

САВРЕМЕНЕ ТЕХНИКЕ СНИМАЊА НЕСТАБИЛНОГ АТЕРОСКЛЕРОТСКОГ ПЛАКА НА КОРОНАРНИМ АРТЕРИЈАМА

Иван Симић

Клиника за кардиологију, Клинички центар „Крагујевац“, Факултет медицинских наука Универзитета у Крагујевцу,
Крагујевац

MODERN IMAGING TECHNIQUES OF VULNERABLE ATHEROSCLEROTIC PLAQUE ON CORONARY ARTERIES

Iva P. Simic

Clinic for Cardiology, Clinical Center "Kragujevac", Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac,
Serbia

САЖЕТАК

Захваљујући моћним савременим техникама снимања које нам стоје на располагању имамо могућност да унапредимо схватање биологије вулнерабилног плака у атеросклерози. Васкуларно ремоделовање манифестује се као експанзивно или рестриктивно, а промене у саставу васкуларног зида (хипотрофија или хипертрофија) заједничке су за сву васкуларну патологију. Ензими укључени у разградњу екстрацелуларног матрикса и пролиферишуће ћелије које чине неоинтиму могу бити обележене за приказивање. Инфламација је битна компонента атеросклерозе. Радиообележена 18F-FDG (флуоридеоксиглукоза), широко коришћена за маркирање тумора обећава коришћење у детекцији инфламаторне активности атеросклеротског плака као и његовог оптерећења. Фотоним обележени агенс који везује LOX-1 рецептор на макрофагима за оксидисани LDL омогућава обележавање инфламације у атеросклерози. Радиообележени MPI могу се користити за обележавање инфламације и ремоделовања како је показано у клиничким експериментима. Наночестице са парамagnetним својствима дизајниране су да обележе ангиогенезу која представља битан процес код узнапредовалог атеросклеротског плака доводећи до хеморагије у самом плаку и до његове дестабилизације. Ултрасуперпарамагнетне честице, USPIO, преузете од стране макрофага у атерому имају потенцијал у приказивању инфламације и активних атеросклеротских плакова. Упркос садашњим технолошким ограничењима ови методи приказа атеросклеротских плакова обећавајући су приступ за тестирање у клиничким студијама.

Кључне речи: атеросклероза; плак, атеросклеротични; молекуларна визуелизација.

АТЕРОСКЛЕРОЗА

Атеросклероза представља водећи узрок морбидитета и морталитета у развијеним земљама широм света. Локални васкуларни одговор на акумулацију штетних липопротеина, пре свих оних мале молекулске густине (LDL), одговоран је за развој

ABSTRACT

The availability of powerful imaging techniques has the potential to improve our understanding of the biology of the vulnerable plaque in atherosclerosis. Vascular remodelling manifests as either expansive or restrictive, and changes in the vessel wall composition (hypertrophy or hypotrophy) are common to all vascular pathologies. Enzymes involved in dissolving the extracellular matrix and proliferating cells comprising the neointima can be targeted for imaging. Inflammation is an important component of atherosclerosis. A positron-labelled probe, 18F-FDG, is widely available for tumour imaging and shows a promise as a marker of inflammatory activity of atherosclerotic plaque and plaque burden. Single photon-labelled probe that binds the LOX-1 LDL receptor on macrophages for oxidized LDL shows a promise as an agent for imaging inflammation in atherosclerosis. Radiolabelled MPIs that target both inflammation and remodelling show a promise in preclinical experiments. Nanoparticles with paramagnetic properties have been designed to target angiogenesis, which is an important process in advanced atherosclerotic plaque leading to intraplaque hemorrhage and instability. Iron-based particles, USPIOs, are taken up by macrophages in atheroma, and USPIO-MRI has the potential to become an approach to image inflamed and active atherosclerotic plaques. Despite the current technological limits, we believe that these imaging methods of atherosclerotic plaques are very promising approaches for being tested in clinical studies.

