УДК 616.1:577.29-07(045)

ЗНАЧЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ В ДИАГНОСТИКЕ СОСУДИСТОЙ ПАТОЛОГИИ

Никитина В.В., Захарова Н.Б., Гладилин Г.П., Каменских Т.Г., Козарезова О.В.

ГОУ ВПО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И.Разумовского Минздравсоцразвития России», Саратов, e-mail: vik-nik72@mail.ru

В настоящее время продолжается рост сердечно-сосудистой патологии, которая является одной из основных причин смерти среди взрослого населения. Большое значение придается выбору молекулярных маркеров, их значению в формировании сосудистых расстройств. Представлены данные собственных исследований, выявлены молекулярные маркеры, с максимальной чувствительностью и специфичностью участвующие в формировании эндотелиальной дисфункции.

Ключевые слова: моноцитарный хемоатрактант-1, фактор роста эндотелия сосудов, эндотелин – 1, ИЛ-6, чувствительность, специфичность

VALUE OF MOLECULAR MARKERS IN DIAGNOSTICS OF A VASCULAR PATHOLOGY

Nikitina V.V., Zaharova N.B., Gladilin G.P., Kamenskih T.G., Kozarezova O.V.

Saratov State Medical University n.a. V.I. Razumovskiy, Saratov, e-mail: vik-nik72@mail.ru

At present lasts the growing to cardiovascular pathology, which is one of the main reasons to deaths amongst adult population. Big importance is added choice molecular marker, their importance in shaping vascular frustration. Will Presented given own studies, are revealled molecular markers, with maximum sensitivity and specificity, participating in shaping endothelial to dysfunctions.

Keywords: monocytic chemotactic protein-1, vascular endothelial growth factor, endothelial – 1, IL-6, sensitivity, specificity

Цереброваскулярные нарушения являются распространенной и частой причиной смертности населения во всем мире [4]. Проявлением этих нарушений является атеросклеротическое поражение сосудистого русла. Доля смертности от сердечно-сосудистых заболеваний в России достигает 56% [1, 2]. Это свидетельствует о низкой выявляемости, поздней обращаемости пациентов и, как следствие, развитии стойких изменений в сосудистой стенке, приводящих к инвалидизации и смертности населения.

В связи с этим исследование механизмов развития поражения сосудистой стенки является важным этапом создания новых эффективных методов профилактики и лечения сосудистых нарушений [3, 7]. Актуальной становится задача поиска современных механизмов ранней диагностики сосудистых изменений, что значительно повысит показатели медицинской реабилитации, профилактики и качество жизни больных с сосудистой патологией.

В настоящее время в основу лабораторной диагностики поражений сосудистой стенки положено изменение маркеров дислипопротеинемии, воспаления и эндотелиальной дисфункции. По данным литературы [8], изменения уровней липопротеинов не объясняют всех случаев риска сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ): 50% всех коронарных приступов и инсультов происходят в отсутствии гиперхолестеринемии, а 20% всех сердечно-сосудистых событий происходит при отсутствии какого-либо из основных факторов сердечно-сосудистых рисков [5].

В последние годы особое внимание уделяют исследованию диагностической эффективности определения уровня молекулярных маркеров, характеризующих функциональное состояние эндотелиальной выстилки сосудистого русла. В связи с этим привлекают внимание моноцитарный хемоатрактант – 1 (МСР-1) и фактор роста эндотелия сосудов (ФРЭС), которые отражают взаимосвязанные, но разные стороны патологических процессов, происходящих при сосудистых нарушениях [6].

Целью исследования явилось определение диагностического значения уровня молекулярных маркеров в сыворотке крови при атеросклеротическом поражении сосудистого русла у больных с хронической ишемией 1–2 степени (ХИГМ 1–2 ст.) и сахарным диабетом 1–2 типа (СД 1–2 типа), осложненным диабетической ретинопатией (ДР).

