	
	n	%	n	%	n	%	n	%
žene	5	33	6	40	7	46	7	46
muškarci	10	64	9	60	8	54	8	54
ukupno	15	100	15	100	15	100	15	100

NS za sve parametre

Urađeni Hi kvadrat test je pokazao da je u ispitivanim grupama uključen približno podjednak broj ispitanika u odnosu na pol (Tabela 1).

U Tabeli 2 date su osnovne kliničke karakteristike bolesnika svih ispitivanih grupa.

Nije bilo značajne razlike među grupama u starosti i trajanju KB. Bolesnici sa NAP imali su nešto više vrednosti BMI i dijastolnog krvnog pritiska u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0.05$). Bolesnici koji su preležali AMI imali su nešto više vrednosti ukupnog holesterola i triglicerida u odnosu na kontrolnu grupu i bolesnike sa SAP (Tabela 2).

Tabela 2. Procena faktora rizika za KB u ispitivanim grupama

	AMI	NAP	SAP	kontrola
starost (god.)	53.2 \pm 5.4	55.6 \pm 6.2	54.16 \pm 5.7	51.8 \pm 7.01
trajanje KB (god.)	4.78 \pm 4.2	5.8 \pm 4.04	5.15 \pm 2.3	
BMI (kg/m ²)	28.5 \pm 2.76	29.1 \pm 2.94*	27.1 \pm 2.85	27.3 \pm 1.8
sisTA (mmHg)	135 \pm 5.1	140 \pm 6.4	139 \pm 4.3	135 \pm 3.2
dijTA (mmHg)	85 \pm 6.2	87 \pm 5.3*	83 \pm 2.7	80 \pm 2.4
holesterol (mmol/l)	6.1 \pm 1.2*	5.7 \pm 1.26	5.4 \pm 1.2	4.8 \pm 0.8
triglicerid (mmol/l)	2.62 \pm 1.0*	2.3 \pm 0.8	1.6 \pm 0.7	1.5 \pm 0.9

* $p < 0.05$ naspram kontrole; * $p < 0.05$ naspram SAP i kontrole

Tabela 3. Vrednosti ICAM-1 i VCAM-1 u ispitivanim grupama

	AMI	NAP	SAP	kontrola
ICAM-1 (ng/ml)	424.1 \pm 15.2 ^{&&&}	403 \pm 12.3 ^{&&&}	381.2 \pm 16.2 ^{&&&}	244.3 \pm 11
VCAM-1 (ng/ml)	799.8 \pm 26.3 ^{***}	644.2 \pm 26.7 ^{#,###}	526 \pm 32.5 ^{###}	270 \pm 26.8

*** $p < 0.001$ vs NAP, SAP i kontrola; # $p < 0.05$ vs SAP; ### $p < 0.001$ vs kontrola
 &&& $p < 0.001$ vs kontrola

U Tabeli 3 prikazane su vrednosti solubilnih formi adhezionih molekula.

Signifikantna razlika u nivou adhezionih molekula dokazana je među grupama i pokazana u Tabeli 3. Adhezioni molekuli su povišeni u grupama bolesnika sa AMI, NAP i SAP komparirano sa kontrolnom grupom. Srednja vrednost VCAM-1 je signifikantno povišena kod bolesnika sa AMI u odnosu na NAP ($p < 0.001$), SAP ($p < 0.001$) i kontrolnu grupu ($p < 0.001$). Kod bolesnika sa NAP, VCAM-1 je signifikantno viši, komparirano sa SAP grupom ($p < 0.05$) i kontrolnom ($p < 0.001$). VCAM-1 nivo je takođe viši u SAP grupi u odnosu na kontrolnu grupu $p < 0.001$. Nije bilo značajne razlike u serumskom nivou ICAM-1 između grupa sa koronarnim sindromom AMI, NAP i SAP, međutim, nivo ICAM-1 je signifikantno povišen u ove tri grupe komparirano sa kontrolnom grupom ($p < 0.001$).

