

ЛЕЙКОЦИТАРНЫЕ И СЫВОРОТОЧНЫЕ ФАКТОРЫ РИСКА У БОЛЬНЫХ ОБЛИТЕРИРУЮЩИМ АТЕРОСКЛЕРОЗОМ АРТЕРИЙ НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ

Мишланов В.Ю.¹, Владимирский В.Е.¹

¹ГБОУ ВПО «Пермский государственный медицинский университет им. ак. Е.А. Вагнера» Минздрава России, Пермь, e-mail: vladimirskii_y@mail.ru

Проведено исследование, посвященное изучению дополнительных сывороточных и новых лейкоцитарных факторов риска у больных облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей (ОААНК). Всем пациентам выполнялось изучение концентрации С-реактивного белка (СРБ), липопротеина (а) (ЛП (а), дефензинов альфа (1-3), фактора Виллебранта (ФВ), NT фрагмента предшественника мозгового натрийуретического пептида (NT-proBNP), VII фактора свертывания крови (VIIф) в сыворотке крови и лейкоцитарных супернатантах, а также величины липидвысвобождающей способности лейкоцитов. Установлено, что для больных облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей характерна более высокая концентрация ЛП(а) и СРБ в лейкоцитарных супернатантах, что указывает на репаративную и провоспалительную направленность происходящих у этих пациентов процессов. У больных облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей при наличии признаков нестабильной бляшки и проксимального типа поражения артериального русла в лейкоцитарных супернатантах чаще выявляется СРБ, а при дистальном типе поражения сосудистого русла - дефензины альфа (1-3), что объясняется преобладающими механизмами провоспалительного ответа (инфекционного и неинфекционного типа) в разных клинических ситуациях. Величина ЛВСЛ имеет прямую умеренной силы связь с лодыжечно-плечевым индексом, что указывает на значение этого показателя как маркера тяжести атеросклеротического поражения.

Ключевые слова: облитерирующий атеросклероз артерий нижних конечностей, нейтрофил, белки, воспаление.

LEUKOCYTE AND SERUM RISK FACTORS IN PATIENTS WITH OBLITERATING ATHEROSCLEROSIS OF LOWER LIMB ARTERIES

Mishlanov V. Y.¹, Vladimirskiy V.E.¹

¹Perm State Medical University n.a. ac. E. A. Wagner, Perm, e-mail: vladimirskii_y@mail.ru.

The research was conducted devoted to the study of additional serum and leukocyte new risk factors in patients with obliterating atherosclerosis of lower limb arteries (OALA). All patients underwent the study of the concentration of C-reactive protein (CRP), lipoprotein (a) (LP (a)), defensins alpha(1-3), the factor of Villebranda (FV), NT fragment of precursor brain natriuretic peptide (NT-proBNP), factor VII clotting (VIIif) in serum and leukocyte supernatant and values lipid-releasing leukocytes ability (LRLA). We found that for patients with OALA characterized by a higher concentration of LP (a) and CRP in the leukocyte supernatant than in other groups of observations, which indicates that reparative and inflammatory orientation occurring in these patients processes. At patients with OALA with signs of unstable plaques and proximal type of arterial lesions in the leukocyte supernatant usually revealed CRP, and when the distal type of lesion of the vascular bed - defensin alpha (1-3), which explains the predominant mechanisms of inflammatory response (infectious and noninfectious type) in different clinical situations. Value LRLA has a direct moderate strength relationship with the ankle-brachial index, which indicates the value of this parameter as a marker of the severity of atherosclerotic lesions.

Keywords: obliterating atherosclerosis of lower limb arteries, neutrophil, proteins, inflammation.

Облитерирующий атеросклероз артерий нижних конечностей (ОААНК) - актуальная проблема современного здравоохранения. Распространенность ОААНК на основе измерения лодыжечно-плечевого индекса (ЛПИ) колеблется от 4% среди лиц 40 до 65 лет и до 15 - 20% среди лиц старше 65 лет [2; 5]. Исследования, направленные на поиск новых маркеров атерогенеза, тесно связаны с изучением его фундаментальной сущности, которая, несмотря на длительный срок изучения, до сих пор не ясна. В последнее время все больше оснований

рассматривать атеросклероз как сложный процесс, которому предшествует и который сопровождает воспаление [7].