Материалы и методы исследования

Проведено обследование 89 пациентов с ХИГМ 1–2 ст., в возрасте от 28 до 60 лет и 120 пациентов (240 глаз) с СД 1–2 типа, осложненным ДР в возрасте от 18 до 60 лет. Больные находились на обследовании и лечении в клиниках ГОУ ВПО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского» Минздравсоцразвития России.

Неврологический и эндокринологический статусы оценивались по общепринятой схеме.

Группу сравнения составили 18 лиц в возрасте от 18 до 60 лет без клинических проявлений сосудистой патологии.

Критериями включения в группе сравнения было: возраст от 18 до 60 лет, не имеющими СД 1–2 типа и его осложнения, с нормальными значениями артериального давления, а также добровольное согласие людей на участие в исследованиях.

Критерии исключения: возраст старше 60 лет, почечная и печеночная недостаточность, эндокринные нарушения, инфекционные заболевания, энцефалопатии несосудистого генеза, онкологические процессы, экзо-/эндогенная интоксикация, неврологические проявления остеохондроза позвоночника, церебральные жалобы, сосудистые заболевания в анамнезе, признаки хронической церебральной ишемии, нарушение толерантности к глюкозе, алкоголизм.

Исследование липидного профиля (холестерин – ХС, холестерин окисленный липопротеинов низкой плотности – ХС-оЛПНП, холестерин липопротеинов высокой плотности – ХС-ЛПВП, триацилглицериды – ТАГ), С – реактивный белок (СРБ) проводились в сыворотке крови с использованием наборов фирмы DiaSys Diagnostic Systems GmbH, Germany;

Исследование содержания цитокинов (ИЛ-6, MCP-1), эндотелиина-1, фактора роста эндотелия сосудов (ФРЕС) в сыворотке крови было проведено методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием тест-систем и реактивов фирм «Вектор-Бест», «Новосибирск» РФ, Biosource, Europe S.A на иммуноферментном анализаторе Stat-Fax – 2100;

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием пакетов компьютерных программ Statistica v6.0 (StatSoft Inc.), SPSS 13.0 for Windows Office Excel 2007. Закономерности изменения содержания молекулярных маркеров в биоматериале исследовали методами описательной статистики (непараметрическая статистика с расчетом медианы, квартильного размаха, уровня достоверности различия между группами обследованных по критерию Манна – Уитни).

Все исследования были проведены на базе Центральной научно-исследовательской лаборатории ГОУ ВПО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского» Минздравсоцразвития России.

Результаты исследований и их обсуждение

Результаты исследований маркеров дислипопротеинемии и воспаления в сыворотке крови больных с ХИГМ 1–2 ст. и СД 1–2 типа показали, что некоторые изучаемые показатели (ХС, ХС-оЛПНП, ИЛ-6) относительно группы сравнения изменяются незначительно, но не во всех обследованных группах.

Максимальное увеличение показателей (ХС, ХС-оЛПНП, эндотелин-1, ИЛ-6), относительно референтных величин, отмечается в группе, которая представлена больными с СД, осложненным ДР. У больных с ХИГМ 1–2 ст. нарастает, по сравнению с нормальными значениями, только ХС-оЛПНП и эндотелин-1. Можно считать, что длительное воздействие на эндотелий повреждающих агентов (свободно-радикальное окисление липидов) ведет к изменению спектра выделяемых им веществ с усилением синтеза одних и торможением продукции других (табл. 1). Именно с активацией процессов перекисного окисления липидов, многие авторы связывают повышенное содержание в кровотоке ХС-оЛПНП [9]. В частности, наблюдаемое повышенние ХС-оЛПНП у всех обследованных больных приводит в последующем к развитию атеросклеротического поражения артерий сосудистого русла.