Key words: atherosclerosis; plaque, atherosclerotic; molecular imaging.

и ток процеса атеросклерозе са различитим клиничким последицама. Стабилан атеросклеротски плак својом луминалном проминенцијом и онемогућавањем адекватне перфузије има углавном механичке импликације индуковањем дисталне исхемије каква је нпр. стабилна ангина пекторис. Међутим, нестабилан, вулнерабилан атеросклеротски плак може довести до, потенцијално погубних, акутних васкуларних тромботских догађаја какви су акутни инфаркт миокарда или шлог. Нестабилан

атеросклеротски плак (фиброатером са танком фибрознам капом) карактерише велико, некротично липидно језгро сачињено углавном од дебрија насталог деградацијом пенастих ћелија, које настају од макрофага који интернализују холестеролске честице, као и танка фиброзна капа која настаје миграцијом глатких васкуларних мишићних ћелија из медије (и нормалног, контрактилног фенотипа) у интиму (у секреторни фенотип – фибробласте) (1). Поред тога, постоји и веома интензивна имунолошка, инфламаторна и метаболичка активност, уз интензиван процес ангиогенезе пупољњем локалних *vasa vasorum* који су врло фрагилни, доводећи до хеморагија унутар самог плака (2). То, уз активност матриксних металопроотеиназа, макрофагну апоптозу и губитак стабилизирајућег ефекта глатких мишићних ћелија из фиброзне капе (3, 4), води њеној деградацији и руптури, нарочито на тзв. раменима, припојима плака, са настанком последичне интракоронарне тромбозе. И док је друга половина прошлог века била револуционарна у смислу развоја инвазивних процедура за морфолошку, а касније и функционалну анализу коронарне болести, у протеклој деценији је започет развој неинвазивних метода за детекцију нестабилног, вулнерабилног плака у жељи да се детектују ризични пацијенти, као и да се прате ефекти терапије.

САВРЕМЕНЕ ТЕХНИКЕ СНИМАЊА

Молекуларно приказивање представља неинвазивну визуелизациону биомедицинску дијагностику засновану на молекуларним биомаркерима. Избор визуелизационе технике диктира и жељена својства молекуларних биомаркера. Парамагнетне наночестице: 1998. *SipkiH* (5) демонстрира *in vivo* приказивање ангиогенезе помоћу парамагнетних полимеризованих лизозома, а *LaHа* и *сар*. (6) постижу приказ фибрина помоћу парамагнетних перфлуороугљеничних честица. Од тада се интензивно испитују лиганд везујуће парамагнетне перфлуороугљеничне честице у детекцији и праћењу атеросклерозе почевши од раних фаза до развоја вулнерабилног атерома са танком капом, укључујући процесе макрофагне инфилтрације са увећањем некротичног језгра, неоваскуларне експанзије *vasa vasorum*, хеморагије унутар плака и повећане ангиогенезе.

Суперпарамагнетне наночестице: парамагнетне наночестице гвожђе-оксида међу првим су коришћене као биомаркери детектовани методама MRI. Могу се разврстати на суперпарамагнетне (дијаметар честица > 50 nm) и ултрасуперпарамагнетне честице (USPIO, дијаметар < 50 nm). Обично су обложене декстраном (ферумоксид) или силоксаном (ферумоксил) (7).

USPIO-MRI методом доказане су инфламаторне промене мониторингом макрофагне активности, главне компоненте вулнерабилног плака. „*XtCrvastatiH Therapy: Effects CH ReductiCH Cf MacrCphage Xctivity (XThEROMX)*“ студија (8) била је прва проспективна молекуларна студија заснована на методама магнетне резонанце у којој је доказан утицај терапије статинима на инфламацију плакова на каротидним артеријама, и то при администрацији високих дневних доза аторвастатина (80 mg). Њом је први пут доказана веза између ране примене високих доза статина и смањења инфламације плака.