Непременными участниками воспаления являются лейкоциты. Известно, что хронически повышенный уровень лейкоцитов связан с увеличением долгосрочного риска ишемического инсульта, инфаркта миокарда или сосудистой смерти [4]. Роль моноцитов и лимфоцитов в атерогенезе хорошо изучена [6]. Вопреки давней и широко распространенной мысли, что роль нейтрофилов малоактуальна в рамках атерогенеза, доказательства из биологии нейтрофилов и проведенные исследования воспалительных и инфекционных заболеваний наводят на мысль, что эти клетки вносят важный вклад в патогенез атеросклероза и его осложнений, поскольку они способны воспринимать сигналы из внешней среды для выполнения иммунных программ, которые играют важную роль в деле координации воспалительного ответа и его разрешения [3].

В настоящем исследовании предпринята попытка изучить некоторые сывороточные и лейкоцитарные факторы риска у больных ОААНК.

Целью исследования было изучение лейкоцитарных и сывороточных факторов риска у больных ОААНК.

Материалы и методы исследования

Обследовано 52 пациента с ОААНК среднего возраста 61,7 (percentile 10% - 52, percentile 90% - 72) года. Среди обследованных преобладали мужчины (52%), курящие (72%), лица с отягощенным семейным анамнезом по атеросклерозу (57%). У 3% пациентов этой группы была 1 стадия хронической артериальной недостаточности (ХАН), у 6% - 2а стадия ХАН, у 67% - 2б стадия ХАН, у 12% - 3а стадия ХАН, у 5% - 3б стадия ХАН и у 7% - 4 стадия ХАН. Группу сравнения составили 33 практически здоровых человека среднего возраста 52,7 (percentile 10% - 41, percentile 90% - 62) года. Среди них было 66% мужчин, преобладали некурящие лица (62%), у большинства обследованных не выявлялось отягощенного семейного анамнеза по атеросклерозу (72%). Всем лицам групп наблюдения и сравнения выполнена, помимо общеклинического обследования (определение дистанции безболевого ходьбы, ультразвуковое исследование сосудов), специальная исследовательская программа, включавшая исследование посредством иммуноферментного анализа (ИФА) сывороточной концентрации С-реактивного белка (СРБ), липопротеина (а)(ЛП_а), NT фрагмента предшественника мозгового натрийуретического белка (NT-proBNP), VII фактора свертывания крови (VII_ф), дефензинов альфа (1-3), белка, связывающего жирные кислоты (БСЖК), интерлейкина 6 (ИЛ-6), интерлейкина 8 (ИЛ-8), фактора некроза опухоли альфа (ФНО-альфа), определение липидвысвобождающей способности лейкоцитов (ЛВСЛ) по методике А.В. Туева и В.Ю. Мишланова. Для решения цели исследования специально

разработан метод определения содержания белков при помощи ИФА в лейкоцитарных супернатантах [1]. В супернатантах изучалось содержание СРБ, ЛПа, дефензинов альфа (1-3), VIIф, NT-proBNP, фактора Виллебранта (ФВ). Статистическая обработка результатов производилась при помощи программного пакета «Статистика 8.0».

Результаты исследования и их обсуждение

По данным дуплексного сканирования артерий нижних конечностей, средний процент стеноза в исследуемых артериях составил 96% (percentil 10/90- 30/100). При этом получена слабая корреляция степени стеноза артерий и тяжести ХАН ($R=0,2$, p менее 0,05), что свидетельствует о возможной активации механизмов ишемического прекондиционирования и развития коллатерального кровотока у данной категории пациентов. Была произведена оценка морфологической структуры атеросклеротических бляшек по данным дуплексного сканирования артерий нижних конечностей. Имеющиеся у пациентов бляшки разделены на следующие типы: 1 тип - плотные гомогенные бляшки (12%), 2 тип – гиперэхогенные бляшки с кальцинозом (42%); 3 тип - гетерогенные бляшки (13%); 4 тип – бляшки с признаками тромбоза (33%). Кроме того, проведена оценка типа уровня поражения артерий: 1 тип - дистальное поражение (5%), 2 тип - проксимальное поражение (53%), 3 тип - тотальное поражение (42%).