Таблица 1

Динамика изучаемых показателей у больных с ХИГМ 1–2 ст. и СД 1–2 типа

Изучаемые показатели	Референтные значения	Группа сравнения	Больные с СД 1–2 типа	Больные с ХИГМ 1–2 ст.
ХС (ммоль/л)	3,0–5,5	5,44 ± 1,12	7,43 ± 2,357**	4,7 ± 1,048
ТАГ(ммоль/л)	0–1,71	1,75 ± 0,83	1,09 ± 0,67	1,69 ± 0,68
ХС-оЛПНП (ммоль/л)	1,68–4,53	3,667 ± 1,075	5,56 ± 2,42**	5,64 ± 1,74**
ХС-ЛПВП (ммоль/л)	0,8–2,2	1,31 ± 0,38	1,57 ± 0,38**	1,07 ± 0,28
Эндотелин-1 (фмоль\мл)	0,26–0,34	0,82 ± 0,95*	5,68 ± 3,84**	1,82 ± 0,66**
СРБ (мг/мл)	0–10	0,6 ± 0,37	4,41 ± 3,84**	4,6 ± 0,52**
ИЛ-6(пг/мл)	0–10	2,8 ± 1,78	33,99 ± 24,21**	2,63 ± 1,15

Примечание: результаты представлены в виде средних значений ± – стандартная ошибка; * – статистически значимое отличие ($p < 0,05$) по сравнению с референтными значениями; ** – статистически значимое отличие ($p < 0,01$) по сравнению со значениями показателей группы сравнения.

Нами обнаружено выраженное увеличение содержания эндотелина – 1, (см. табл. 1) во всех обследованных группах, относительно референтных данных и группы сравнения. Увеличения содержания эндотелина-1 у лиц группы сравнения свидетельствует, по нашему мнению, о наличии у них нарушений в сосудистой стенке, протекающих без клинических проявлений. Других значимых изменений исследуемых лабораторных показателей в группе сравнения выявлено не было.

Из табл. 1 видно, что нарастание содержания СРБ у больных с ХИГМ 1–2 ст. и у больных СД 1–2 типа свидетельствует о наличии слабого воспалительного процесса (Verma, S. 2005).

Учитывая важную роль МСР-1 и ФРЭС в развитии ранних атеросклеротических изменений и в их прогрессировании, нами проведено исследование этих показателей для выявления их роли в формировании сосудистых расстройств (табл. 2).

Таблица 2

Динамика МСР – 1 и ФРЭС у больных с ХИГМ 1–2 ст. и СД 1 и 2 типа

Изучаемые показатели	Группа сравнения	Больные с СД 1–2 типа	Больные с ХИГМ 1–2 ст.
МСР-1 (пг/мл)	84 ± 18,42	102,7 ± 33,7*	189,08 ± 52,76*
ФРЭС (пг/мл)	33,21 ± 20,78	470,17 ± 362,15 *	435,05 ± 343,3*

Примечание: результаты представлены в виде средних значений ± – стандартная ошибка; * – статистически значимое отличие ($p < 0,05$) по сравнению со значениями показателей группы сравнения.

Нами выявлено достоверное увеличение ФРЭС в образцах сывороток крови больных во всех обследованных группах, по отношению к группе сравнения. Аналогичные изменения обнаружены нами и с МСР-1.

Для выявления маркеров, с максимальной чувствительностью и специфичностью участвующих в формировании эндотелиальной дисфункции при изучаемой патологии, был проведен ROC-анализ.

ROC-анализ включает в себя построение характеристических кривых, на которых ось *Y* отражает чувствительность показателя, а ось *X* – 100 % специфичность (рис. 1). Диагностический маркер рассматривается как эффективный при нижней границе доверительного интервала площади > 0,5 значения достоверности $p < 0,05$ (нулевая гипотеза – площадь под кривой равна 0,5). ROC-анализ дает представление об интегральной диагностической эффективности, позволяя отобрать наиболее значимые маркеры и отсеять малоинформативные, кроме того, ROC-анализ количественного диагностического признака позволяет выбрать оптимальный диагностический уровень маркера, основанный на подборе чувствительности и специфичности.

Площадь под кривой к 1 не приближается, низкие показатели статистической достоверности (табл. 3), указывают на то, что эндотелин-1 диагностически не значим при изучаемой патологии. При определении диагностического уровня при патологии ХИГМ 1–2 ст. этот показатель дает относительно низкую чувствительность и специфичность (рис. 2).