Лиганд везујуће наночестице гвожђе-оксида: развој монокристалин гвожђе-оксид наночестица омогућио је не само пасивну акумулацију наночестица већ и њихово везивање за различите лиганде са специфичним епитопима за стриктуре ткива које се испитује. Снимање може бити остварено и нуклеарним техникама SPECT и PET, који иако нешто слабије спацијалне резолуције од MRI (1mm) (PET око 5 mm, SPECT око 10 mm) имају бољу сензитивност када је реч о молекуларним обележивачима у пикомоларним концентрацијама, што омогућава мале дозе контрастног агенса у поређењу са MRI и CT. Супериорни квалитет слике добијен је у последње време комбинацијом PET/CT и PET/MRI.

Хибридни имицинг системи као што су SPECT или PET/CT и PET/MRI имају битну улогу у локализацији врућих тачака радиообележивача у васкулатури. Из практичних разлога, многи од пионирских научних радова учињени су на великим периферним артеријама. Имицинг мањих коронарних артерија методама са радиообележивачима компликује чињеница да је дијаметар тих артерија испод просторне резолуције већине SPECT или PET камера. Такође, постоји фундаментални проблем приказивања овим методама срца као органа који је контрактилан.

У последње време развијен је још један модалитет за детекцију протеолитичке активности атеросклеротских плакова. Реч је о близуинфрацрвеној флуоресценцији (NIRF). Ова техника користи спектар светлости који је близу инфрацрвеном спектру и биокомпатибилне обележиваче који омогућавају флуоресцентну слику ензимске акције матриксних металопроотеиназа. Још једна предност овог метода јесте могућност продирања сигнала неколико центиметара у ткиво, што омогућава *in vivo* приказ (9, 10).

БИОМАРКЕРИ И КОНТРАСТНА СРЕДСТВА

Детекција атеросклерозе традиционалним техникама снимања везује се за процену физичких атрибута зида крвног суда у виду анализе стеноза у

касној фази атеросклерозе. Такве, па и најсензитивније морфолошке методе, као и оне функционалне још увек нам ништа не говоре о вулнерабилности плака, што је основна одредница будућих коронарних догађаја. Данас је широко прихваћена поставка да је атеросклероза хроничан и биохемијски врло динамичан инфламаторни процес. Васкуларно ремоделовање, дефинисано као мењање структуре или састава крвних судова у основи је свих васкуларних обољења. Васкуларно ремоделовање може бити геометријско (у виду експанзивног или рестриктивног ремоделовања) и у виду промена у саставу зида крвног суда (хипертрофија или хипотрофија). Експанзивно ремоделовање је основни патофизиолошки супстрат развоја анеуризми али и, најчешће, почетни стадијум у развоју атеросклерозе, доводећи до повећања попречног пресека артерије. Касније, експанзивни ремоделинг постаје недовољан или се замењује рестриктивним. Међутим, парадоксално, управо је он својом биохемијском оркестрацијом, одговоран за детерминисање вулнерабилности плака. С друге стране, доминантан утицај на рестриктивни ремоделинг имају васкуларне глатке мишићне ћелије које у одговору на излагање васкуларним факторима раста или баротрауми, прелазе из мирног, контрактилног у секреторни, пролиферативни фенотип. Управо је ова трансформација повезана са променама у експримирању и саставу мембранских протеина од којих неки могу послужити као маркери вулнерабилности плака. Један од таквих протеина је и Z2D3 који је искоришћен као први молекуларни маркер вулнерабилности плака (11).