Diskusija

Otkako su pronađene solubilne forme adhezionih molekula pri aktivaciji endotelnih ćelija ili leukocita i njihovi enzimi-povezani sa imunosorbentnim esejima (15,16), porastao je interes za ispitivanje njihove uloge u koronarnoj bolesti. U ovom istraživanju proučavana su dva različita solubilna adhezionna molekula iz grupe superfamilije imunoglobulinskih gena. Pokazano je da nivo VCAM-1 ima značajne varijacije u svim kompariranim grupama. Najviši nivo je nađen kod bolesnika sa AMI, pri čemu je pokazao smanjivanje vrednosti u grupama sa NAP i SAP. Ovo ukazuje da je VCAM-1 u relaciji sa aktivnošću aterosklerotske bolesti. Molekul VCAM-1 ispoljava povećanu ekspresiju naročito na intimalnim neovaskularizacijama i značajno je povezan sa agregacijom i akumulacijom leukocita u intimi krvnih sudova (17,18). Veruje se da porast broja leukocita počinje unutar 2 sata od pojave diskomforta u grudima kod AMI i verovatno je delimično povazan sa visokim nivoima solubilnog VCAM-1 u ovom istraživanju. U AMI, endotelne ćelije i leukociti ispoljavaju sinergistički patogeni efekat i imaju glavnu ulogu u miokardnom oštećenju. Preduslov za nastanak leukocitima posredovane povrede je adhezija leukocita za vaskularni endotel koji uključuje endotelnu aktivaciju i disfunkciju (19,20,21). Iako nije istraživana relacija između miokardnog oštećenja i

ekspresije adhezionih molekula, visok nivo VCAM-1 kod bolesnika sa AMI, u poređenju sa NAP i SAP grupom bolesnika, može biti rezultat leukocitima posredovanog miokardnog oštećenja koje prati ishemijsku nekrozu. Kod bolesnika sa akutnim koronarnim sindromom kod kojih su pronađene signifikantno više vrednosti VCAM-1, pokazalo se da postoji povećani rizik za nastanak naknadnih kardiovaskularnih događaja u poređenju sa bolesnicima koji su imali niže nivoe VCAM-1 (22). Osim toga, pokazano je da je serumski nivo VCAM-1 jako povezan sa budućim kardiovaskularnim događajem i kod bolesnika sa do-kumentovanim koronarnom bolešću (23). U proučavanjima Yamamoto i sar. (24) pokazano je da transkardijalni gradijent solubilnog VCAM-1 korelira sa endotelnom disfunkcijom koronarnih arterija (procenjeno sa provokativnim intrakoronarnim acetilholinskim testom). U istom istraživanju je pokazano da transkardijalni gradijent VCAM-1 može biti prognostički pokazatelj za progresiju ateroskleroze.

U sprovedenom istraživanju nije bilo signifikantne razlike u nivoima ICAM-1 između bolesnika sa akutnim koronarnim sindromom i SAP. Međutim, sve ove grupe bolesnika imale su visok nivo ICAM-1 u poređenju sa kontrolnom. Za razliku od drugih adhezionih molekula, ICAM-1 ima široku zastupljenost u različitim tkivima. ICAM-1 se nalazi na endotelnim, hematopoetskim, epitelnim, glatko mišićnim vaskularnim ćelijama i fibroblastima (25,26). Ovo bi moglo biti objašnjenje za slične nivoe ICAM-1, kako u akutnom tako i u stabilnom koronarnom sindromu. Poston i sar. (27) su objavili da se ICAM-1 ispoljava na površini endotelnih ćelija u ranoj leziji u istom opsegu kao i u već razvijenoj leziji. Ovo je u saglasnosti sa rezultatima nađenim u našem istraživanju, gde nije pokazana značajna razlika između grupa bolesnika sa AMI, NAP, SAP. Ovo ukazuje da nivo ICAM-1 može služiti kao marker postojanja i vrlo malog stepena vaskularne inflamacije koronarnih arterija, ali da nije povezan sa aktivnošću i stadijumom bolesti.