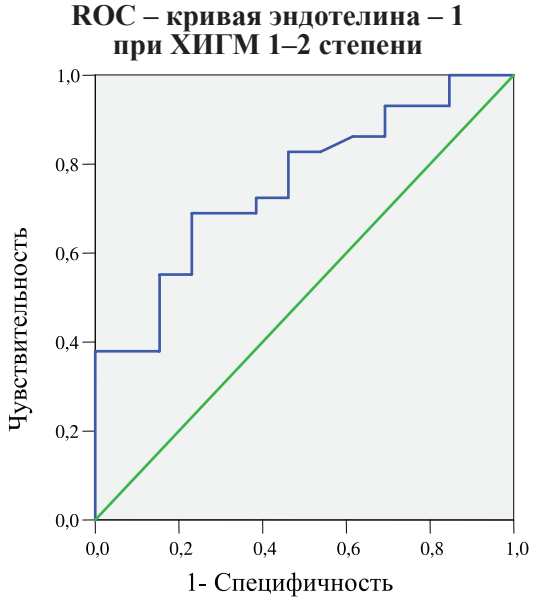

Рис. 1. Чувствительность и специфичность эндотелина-1 для диагностики ХИГМ 1–2 степени относительно группы сравнения

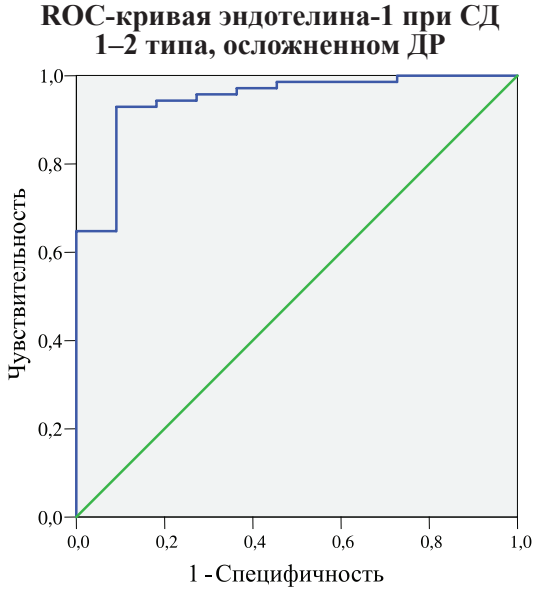

Рис. 2. Чувствительность и специфичность эндотелина-1 для диагностики СД 1–2 типа, осложненного ДР

Таблица 3

Доверительный интервал эндотелина – 1, (%) при ХИГМ 1–2 степени и СД 1–2 типа, осложненном ДР

Показатель	Площадь (AUC)	*p*	95% доверительный интервал
Эндотелин – 1 ХИГМ 1–2 ст.	0,755 ± 0,077	< 0,009	0,64 – 0,95
Эндотелин-1 СД 1–2 типа	0,94 ± 0,033	< 0,001	0,88 – 1,01

Анализ результатов, представленных в табл. 3 показал, что близкая к 1 площадь под кривой, а также высокие значения статистической достоверности, выявлены при СД 1–2 типа. Характеристики построенной кривой, позволили нам на следующем этапе обработки данных, выделить диагностический уровень этого показателя с высокими значениями чувствительности и специфичности.

Анализ диагностической эффективности ФРЭС показал достоверную значимость изучаемого показателя у обследуемых нами больных (рис. 3, 4). В обоих случаях ФРЭС обладает высокими диагностическими характеристиками (табл. 4). Следовательно, можно предположить, что реконструкция эндотелия под влиянием фактора роста при данных патологиях является более специфичной, чем активация макрофагально-моноцитарного звена и, следовательно, ФРЭС быстрее реагирует на сосудистую патологию, что положительно влияет на диагностическую чувствительность.