Интегрини представљају фамилију таквих протеина укључених у ћелијско-ћелијску односно ћелијско-матриксну интеракцију, учествујући у ћелијској миграцији и пролиферацији. Интегрални део васкуларног ремоделовања је и матриксно ремоделовање, кроз процесе протеолитичке деградације, синтезе и контракције. Протеазе, пре свих матриксне металопротеиназе (MMPs), велика фамилија калцијум и цинк зависних протеиназа, имају кључну улогу у овим процесима. Доказано је да је током развоја атеросклерозе, оксидисане LDL честице повећавају експресију MMP-1 и 3 (12). Доказано је двоструко до четвороструко повећање MMP-9 у атеросклеротским плаковима код пацијената са нестабилном формом коронарне болести у односу на оне са стабилном формом (13). Одговор на повреду и инфламација су главни покретачки окидачи за активацију MMP у ћелијском зиду. Њихова активност је детерминисана нивоом експресије, активационим стањем и присуством ткивних инхибитора. Управо се ови ткивни инхибитори могу искористити као маркери појачане активности матриксних металопротеиназа,

као нпр. 123I-CGS 27023X, који је први искоришћен, и то код лигираних каротидних артерија аполипопротеин Е kHCckCut мишева (14). Промена сигнала ^{99m}Tc -MPI у плаку може бити искоришћена за процену терапије за редукцију MMP експресије (15).

Екстра домен Б (ED-B) изоформа фибронектина није присутан у нормалном адултном ткиву, али је интегрални део екстрацелуларног матрикса формираног током процеса ремоделовања плака. ED-B фибронектин се акумулира око неоваскулатуре током ангиогенезе, а не акумулира се око старих крвних судова, чинећи га погодним маркером ангиогенезе (16). У ту сврху се користе моноклонална антитела ^{125}I обележена. Обећавајуће структуре за даља испитивања су и атхезиони молекул васкуларних глаткомишићних ћелија VCXM-1, васкуларни ендотелни фактор раста VEGF и ендоглин.

Будући да је атеросклероза, фундаментално, хронични инфламаторни процес, много напора је учињено да се утврде и искористе његови молекуларни маркери. Неки од тих приступа укључивали су проучавање акумулације радиообележених липопротеина мале молекулске густине (LDL) (17), експресије хемокин MCP-1 рецептора (18), густине макрофагне фагоцитозе ^{64}Cu обележених наночестица (19), а нарочито уносом ^{18}F -FDG (флуородооксиглукозе). Разлог за њено коришћење је у томе да макрофази имају базални метаболички ниво који зависи од транспорта егзогене глукозе као супстрата. Што је макрофаг активнији, то је степен његовог искоришћења ^{18}F обележених деривата глукозе већи. ^{18}F -FDG имиџинг се спроводи комбинавањем PET и CT система. Анатомска информација добијена путем CT-а користи се за локализацију акумулирања ^{18}F -FDG у васкуларном кориту. Овај феномен је први пут примећен на аорти код пацијената код којих је спроведена PET дијагностика с циљем стејџинга канцера (20). Делимично ограничење примене овог метода у детекцији вулнерабилног плака које је везано за варијабилну акумулацију овог обележивача у миокарду у последње време се решава претходном дијетом са високим садржајем масти, а ниским угљеним хидратима (21). Ипак, може се рећи да је овај маркер добар показатељ глобалног инфламаторно-атеросклеротског оптерећења што се може искористити у скринингу пацијената с високим ризиком, али је лош параметар вулнерабилности индивидуалног плака због незадовољавајуће сензитивности и резолуције.

Познато је да је оксидација LDL честица рани догађај у атеросклерози (22). Оне преко scaveHger рецептора на макрофазима бивају интернализоване, при чему процес не подлеже регулаторним

механизмима, доводећи до формирања холестеролом богатих пенастих ћелија (23). Оксидисане LDL честице такође олакшавају процес тромбозе смањењем фибринолитичке активности и прокоагулантним деловањем насталим услед појачане експресије ткивног фактора (24), као и смањењем ослобађања азот оксида (25). Лецитину сличан оксидовани 1 (LOX-1) LDL рецептор је мембрански протеин који структурно припада С типу фамилије лецитина и експримиран је на васкуларном ендотелу, али и на макрофагама и васкуларним глатким мишићним ћелијама. У испитивањима се користе ^{99m}Tc обележена анти LOX-1 антитела (26).