Всем пациентам с ОААНК проведено специальное исследование белковых и липидных факторов (таблица 1). Показано, что у больных ОААНК были выше, чем у здоровых лиц, содержание в супернатантах СРБ, ЛПа, в сыворотке - дефензинов, а также величина ЛВСЛ. Исходя из анализа значений Area Under Curve (AUC), исследуемые биомаркеры разделены следующим образом. Величина ЛВСЛ более 0,15 ммоль/л (AUC – 0,7), содержание в лейкоцитарных супернатантах СРБ более 20 мкг/л (AUC-0,69), в сыворотке дефензинов альфа более 1000 пг/мл (AUC-0,74) расцениваются как хорошие разделительные критерии между больными ОААНК и здоровыми лицами. Концентрация в супернатантах ЛПа более 40 нг/мл (AUC-0,97) - отличный критерий разделения больных ОААНК и здоровых.

Построена диаграмма Парето как для всей группы больных ОААНК (диаграмма 1), так и по подгруппам в зависимости от экоструктуры бляшек (диаграмма 2 и 3) и уровня поражения артериального русла нижних конечностей (диаграмма 4-5).

Статистическая значимость отличий между группой больных облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей и здоровых лиц (статистика U Манна-Уитни)

| Показатель | Группа больных ОААНК Median (percentil 10/90) | Здоровые лица Median (percentil 10/90) | Достоверность различий (N>20), p-level |
|---------------|--|---|---|
| ЛВСЛ, ммоль/л | 0,16 (0,09/0,24) | 0,13(0,1/0,15) | 0,01 |

| | | | |
|---|----------------------|-------------------------|-------------|
| СРБ в сыворотке, мг/л | 4,82 (0,45/19,12) | 2,30 (0,22/2,3) | 0,96 |
| СРБ в супернатанте, мкг/л | 59,16 (9,15/189,3) | 18,34 (1,7/32,6) | 0,04 |
| ЛПА в супернатанте, нг/мл | 56,54 (41,09/61,7) | 25,60 (13,53/45,85) | 0,02 |
| ФВ в супернатантах, ЕД/мл | 0,04(0,01/0,06) | 0,04(0,01/0,05) | 0,97 |
| VII фактор свертываемости в сыворотке, нг/мл | 0,96(0,27/1,53) | 1,92 (0,8/1,92) | 0,3 |
| VII фактор свертываемости в супернатанте, нг/мл | 0,2 (0/0,28) | 0,26 (0/0,51) | 0,7 |
| NT-proBNP в сыворотке, пг/мл | 114,67 (0/561,89) | 39,38(0/120,35) | 0,5 |
| NT-proBNP в супернатанте, пг/мл | 6,25(0/22,88) | 18,25 (0/35,39) | 0,3 |
| Дефензины в сыворотке, пг/мл | 1779,8(419,6/4888) | 626,37 (270,40/1376,00) | 0,04 |
| дефензины в супернатанте, пг/мл | 147933(31260/200000) | 117206,1(11420/200000) | 0,1 |
| ИЛ 6 в сыворотке, пг/мл | 9,4 (8/10) | 1,04 (0,8/1,5) | 0,09 |
| ИЛ 8 в сыворотке, пг/мл | 4,59 (0/17,7) | 5,34 (0/24,4) | 0,1 |