ROC – кривая ФРЭС при ХИГМ 1–2 степени

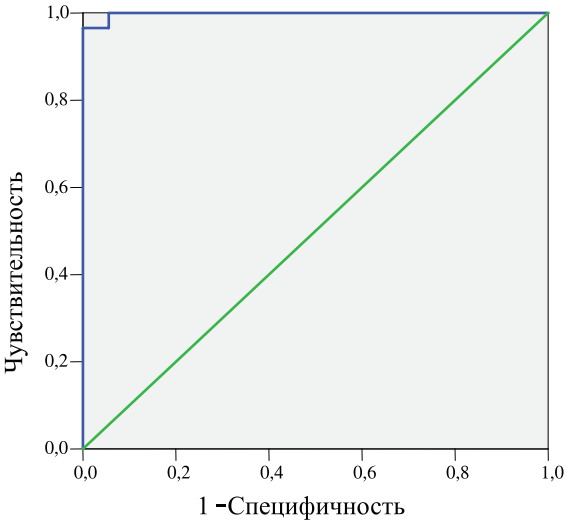

Рис. 3. Чувствительность и специфичность ФРЭС для диагностики ХИГМ 1–2 степени

ROC – кривая ФРЭС при СД 1–2 типа, осложненном ДР

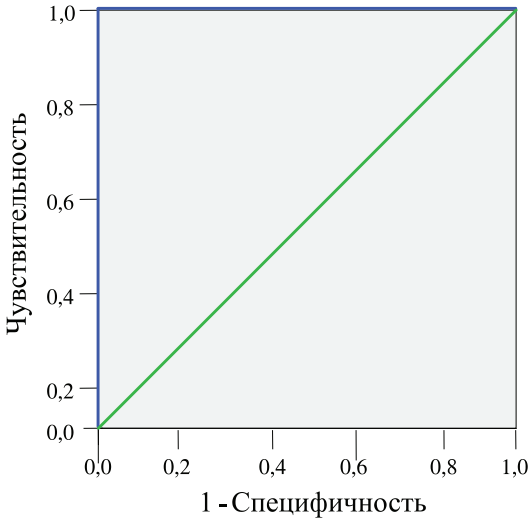

Рис. 4. Чувствительность и специфичность ФРЭС для диагностики СД 1–2 типов, осложненного ДР

Таблица 4

Доверительный интервал ФРЭС и МСР (%) при ХИГМ 1–2 типов и СД 1–2 типа, осложненном ДР

Показатель	Площадь (AUC)	*P*	95%-й доверительный интервал
ФРЭС ХИГМ 1–2 ст.	0,991 ± 0,011	< 0,001	0,971–1,012
ФРЭС СД 1–2 типа	0,98 ± 0,012	< 0,003	0,85–0,98
МСР-1 ХИГМ 1–2 ст.	0,987 ± 0,038	< 0,014	0,96–1,014
МСР-1 СД 1–2 типа	0,7 ± 0,01	< 0,09	0,51–0,89

При сравнении методом ROC-анализа уровней МСР-1 при ХИГМ 1–2 степени и СД 1–2 типов, осложненном ДР относительно группы сравнения, обнаружено, что наибольшими диагностическими характеристиками МСР-1 обладает при ХИГМ 1–2 степени (см. табл. 4).

Исходя из проведенного анализа, можно предложить точки отсечения (cuf of) для эндотелина-1, ФРЭС и МСР-1.

В табл. 5 приведены выбранные диагностические уровни молекулярных маркеров с указанием соответствующих им показателей диагностической значимости (чувствительности и специфичности по отношению к группе сравнения).