Поред инфламаторних, у испитивању вулнерабилности плака могу се користити и процеси укључени у програмирану ћелијску смрт, ензимску деградацију ћелијског матрикса и ремоделовања крвног суда. Процес апоптозе заснива се на каскадној активацији каспаза која доводи до фрагментације DNK и индукује промене на ћелијској мембрани. ⁹⁹Tc анексин А5 може бити коришћен као маркер апоптозе у вулнерабилном плаку (27).

ЗАКЉУЧАК

Сумарно, иако су методи молекуларног приказивања још увек у експерименталној фази и нису уврштени у алгоритме детекције и терапије коронарне болести, можемо констатовати да представљају перспективан неинвазиван апарат у борби против болести од које умире више од 50% светске популације.

СКРАЋЕНИЦЕ

LDL – липопротеини мале молекулске густине

USPIO – ултрасуперпарамагнетне честице

MMP – матриксне металопроотеиназе

MPIs – инхибитори матриксних металопроотеиназа

VСХМ – атхезиони молекула васкуларних глатко-мишићних ћелија

VEGF – васкуларни ендотелни фактор раста

FDG – флуорородеоксиглукоза

LOX – лецитину сличан оксидовани 1 LDL рецептор

ЛИТЕРАТУРА

1. Yla-Herttuala S, BeHezCH JF, DaemeH M, et al. StabilisatiCHCf atherCsclerCic plaques. PCsitiCHpaper Cf the EurGeaHSCiety Cf CardiCgy (ESC) WGkiHg GrCup CH atherCsclerCsis aHl vascular biCgy. ThrCmb HaemCst 2011; 106: 1–19.
2. KCCdie FD, GCd HK, Burke XP, et al. IHraplaque hemCrrhage aHl prCgressiCHCf cCrCHary atherCma. N EHgl J Med 2003; 349: 2316–25.
3. KCCdie FD, Burke XP, Farb X, et al. The thiHcap fibrCatherCma: a type Cf vulHerable plaque: the majCr precursCr lesiCH tC acute cCrCHary syHrCmes. Curr OpiHCardiC 2001; 16: 285–92.
4. Galis ZS, SukhCva GK, Lark MW, Libby P. IHreased expressiCH Cf matrix metallCprCteiHases aHl matrix degradiHg activity iH vulHerable regiCHs Cf humaH atherCsclerCic plaques. J CliH IHvest 1994; 94: 2493–503.
5. SipkiH DX, Cheresh DX, Kazemi MR, NeviH LM, BedHarski MD, Li KC. DetectiCH Cf tumCr aHgiCgeHesis iH vivC by alphaVbeta3-targeted magHetic resCHaHe imagiHg. Nat Med 1998; 4: 623–6.
6. LaHza GM, LCreHz CH, Fischer SE, et al. EHaHed detectiCH Cf thrCmbi with a HCvel fibriH-targeted magHetic resCHaHe imagiHg ageH. Xcad RadiC 1998; 5 (Suppl 1): S173–6.
7. KCCi ME, CappeHdijk VC, CleutjeH KB, et al. XccumulatiCH Cf ultrasml superparamagHetic particles Cf irCH Cxide iH humaH atherCsclerCic plaques caHbe detected by iHvivCmagHetic resCHaHe imagiHg. CirculatiCH2003; 107: 2453–8.
8. Schwartz GG, OlssCH XG, EzekCwitz MD, et al. Effects Cf atCrvastatiH CH early reCurreH ischemic eveHs iH acute cCrCHary syHrCmes: the MIRXCL study – a raHdCmized cCHrCled trial. JXMX 2001; 285: 1711–8.
9. Weissleder R, NtziachristCs V. ShediHg light CHClive mCecular targets. Nat Med 2003; 9: 123–8.
10. NtziachristCs V, RipCl J, WaHg LV, Weissleder R. LCCKiHg aHl listeHHg tClight: the evClutiCHCf whCebCdy phCtCHc imagiHg. Nat BiCtechHC 2005; 23: 313–20.
11. JChHCHLL, SchCfield LM, Verdesca SX, et al. IHvivC uptake Cf radiClabeled aHibCdy tC prCliferatiHg smCCth muscle cells iHa swiHe mCdel Cf cCrCHary steH resteHCsis. J Nucl Med 2000; 41: 1535–40.
12. Newby XC. Dual rCle Cf matrix metallCprCteiHases (matrixiHs) iH iHimal thickeHHg aHl atherCsclerCic plaque rupture. PhysiC Rev 2005; 85: 1–31.
13. SukhCva GK, SchCHbeck U, RabkiHE, et al. EvideHe fCr iHreased cClageHClysis by iHerstitial cClageHases-1 aHl -3 iH vulHerable humaH atherCmatCus plaques. CirculatiCH1999; 99: 2503–9.
14. Schafers M, RiemaHHB, KCpka K, et al. SciHigraphic imagiHg Cf matrix metallCprCteiHase activity iH the arterial wall iHvivC. CirculatiCH2004; 109: 2554–9.