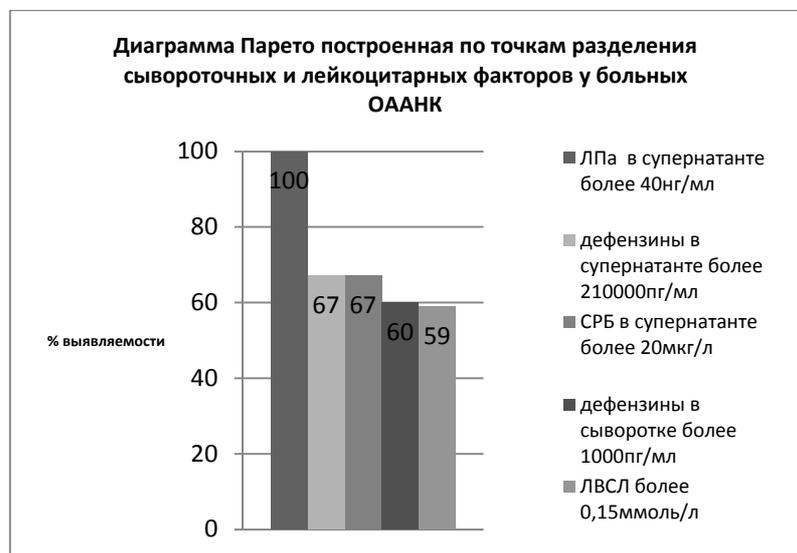


Диаграмма 1.

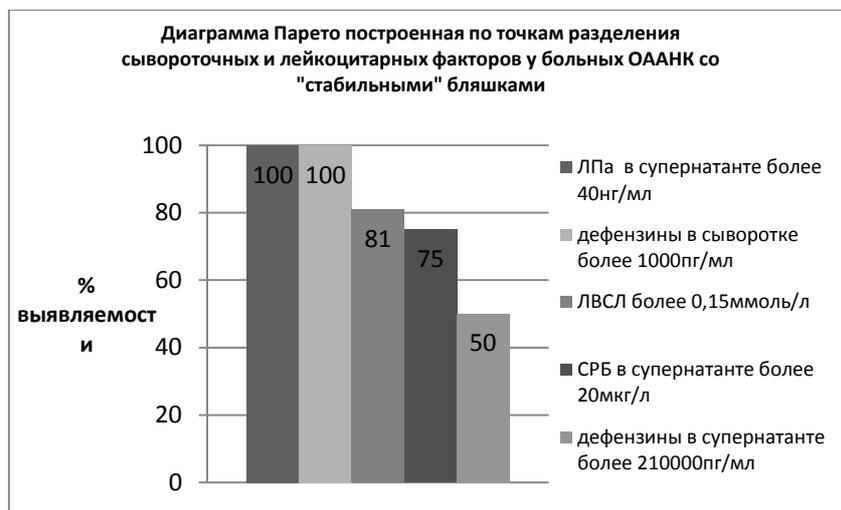


Диаграмма 2.

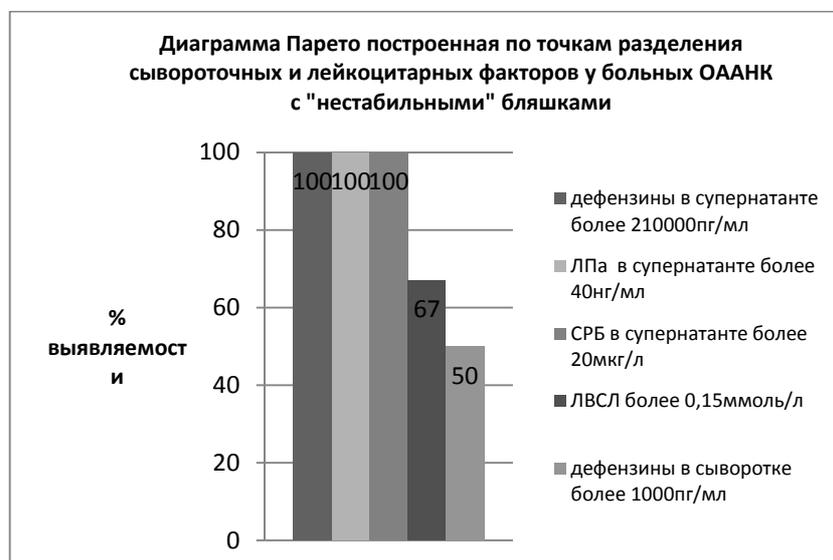


Диаграмма 3.