Таблица 5

Диагностический порог, чувствительность и специфичность молекулярных маркеров при сосудистой патологии

Показатель	Величина cut off (диагностический уровень)		Чувствительность		Специфичность	
	ХИГМ 1–2 ст.	СД 1–2 типа	ХИГМ 1–2 ст.	СД 1–2 типа	ХИГМ 1–2 ст.	СД 1–2 типа
Эндотелин-1	0,89 фмоль\мл	1,15 фмоль\мл	68 %	90 %	77 %	92 %
ФРЭС	92,3 пг/мл	123,4пг/мл	98 %	99 %	92 %	97 %
МСР-1	123,9 пг/мл	64,5 пг/мл	96 %	40 %	87 %	93 %

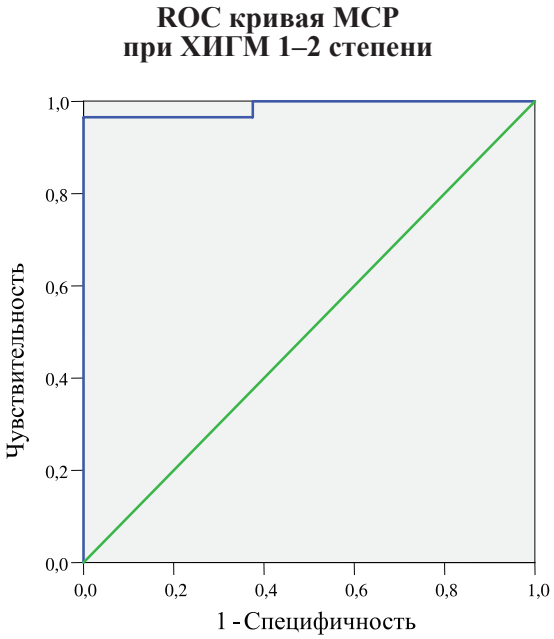

Рис. 5. Чувствительность и специфичность МСР-1 для диагностики ХИГМ 1–2 степени, относительно группы сравнения

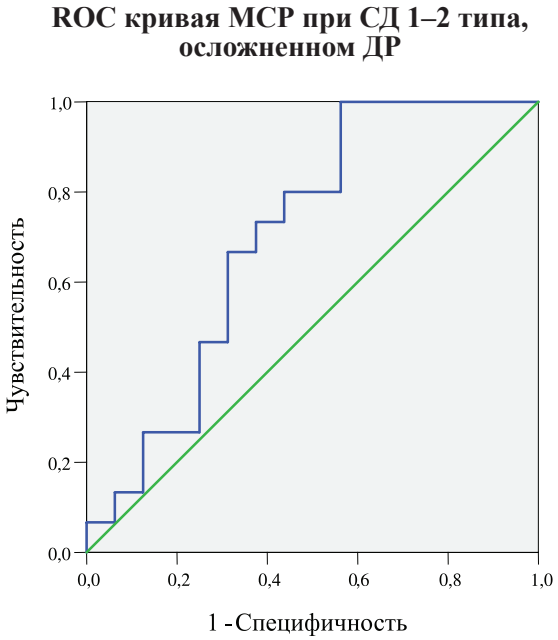

Рис. 6. Чувствительность и специфичность ФРЭС для диагностики СД 1–2 типов, осложненного ДР

Анализ полученных нами результатов позволяет сделать вывод о том, что изучаемые нами молекулярные маркеры могут использоваться для определения степени тяжести повреждения сосудистой стенки. Особого внимания заслуживает ФРЭС, так как именно он реагирует наиболее максимально при определении диагностических уровней у больных с сосудистой патологией.

Интересным оказался факт изменения МСР-1, при СД 1 и 2 типов, осложненного ДР. МСР-1 показал высокий уровень специфичности в сыворотке крови на фоне низкой чувствительности при незначительном нарастании этого хемокина в крови. По-видимому, у больных СД 1 и 2 типов воспалительный процесс на сосудах сетчатки глаза приводит к активации моноцитарно-макрофагальной системы и подъему МСР-1. Именно здесь, в сосудах сетчатки глаза, МСР-1 играет роль клеточного посредника контроля активации и миграции различных клеток крови (моноцитов, нейтрофилов, В-лимфоцитов) к очагу воспаления. Возможно, это один из универсальных механизмов ответной реакции сосудистой стенки.

В связи с этим при исследовании уровня МСР-1 в биологической жидкости глаз: слезной жидкости, стекловидном теле, он будет иметь очень высокую чувствительность и специфичность.