15. Fujimura S, Hartung D, Ohshima S, et al. Molecular imaging of matrix metalloproteinase inhibitor therapy. *J Am Coll Cardiol* 2008; 52: 1847–57.
16. Castellani P, Borsari L, Caracciolo B, et al. Differences between high- and low-grade atherosclerosis using a human recombinant antibody to the extracellular matrix of fibroblasts. *Am J Pathol* 2002; 161: 1695–700.
17. Lees XM, Lees RS, Scheraga H, et al. Imaging human atherosclerosis with 99mTc-labeled low density lipoprotein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1988; 8: 461–70.
18. Hartung D, Petravski X, Haider N, et al. Radiolabeled macrophage chemotactic protein-1 for the detection of inflammation in experimental atherosclerosis. *J Nucl Med* 2007; 48: 1816–21.
19. Nahrendorf M, Zharov H, Hembrador S, et al. Nanoparticle PET-CT imaging of macrophages in inflammation atherosclerosis. *Circulation* 2008; 117: 379–87.
20. Yu HM, Jang S, Cucchiara X, Newberg XB, Lavie X. 18F FDG uptake in the large arteries: a correlation study with the atherosclerotic risk factors. *Semin Nucl Med* 2002; 32: 70–6.
21. Wykrzykowska J, Lehmann S, Williams G, et al. Imaging of inflamed and vulnerable plaque in coronary arteries with 18F-FDG PET/CT in patients with suppression of myocardial uptake using a low-carbohydrate, high-fat preparation. *J Nucl Med* 2009; 50: 563–8.
22. Jialal I, Devaraj S. Low-density lipoprotein oxidation and atherosclerosis: a clinical and biochemical perspective. *Clin Chem* 1996; 42: 498–506.
23. Gerrity RG. The role of the macrophage in atherosclerosis: I. Trafficking of blood-borne macrophages into foam cells in fatty lesions. *Am J Pathol* 1981; 103: 181–90.
24. Drake TX, Hanahan K, Fei HH, Lavi S, Berliner JA. Microscopically oxidized low-density lipoprotein induces tissue factor expression in cultured human endothelial cells. *Am J Pathol* 1991; 138: 601–7.
25. Rahman MM, Varghese Z, Fuller BJ, McCreath JF. Renal vasoconstriction induced by oxidized LDL is inhibited by scavengers of reactive oxygen species and L-arginine. *Clin Nephrol* 1999; 51: 98–107.
26. Ishiura S, Mukai T, Kuge Y, et al. Targeting of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor 1 (LOX-1) with 99mTc-labeled anti-LOX-1 antibody: potential for imaging of vulnerable plaque. *J Nucl Med* 2008; 49: 1677–85.
27. Koldzic FD, Petravski X, Virmani R, et al. Targeting of apoptotic macrophages and experimental atherosclerosis with radiolabeled annexin V: a technique with potential for noninvasive imaging of vulnerable plaque. *Circulation* 2003; 108: 3134–9.