

ЛЕЙКОЦИТАРНЫЕ И СЫВОРОТОЧНЫЕ ФАКТОРЫ РИСКА СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ У БОЛЬНЫХ ГИПЕРТЕНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ НАЧАЛЬНЫХ СТАДИЙ

Сыромятникова Л.И.¹, Владимирский В.Е.¹, Мишланов В.Ю.¹

¹ГБОУ ВПО «Пермский государственный медицинский университет им. ак. Е.А. Вагнера» Минздрава России, Пермь, Россия (614000, Пермь, ул. Петропавловская, 26), e-mail: vladimirskii_v@mail.ru

Проведено клиническое исследование сывороточных и лейкоцитарных факторов риска сердечно-сосудистых заболеваний у больных гипертонической болезнью (ГБ). 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. У больных ГБ начальных стадий отмечались более высокие, чем у здоровых лиц, концентрации в сыворотке дефензинов альфа, а в лейкоцитарных супернатантах – дефензинов-альфа и NT-proBNP. Величина ЛВСЛ у больных с доклинической стадией атеросклеротического поражения значимо не отличалась от таковой здоровых лиц. Данный факт указывает на более раннее изменение белокпродуцирующей функции лейкоцитов, чем способности последних высвобождать белково-липидные комплексы. Определены оптимальные точки разделения для изучаемых лейкоцитарных и сывороточных факторов, на основании которых выбраны показатели (концентрация в сыворотке дефензинов-альфа, а в супернатантах дефензинов-альфа и NT-proBNP) для создания математической модели, описывающей белково-пептидный паттерн характерный для больных ГБ.

Ключевые слова: гипертоническая болезнь, атеросклероз, нейтрофил, воспаление, белки.

LEUKOCYTE AND SERUM RISK FACTORS FOR CARDIOVASCULAR DISEASE IN HYPERTENSIVE PATIENTS WITH INITIAL STAGES

Siromyatnikova L.I.¹, Vladimirskiy V.E.¹, Mishlanov V.Y.¹

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

Clinical study of serum and leukocyte risk factors for cardiovascular disease in patients with arterial hypertension (AH). All patients underwent the study of the concentration of C-reactive protein (CRP), lipoprotein (a) (Lp(a)), defensins alpha(1-3), the factor of Villebrand (FV), NT fragment of precursor brain natriuretic peptide (NT-proBNP), factor VII clotting (VIIF) in serum and leukocyte supernatant and values lipid-releasing leukocytes ability (LRLA). In patients with AH initial stages serum concentration of defensins-alpha, and in the leukocyte supernatant - defensins-alpha and NT-proBNP had higher than in healthy individuals. The values LRLA in patients with preclinical stage of atherosclerotic lesions did not significantly differ from those of healthy persons. This fact points to an earlier change proteinproducer function of leukocytes than the ability to release protein-lipid complexes. The optimal split point for studying leukocyte and serum factors on the basis of which the selected indicators (concentration in serum defensins-alpha, and supernatant of defensins-alpha and NT-proBNP), to create a mathematical model describing protein-peptide pattern characteristic of patients with AH.

Keywords: arterial hypertension, atherosclerosis, neutrophil, inflammation, proteins.

В течение последних десятилетий появилось понимание того, что большинство сердечно-сосудистых заболеваний объединено в единый континуум [3]. Доказано, что гипертоническая болезнь (ГБ), поражающая до 39-45% взрослого населения развитых стран, является одним из ведущих факторов риска атеросклероза и по сути представляет собой доклиническую фазу атеросклероза, так как присущая ей эндотелиальная дисфункция и гидродинамическая травма сосудистой стенки облигатно инициируют процесс атеросклеротического поражения [4, 7].

В последние годы по-новому осмысливается значение нейтрофилов в атерогенезе. Нейтрофилы являются первыми лейкоцитами проникающими в воспаленные ткани. Однако продолжительность жизни нейтрофилов в сосудистой стенке редко превышает 24 часа. В связи с этим при проведении рутинных гистологических исследований эти клетки редко обнаруживались в человеческих атеромах. Тем не менее ранний приток нейтрофилов был описан в нескольких экспериментальных моделях повреждения сосудов, в том числе эндотоксин-индуцированного повреждения [5], высушивания [6], транслюминальной травмы [8]. В целом, вопреки давней и широко распространенной мысли, что роль нейтрофилов малоактуальна в рамках формирования атеросклеротического поражения, 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 программ, которые играют важную роль в деле координации воспалительного ответа и его разрешения.