Высокие значения диагностических уровней эндотелина-1 свидетельствуют о признаках нарушения функционального состояния эндотелия, а также его дисфункции как при ХИГМ 1–2 степени, так и при СД 1–2 типа, что подтверждается повышением уровня ФРЭС.

ФРЭС оказался наиболее чувствительным и специфичным фактором, концентрация которого в крови увеличивается при наличии воспалительного процесса, сопровождающегося повышенной пролиферацией и реорганизацией микроциркуляторного русла.

Выводы

1. ФРЭС является значимым маркером для оценки сосудистой патологии.
2. Уровень эндотелина-1 служит дополнительным показателем сосудистой патологии и должен использоваться совместно с более специфичными маркерами, а в частности с ФРЭС.
3. MCP-1 можно использовать только как дополнение с более специфичными маркерами.

Список литературы

1. Молекулы адгезии sVCAM-1 и siCAM-1при различных формах ишемической болезни сердца / Д.Е. Гусев, Е.М. Пальцева, Б.Г. Потиевский, А.В. Родина, Е.В. Никифорова, Е.Г. Пономарь, Н.И. Раичевич, А.Л. Сыркин // Ишемическая болезнь сердца. – 2009. – №2. – С.11–14.

2. Смирнова А.В., Наумичева Н.Н.Солнечная активность и заболевания сердечно-сосудистой системы // Клин. Мед. – 2008. – №1. – С. 10–17.

3. Влияние валсартана, флувастатина XL и их комбинации на артериальное давление, показатели липидного обмена и эндотелиальную функцию у больных гипертонической болезнью / Г.Н. Соболева, О.А. Погорелова, Т.В. Кузнецова, В.П. Масенко, О.А. Фомичева, Н.А. Чернова, А.Н. Рогоза, Т.В. Балахонова, Ю.А. Карпов // Кардиология. – 2007. – №11. – С. 9–13.

4. Шевченко А.О., Эль-Бустани С. Плацентарный фактор роста – маркер неоартериогенеза у больных ИБС // Журнал для врачей «Лаборатория». – М., 2007. – № 4. – С. 3–7.

5. Ansell BJ, et al . Circulation. – 2003. – Vol. 108. – P. 2751–2756.

6. Chazov, EI. The peptide analogue of MCP-1 65-76 sequence is an inhibitor of inflammation / E.I. Chazov, J.D. Bespalova, T.I. Arefieva, N.B. Kukhtina, M.V. Sidorova, S.I. Provatorov, T.L. Krasnikova // Can J Physiol Pharmacol. – 2007. – Vol. 85, № 3–4. – P. 332–340.

7. Primary prevention of ischemic stroke: a guideline from the American Heart Association /American Stroke Association Stroke Council: cosponsored be the Atherosclerotic Peripheral Vascular Disease Interdisciplinary Working Group; Cardiovascular Nursing Council; Clinical Cardiology Council; Nutrition, Physical Activity, and Metabolism Council; and the Quality of Care and Outcomes Research Interdisciplinary Working Group / L.B. Goldstein, R. Adams, M.J. Alberts, L.J. Appel, L.M. Brass, C.D. Bushnell, A. Culebras, T.J. De Graba, P.B. Gorelick, J.R. Guyton, R.G. Hart, G. Howard, M. Kelly – Hayes, J.V. Nixon, R.L. Sacco // Circulation. – 2006. – Vol. 113. – P. 873–923.

8. Khot UN, et al. JAMA. – 2003. – Vol. 290, № 7. – P. 898–904.

9. Libby P., Ridker P.M., Maseri A. Circulation. – 2002. – №105(9) . – P. 1135–1143.

Рецензенты:

Пучиньян Д.М., д.м.н., профессор, зам. директора по научной работе ФГУ «СарНИИТО», г. Саратов;

Бородулин В.Б., д.м.н., профессор, зав. кафедрой биохимии ГОУ ВПО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского» Минздравсоцразвития России.

Работа поступила в редакцию 09.06.2011.