Zaključak

Određivanje serumskog nivoa VCAM-1 je korisno za detekciju koronarne destabilizacije plaka, dok je nivo ICAM-1 koristan pokazatelj postojanja aterosklerotskih promena na krvnim sudovima srca.

Literatura

- Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340:115–26.
- Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 1994; 76:301–14.
- McEver RP, Moore KL, Cummings KD. Leukocyte trafficking mediated by selectin-carbohydrate interactions. *J Biol Chem* 1995; 270:11025–8.
- Albelda SM, Oliver SD, Romer LH, Buck CA. EndoCAM: a novel endothelial cell-cell adhesion molecule. *J Cell Biol* 1990; 110:1227–37.
- Newman PJ, Berndt MC, Gorsky J, White GC, Paddock LC, Muller WA. PECAM-1(CD31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily. *Science* 1990; 247:1219–22.
- Davies MJ, Gordon JL, Gearing AJ, Pigott R, Woolf N, Katz D. et al. The expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM, and E-selectin in human atherosclerosis. *J Pathol* 1993; 171:223–9.
- Banks RE, Gearing AJ, Hemingway IJ, Norfolk DR, Perren TJ, Selby PJ. Circulating intercellular adhesion molecule-1(ICAM-1), E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1(VCAM-1) in human malignancies. *Br J Cancer* 1993; 68:122–4.

8. Newman W, Beall LD, Carson CW, Hunder GG, Graben H, Randhawa ZI, et al. Soluble E-selectin is found in supernatants of activated endothelial cells and is elevated in the serum of patients with septic shock. *J Immunol* 1993;150:644-54.
9. Mason JC, Kapahi P, Haskard DO. Detection of increased levels of circulating intercellular adhesion molecule-1 in some patients with rheumatoid arthritis but not in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1993;36:519-27.
10. Haught WH, Mansour M, Rothlein R, Kishimoto TK, Mainolfi EA, Hendricks JB, et al. Alterations in circulating intercellular adhesion molecule-1 and L-selectin: further evidence for chronic inflammation in ischemic heart disease. *Am Heart J* 1996; 132:1-8.
11. Suefuji H, Ogawa H, Yasue H, Sakamoto T, Miyao Y, Kaikita K, et al. Increased plasma level of soluble E-selectin in acute myocardial infarction. *Am Heart J* 2000; 140: 243-8.
12. Vita P, Freedman JE. Soluble adhesion molecules and unstable coronary artery disease. *Atherosclerosis* 2001; 156: 417-24.
13. Porsch-Oezcuemez M, Kunz D, Kloer HU, Luley C. Evaluation of serum levels of solubilized adhesion molecules and cytokine receptors in coronary heart disease. *J Am Coll Cardiol* 1999; 34:1995-2001.
14. Lin CP, Lin WT, Leu HB, Wu TC, Chen JW. Differential mononuclear cell activity and endothelial inflammation in coronary artery disease and cardiac syndrome X. *Int J Cardiol* 2003; 89:53-62.
15. Pigott R, Dillon LP, Hemingway IH, Gearing AJH. Soluble forms of E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 are present in the supernatants of cytokine activated cultured endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 187:584-9.
16. Leeuwenberg JF, Smeets EF, Neefjes JJ, Shaffer MA, Cinek T, Jeunhomme TM, et al. E-selectin and intercellular adhesion molecule-1 are released by activated human endothelial cells in vitro. *Immunology* 1992; 77:543-9.
17. O'Brien KD, Allen MD, McDonald TO, Chait A, Harlan JA, Fishbein D. et al. Vascular cell adhesion molecule-1 is expressed in human coronary atherosclerotic plaques: implications for the mode of progression of advanced coronary atherosclerosis. *J Clin Invest* 1993; 92:945-51.
18. O'Brien KD, McDonald TO, Chait A, Allen MD, Alpers CE. Neovascular expression of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1, and vascular cell adhesion molecule-1 in human atherosclerosis and their relation to intimal leukocyte content. *Circulation* 1996; 93:672-82.
19. Lucchesi BR, Werns SW, Fantone JC. The role of neutrophil and free radicals in ischemic myocardial injury. *J Mol Cell Cardiol* 1989; 21:1241-51.
20. Rubanyi GM, Vanhoutte PM. Oxygen-derived free radicals, endothelium, and responsiveness of vascular smooth muscle. *Am J Physiol* 1986; 250:H815-H821.
21. Kaminski KA, Bonda TA, Korecki J, Musial WJ. Oxidative stress and neutrophil activation-the two keytones of ischemia/reperfusion injury. *Int J Cardiol* 2002; 86:41-59.
22. Mulvihill NT, Foley JB, Murphy RT, Curtin R, Crean PA, Walsh M. Risk stratification in unstable angina and non-Q wave myocardial infarction using soluble cell adhesion molecules. *Heart* 2001; 85:623-7.
23. Blankenberg S, Rupprecht HJ, Bickel C, Peetz D, Hafner G, Tiret L, et al. Circulating cell adhesion molecules and death in patients with coronary artery disease. *Circulation* 2001; 104: 1336-42.
24. Zimmerman GA, Prescott SM, McIntyre TM. Endothelial interactions with granulocytes: tethering and signaling molecules. *Immunol Today* 1992;13:93-100.
25. Couffinhal T, Duplaa C, Moreau C, Lamaziere JM, Bonnet J. Regulation of vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 in human vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1994; 74:225-34.
26. Poston RN, Haskard DO, Coucher JR, Gall NP, Johnson-Tidey RR. Expression of intercellular adhesion molecule-1 in atherosclerotic plaques. *Am J Pathol* 1992; 140:665-9.