В настоящем исследовании предпринята попытка изучить роль нейтрофилов и продуцируемых ими белково-пептидных факторов, а также ряда «дополнительных» сывороточных факторов риска сердечно-сосудистых заболеваний у больных ГБ начальных стадий.

Цель исследования изучить сывороточные и лейкоцитарные (нейтрофильные) факторы риска сердечно-сосудистых заболеваний у больных ГБ I и II стадий.

Материалы и методы исследования

Обследовано 25 пациентов с ГБ I и II стадиями среднего возраста 56,5 (percentile 10% – 47, percentile 90% – 65) лет. В данной группе преобладали мужчины (77%), некурящие (59%) и лица с отягощенным семейным анамнезом по атеросклерозу (67%). Критерием включения в группу наблюдения было отсутствие признаков атеросклероза на основании клинических и инструментальных исследований (нагрузочные пробы, дуплексное сканирование артерий). Группу сравнения составили 33 практически здоровых человека среднего возраста 52,7 (percentile 10% – 41, percentile 90% – 62) лет. 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 проведена, помимо общеклинического обследования (тест шестиминутной ходьбы с on-line мониторингом частоты сердечных сокращений [1], ультразвуковое исследование сердца и сосудов), выполнена специальная исследовательская программа, включавшая исследование посредством иммуноферментного анализа (ИФА) сывороточной концентрации С-реактивного белка (СРБ), липопротеина

(а)ЛПА), NT фрагмента предшественника мозгового натрийуретического белка (NT-proBNP), VII фактора свертывания крови (VIIф), дефенинов альфа (1-3), белка связывающего жирные кислоты (БСЖК), интерлейкина 6 (ИЛ-6), интерлейкина 8 (ИЛ-8), фактора некроза опухоли альфа (ФНО-альфа), определение липидвысвобождающей способность лейкоцитов (ЛВСЛ) по методике А.В. Туева и В.Ю. Мишланова. Для решения цели исследования специально разработан метод определения при помощи ИФА содержания белков в лейкоцитарных супернатантах [2]. В супернатантах изучалось содержание СРБ, ЛПА, дефенинов альфа (1-3), VIIф, NT-proBNP, фактора Виллебранда (ФВ).

Результаты исследования и их обсуждение

Структура тяжести ХСН у пациентов с ГБ начальных стадий была следующей: 32% не имели признаков ХСН, 36% – I ФК ХСН и 32% – II ФК ХСН. Среди пациентов с ГБ 86% не имели морфо-функциональных нарушений сердца, а 14% соответствовали критериям бессимптомной дисфункции миокарда (БДМ). При этом средние значения ультразвуковых (УЗ) показателей были в нормативной зоне. Проведенный корреляционный анализ выявил обратную сильную взаимосвязь функционального класса (ФК) хронической сердечной недостаточности (ХСН) (по данным теста 6 минутной ходьбы с on-line мониторинг ЧСС) с фракцией выброса левого желудочка (ФВ ЛЖ) ($R=-0,7$, p менее 0,05) и прямую умеренной силы с толщиной межжелудочковой перегородки (МЖП) ($R=0,5$, p менее 0,05).

Проведено сравнение полученных результатов специального обследования с данными здоровых лиц (таблица 1). Результаты анализа показали, что у больных ГБ, по сравнению со здоровыми лицами, содержание в сыворотке ЛПА и дефенинов-альфа было достоверно выше, что свидетельствует о тромбофилии и напряжении противомикробной защиты. При этом в лейкоцитарных супернатантах этих больных выявлялась значимо более высокая концентрация NT-proBNP и дефенинов-альфа, чем у здоровых, что может указывать на изменение способности лейкоцитов к высвобождению факторов противoinфекционной защиты и адаптационных молекул.

Таблица 1

Статистическая достоверность отличий изучаемых биомаркеров у больных гипертонической болезнью I-II стадии и здоровыми лицами (статистика U Манна-Уитни)

Показатель	ГБ I-II стадии Median (percentel 10/90)	Здоровые лица Median (percentel 10/90)	Достоверность различий, p-level
ЛВСЛ, ммоль/л	0,12(0,07/0,16)	0,13(0,1/0,15)	0,67
СРБ в сыворотке, мг/л	4,12 (1,66/15,25)	2,30 (0,22/2,3)	1,00
СРБ в супернатанте, мкг/л	55,9 (18,3/130)	18,34 (1,7/32,6)	1,00
ЛПА в сыворотке,	39,89 (22,05/68,75)	8,68 (5,66/8,68)	0,04