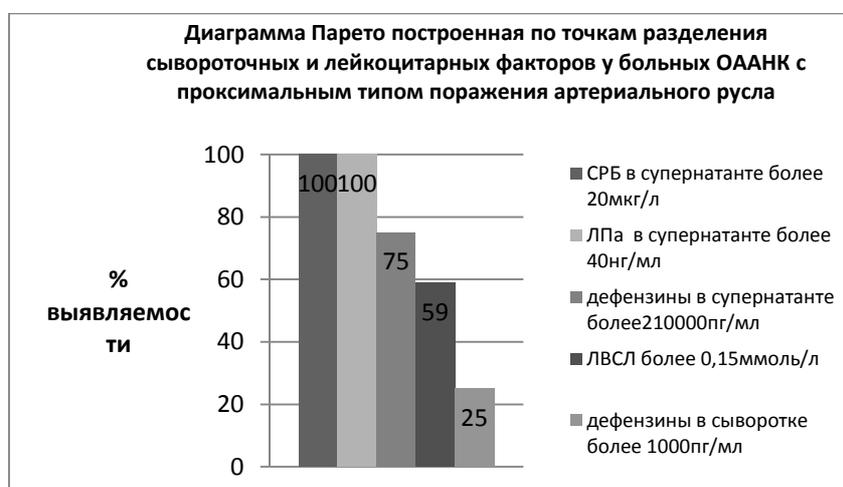


Диаграмма 4.

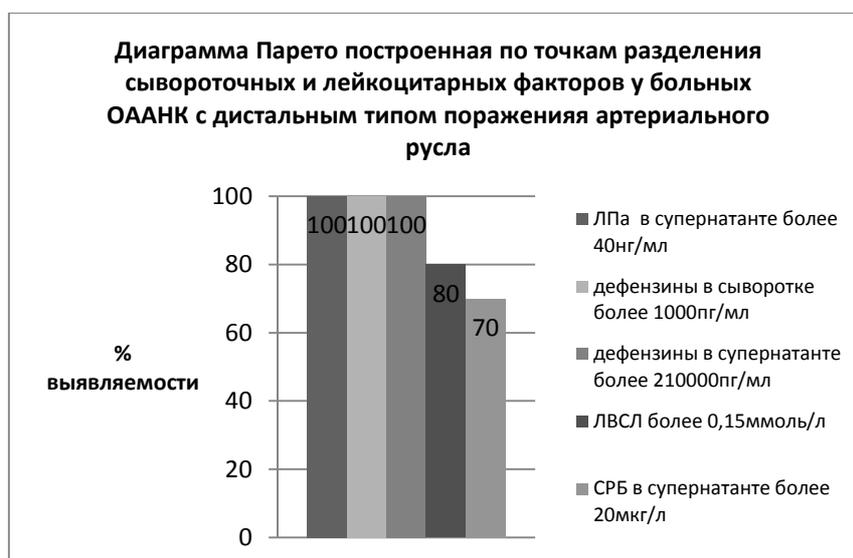


Диаграмма 5.

Анализ построенных диаграмм Парето позволяет говорить о том, что у больных ОААНК наиболее часто выявляемый белковый фактор в лейкоцитарных супернатантах - ЛПА. При появлении признаков нестабильности бляшки возрастает частота выявляемости в лейкоцитарных супернатантах СРБ. Проксимальный тип поражения артериального русла также ассоциирован с более частым обнаружением в супернатантах СРБ, а при дистальном типе - дефензинов-альфа.