SIGNIFICANCE OF ADHESIVE MOLECULES DETERMINATION IN ACUTE CORONARY SYNDROME

Goran Damjanovic, Ruzica Jankovic, Zoran Damjanovic, Dragan Jovovic, Biljana Jovovic, Nevena Lecic, Marija Jelic, Boris Djinjdjic, Dusan Sokolovi and Dimitrios Koutsonanos

Adhesive molecules play an important role in developing and progression of coronary atherosclerosis. The aim of the paper was to analyze a soluble form of vascular cell adhesive molecules 1 and intracellular cell adhesive molecules 1 in patients with acute coronary syndrome, which was compared with patients with stable angina pectoris and patients without coronary disease. Blood samples were taken from 15 patients with acute myocardial infarct (AMI), 15 patients with unstable angina pectoris (UAP), 15 with stable angina pectoris (SAP) and from 15 patients without coronary disease. The level of VCAM-1 is significantly higher in patients with AMI (799.8±26.3 ng/ml) compared with UAP (644.2±26.7 ng/ml), SAP (526±32.5 ng/ml) and control group (270±26.8 ng/ml). In the patients with UAP, VCAM-1 is significantly higher compared with SAP and control group. The level of VACM-1 is significantly higher in SAP group compared to control group. Serum concentration of ICAM-1 is similar in patients with AMI (424.1±15.2 ng/ml), UAP (403±12.3 ng/ml) and SAP (381.2±16.2 ng/ml). Concentration of ICAM-1 is significantly higher in these groups compared with control group (244.3±11). Determination of VCAM-1 is useful for detection of coronary atherosclerotic plaque destabilization, while ICAM-1 is a useful indicator of atherosclerotic plaque presence in coronary vessels. *Acta Medica Medianae* 2006;45(4):28-31

Key words: *adhesive molecules, acute coronary syndrome*