нг/мл			
ЛПА в супернатанте, нг/мл	52,19(32,5/84,00)	25,60 (13,53/45,85)	1,00
VII фактор свертываемости в сыворотке, нг/мл	4,93(2,53/7,28)	1,92 (0,8/1,92)	1,00
VII фактор свертываемости в супернатанте, нг/мл	2,37(0,78/4,74)	0,26 (0/0,51)	1,00
proBNP в сыворотке, пг/мл	142,33 (10,00/151,50)	39,38(0/120,35)	0,16
proBNP в супернатанте, пг/мл	138,14 (47,46/277,98)	18,25 (0/35,39)	0,03
Дефензины в сыворотке, пг/мл	6577,54 (3390,80/11296,00)	626,37 (270,40/1376,00)	0,01
дефензины в супернатанте, пг/мл	518428,6 (109300,00/863000,00)	117206,1(11420/200000)	0,05
ИЛ 6 в сыворотке, пг/мл	2,48 (0,11/7,30)	1,04 (0,8/1,5)	0,16
ИЛ 8 в сыворотке, пг/мл	8,52 (0/27,3)	5,34 (0/24,4)	0,06

Проведена оценка разделительной эффективности полученных различий между группами больных ГБ и практически здоровых лиц путем проведения Receiver Operator Characteristic (ROC) анализа. Анализ значения Area Under Curve (AUC) показал, что точками разделения между здоровыми и больными ГБ являются концентрация дефензинов-альфа сыворотки более 1000 пг/мл (AUC-0,9), содержание в супернатантах NT-proBNP более 27 пг/мл (AUC-0,84) и дефензинов-альфа более 210000 пг/мл (AUC-0,72). В группе больных ГБ по точкам разделения этих показателей была построена диаграмма Парето, показавшая, что содержание дефензинов-альфа в сыворотке в 100% случаев превышало полученную выше точку разделения, NT-proBNP – в 80%, а значение ЛВСЛ только в 32% случаев (диаграмма 1).

Для комплексной оценки значимости различий паттерна белково-пептидных факторов больных ГБ и здоровых лиц выбраны: концентрация в супернатантах NT-proBNP и дефензинов-альфа, а также сывороточное содержание последних. Выполнен логистический регрессионный анализ, в результате которого получено следующее уравнение регрессии: $y=0,021+0,0030735*x_1+0,000107577*x_2-0,000000391*x_3$, где x_1 – концентрация в супернатантах proBNP, x_2 – сывороточная концентрация дефензинов, x_3 – концентрация дефензинов в супернатантах. Данная трехкомпонентная модель имела отличную разделительную эффективность по результатам проведенного ROC анализа (AUC-0,99) (диаграмма 2).

Диаграмма 1

Диаграмма Парето, построенная по «точкам разделения» больных ГБ и здоровых лиц

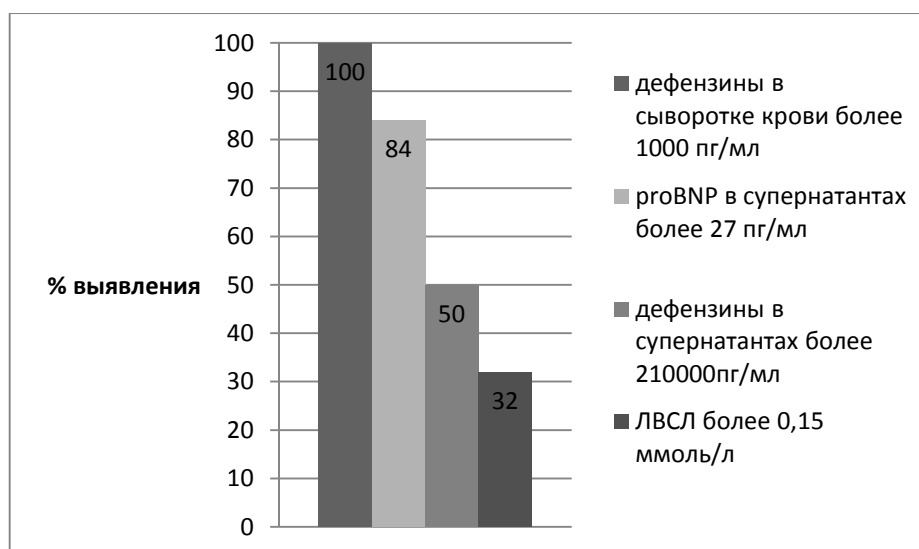
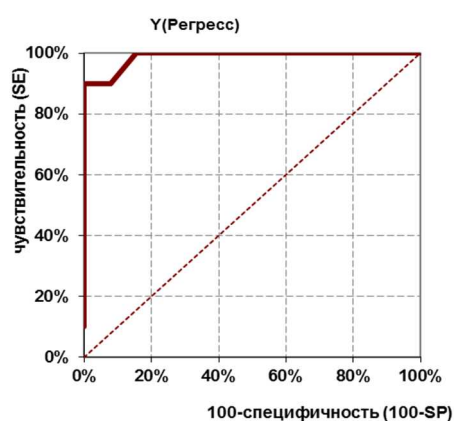