Для решения задачи комплексной оценки выявленных различий от здоровых лиц белково-пептидного паттерна больных ОААНК выбраны следующие показатели: концентрация в супернатантах СРБ, ЛПА, а также сывороточное содержание дефензинов и величина ЛВСЛ. Выполнен логистический регрессионный анализ, в результате которого получено следующее уравнение регрессии

$$y = -0,775 + 2,117 * x_1 + 0,00389 * x_2 + 0,0153 * x_3 + 0,000080777 * x_4,$$

где x_1 - величина ЛВСЛ, x_2 - концентрация в супернатантах СРБ, x_3 - концентрация в супернатантах ЛПА, x_4 - сывороточная концентрация дефензинов.

Для оценки эффективности построенной модели для разделения больных ОААНК и здоровых проведен ROC-анализ. Данная модель по показателю AUC имеет отличные разделительные свойства.

В ходе корреляционного анализа установлена отрицательная умеренной силы взаимосвязь между величиной ЛВСЛ и ЛПИ, интегрально характеризующих тяжесть сосудистых поражений ($R = -0,48, p = 0,001$).

Таким образом, результаты исследования показали, что больные ОААНК отличались увеличением ЛВСЛ, а также концентраций СРБ и ЛПА в супернатантах лейкоцитарных культур и дефензинов-альфа в сыворотке. Определены оптимальные точки разделения для

изучаемых лейкоцитарных и сывороточных факторов, на основании которых выбраны показатели (концентрация в сыворотке дефензинов альфа, в супернатантах СРБ и ЛПА, а также величина ЛВСЛ) для создания математической модели, описывающей белково-пептидный паттерн, характерный для больных ОААНК.

Выводы

1. Для больных облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей характерна более высокая концентрация липопротеина (а) и С-реактивного белка в лейкоцитарных супернатантах, что указывает на репаративную и провоспалительную направленность происходящих у этих пациентов процессов.

2. У больных облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей при наличии признаков нестабильной бляшки и проксимального типа поражения артериального русла в лейкоцитарных супернатантах чаще выявляется С-реактивный белок, а при дистальном типе поражения сосудистого русла - дефензины альфа (1-3), что объясняется преобладающими механизмами провоспалительного ответа (инфекционного и неинфекционного типа) в разных клинических ситуациях.

3. Величина ЛВСЛ имеет прямую умеренной силы связь с лодыжечно-плечевым индексом, что указывает на значение этого показателя как маркера тяжести атеросклеротического поражения.

Список литературы

1. Мишланов В.Ю. Способ оценки белоксинтезирующей функции лейкоцитов для клинических исследований / В.Ю. Мишланов, В.Е. Владимирский, И.В. Мишланова // № 2530593 от 14.08.2014.
2. Покровский А.В. Клиническая ангиология. - М. : Медицина, 2004. – Т. 1. – 808 с.
3. Baetta Roberta. Role of polymorphonuclear neutrophils in atherosclerosis: Current state and future perspectives/Roberta Baetta, and Alberto Corsini // *Atherosclerosis*. - 2010. - V. 210. – I. 1. - P. 1-13
4. Collier B. Leukocytosis and ischemic vascular disease morbidity and mortality: is it time to intervene? // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2005. - V. 25. - P. 658-670.
5. Cronenwett Jack L. Rutherford's Vascular Surgery / Jack L. Cronenwett, and K. Wayne Johnston. - Eighth Edition. – 2014. - Chapter 5. – P. 66-77.
6. Hansson G. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease // *N Engl J Med.* – 2005. - V. 352. – P. 1685-1695.

7. Koenig W. Inflammation and coronary heart disease: an overview // *Cardiol Rev.* - 2001. - V. 9 (1). - P. 31-35.

Рецензенты:

Зиньковская Т.М., д.м.н., профессор кафедры терапии, семейной медицины ДПО ГБОУ ВПО «ПГМУ им. ак. Е.А. Вагнера» Минздрава России, г. Пермь;

Шаврин А.П., д.м.н., доцент кафедры терапии, семейной медицины ДПО ГБОУ ВПО «ПГМУ им. ак. Е.А. Вагнера» Минздрава России, г. Пермь.