Диаграмма 2

ROC кривая построенная по значению γ у больных ГБ



Оценка взаимосвязи изучаемых показателей с ультразвуковыми параметрами сердца показала, что концентрация СРБ ($R=0,82$, $p=0,02$) и ИЛ-6 ($R=0,46$, $p=0,045$) в сыворотке имеет прямую связь с толщиной стенки левого желудочка (ЛЖ), а содержание ИЛ-6 и фракция выброса (ЛЖ) имеют умеренной силы обратную связь ($R=-0,49$, $p=0,02$).

Таким образом, у больных ГБ начальных стадий, в сравнении со здоровыми лицами, отмечались более высокие концентрации в сыворотке дефензинов-альфа, а в лейкоцитарных супернатантах – дефензинов-альфа и NT-proBNP. При этом величина ЛВСЛ у больных с доклинической стадией атеросклеротического поражения значимо не отличалась от таковых здоровых лиц, что указывает на более раннее изменение белокпродуцирующей функции лейкоцитов, чем способности последних высвобождать белково-липидные комплексы. Определены оптимальные точки разделения для изучаемых лейкоцитарных и сывороточных факторов, на основании которых выбраны показатели (концентрация в сыворотке дефензинов-альфа, а в супернатантах дефензинов-альфа и proBNP), для создания математической модели, описывающей белково-пептидный паттерн характерный для больных ГБ.

Выводы

1. Для больных начальными стадиями ГБ характерна субклиническая провоспалительная направленность патологических процессов, маркируемая высокими концентрациями в сыворотке и лейкоцитарных супернатантах дефензинов-альфа.
2. У больных ГБ, в сравнении со здоровыми лицами, в лейкоцитарных супернатантах обнаруживается высокое содержание NT-proBNP, что, возможно, отражает нейрогуморальную перестройку, происходящую в процессе развития сердечно-сосудистого континуума.

Список литературы

1. Мишланов В.Ю. Способ диагностики функционального класса хронической сердечной недостаточности у больных стенокардией/ В.Ю.Мишланов, В.Е. Владимирский, И.В. Мишланова, Е.А. Челебаева// № 2462175 от 28.02.2011.
2. Мишланов В.Ю. Способ оценки белок синтезирующей функции лейкоцитов для клинических исследований/ В.Ю. Мишланов, В.Е. Владимирский, И.В. Мишланова//№ 2530593 от 14.08.2014
3. Braunwald, E. Creating controversy where none exists: the important role of C-reactive protein in the CARE, AFCAPS/TexCAPS, PROVE IT, REVERSAL, A to Z, JUPITER, HEART PROTECTION, and ASCOT trials/E. Braunwald//Eur Heart J.- 2012.-V.33.-P.430-432
4. ESH/ESC Guidelines for the management of arterial hypertension // Eur Heart J. – 2013. – Vol. 34. – P. 2159–2219.
5. Prescott M.F.Development of intimal lesions after leukocyte migration into the vascular wall / M.F.Prescott, C.K. McBride, M. Court//Am J Pathol.- 1989.- V.135.- P.835-846.
6. Richardson M. Wound healing in the media of the normolipemic rabbit carotid artery injured by air drying or by balloon catheter de-endothelialization/ M. Richardson, M.W. Hatton, M.R. Buchanan//Am J Pathol. – 1990. – V. 137. – P.1453-1465.
7. Roger, V. Heart disease and stroke statistics–2012 update: a report from the American Heart Association/ V.Roger, A. Go, D. Lloyd-Jones//Circulation. – 2012. – V.125. – P. 202-220.
8. Roque M. Mouse model of femoral artery denudation injury associated with the rapid accumulation of adhesion molecules on the luminal surface and recruitment of neutrophils/ M. Roque, J. Fallon, J. Badimon // Arterioscler Thromb Vasc Biol. – 2000. – V.20. – P. 335-342.

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.