

УДК 577.35.085

Диагностика дисплазии соединительной ткани с использованием биомаркеров

Л.С. Эверт^а, С.В. Бороздун^а, Е.И. Боброва^а,
Е.С. Паничева^а, В.С. Кузнецов^а, С.В. Качин^{б*}
^а НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН,
Россия 660022, Красноярск, ул. П. Железняк, 3 а
^б Сибирский федеральный университет,
Россия 660041, Красноярск, пр. Свободный, 79 ¹

Received 16.11.2009, received in revised form 7.12.2009, accepted 15.12.2009

Обсуждаются методы и средства диагностики патологии различных органов и систем организма человека, связанной с дисплазией соединительной ткани (ДСТ). Предложен ряд соединений-биомаркеров для оценки морфофункциональных нарушений висцеральных и локомоторных органов, ассоциированных с ДСТ. Отмечена перспективность использования инструментария Центра коллективного пользования СФУ для разработки новых методик определения биомаркеров.

Ключевые слова: дисплазия соединительной ткани, биомаркеры, диагностика.

В последние годы все большее внимание исследователей и врачей-практиков привлекает роль диспластикозависимой и ассоциированной с дисплазией соединительной ткани (ДСТ) патологии различных органов и систем организма человека. Значимость данной проблемы обусловлена широкой распространенностью ДСТ, системностью поражений, высокой вероятностью формирования различных видов патологии.

ДСТ – нарушение развития соединительной ткани в эмбриональном и постнатальном периодах, характеризующееся дефектами волокнистых структур и основного вещества, приводящее к расстройству гомеостаза на тканевом, органном и организменном уров-

нях в виде различных морфофункциональных нарушений висцеральных и локомоторных органов с прогрессирующим течением [1]. Частота патологических состояний, связанных с ДСТ, неуклонно растет. Однако врачи недостаточно информированы о современных средствах диагностики патологии, в частности, с использованием биомаркеров.

Так, пептиды в сыворотке крови, являющиеся результатом метаболизма коллагена типа 1 или 3, и фрагменты их деградации, а также металлопротеиназы используются в качестве биомаркеров для неинвазивной оценки фиброза [2]. Pentosidine и гомоцистеин в моче и плазме крови служат информативными маркерами для оценки рисков перелома

* Corresponding author E-mail address: kachin@lan.krasu.ru

¹ © Siberian Federal University. All rights reserved

кости независимо от минерального обмена и плотности костной ткани [3]. Предикторами ранней диагностики перелома может также служить факт наличия поперечных связей N-telopeptides коллагена типа I [4].

Актуален поиск ранних (в т.ч. метаболических) маркеров риска формирования различных заболеваний у детей с ДСТ. К настоящему времени известно, что содержание свободных и эфирносвязанных жирных кислот (ЖК) в сыворотке крови служит дополнительным диагностическим тестом [5].

Результаты исследований ряда авторов дают представление о вероятной связи патологии мембран с липидным и жирнокислотным составом в патогенезе артериальной гипертензии и других сердечно-сосудистых заболеваний. В частности, увеличение содержания олеиновой кислоты характеризует состояние артериальной гипертензии и связано с наследственно обусловленными нарушениями в метаболических превращениях моноеновых ЖК [6-8]. Дефицит полиненасыщенных ЖК ω -3 лежит в основе возникновения кардиогенных заболеваний [8]. Выявлены отличительные особенности структурного перераспределения отдельных ЖК у детей с отягощенной наследственностью по ишемической болезни сердца [6].

При ДСТ в различных субстратах (волосы, эритроциты, ротовая жидкость) обнаружен дефицит магния, что позволяет предположить патогенетическое значение гипомagneмии [9]. Обсуждаются молекулярные механизмы гомеостаза магния [10-12]. Наиболее вероятное воздействие дефицита Mg^{2+} на соединительную ткань – это усиление деградации коллагеновых и, возможно, эластиновых волокон, а также полисахаридных нитей гиалуронана. Гипомagneзия приводит также к изменению механических свойств артерий [13-15].

Определение содержания оксипролина, гидроксизина, галактозилоксилизина, лизилпиридинолина, дезоксипиридинолина, гидроксизилпиридинолина, С-концевых (карбокситерминальных) и N-концевых (аминотерминальных) телопептидов, продуктов распада коллагена типа I (β -CrossLaps теста) в сыворотке крови и пирилинкса-D в суточной моче позволяет охарактеризовать интенсивность процесса распада коллагена.

Оксипролин (ОП) – одна из основных аминокислот коллагена, что позволяет считать ее маркером, отражающим катаболизм этого белка. Около 20 % оксипролинсодержащих пептидов, высвобождаемых из коллагеновых молекул, экскретируются с мочой, а 80 % метаболизируются в печени. Подавляющая часть (90 %) ОП мочи является компонентом пептидов низкой молекулярной массы, а около 9 % – большой (преимущественно фрагментов N-концевых телопептидов проколлагена типа I). В свободном виде находится только 1 % ОП. Поэтому увеличение количества свободного и, соответственно, снижение уровня связанного ОП может косвенно свидетельствовать о нарушении синтеза коллагена [13].

Примерно половина всей массы коллагена в организме приходится на долю его костного компонента. Скорость обновления коллагена в костях значительно выше, чем в мягких тканях. Поэтому исследователями предпринимаются попытки модифицировать методику для повышения возможности определения именно костного коллагена. Известно, что в результате посттрансляционной модификации коллагена вследствие гликозилирования, т.е. соединения аминокислоты гидроксизина, образуются гликозиды гидроксизина. После высвобождения из костной ткани они не метаболизируются и почти полностью выводятся с мочой. Соединения гидрокси-

лизина с глюкозой и галактозой находятся преимущественно в коже. Гидроксизин в сочетании с галактозой – галактозилосилизин – представлен, главным образом, в костном коллагене и поэтому может служить специфическим маркером его деградации. Он не метаболизируется в печени и практически в неизмененном виде экскретируется с мочой. Для количественной диагностики гликозидов гидроксизина весьма перспективен метод хромато-масс-спектрометрии.

Процесс распада коллагена возможно оценить также по содержанию производных пиридина – лизилпиридинолина, дезоксипиридинолина и гидроксизилпиридинолина, которые являются «молекулярными сшивками», стабилизирующими структуру фибрилл коллагена. Высвобождение производных пиридина из костной ткани – достоверный показатель распада зрелого коллагена. Дезоксипиридинолин встречается исключительно в коллагене костной ткани, а пиридинолин – в структуре хрящевого коллагена. На их экскрецию не влияет поступление коллагена с пищей. Пиридинолиновые сшивки обнаруживают в гидролизованной моче хроматографическим методом.

Косвенным показателем распада коллагена типа 1 может служить β -CrossLaps тест – его определение возможно с помощью иммунной тест-системы ELECSYS (фирма Roche, Швейцария), которая специфична ко многим изомерам фрагментов коллагена типа 1 (С-концевые телопептиды, пиридинолины и др.).

Для определения свободного пирилинкса D в моче можно применять иммуоферментный метод с использованием анализатора «IMMULITE» (США) с набором реактивов фирмы «Biomergika». Данный метод позволяет оценить состояние резорбции коллагена типа 1, который соединяется посредством

пиридиновых связей: пиридинолин (PYD) и диоксипиридинолин (DPD). DPD образуется вследствие ферментативного воздействия лизирующей оксидазы на аминокислоту лизин. В результате процесса резорбции костей DPD выделяется в кровоток и далее экскретируется в мочу в неизмененном виде, на него не оказывает влияние характер пищи, что и определяет его использование для оценки процесса резорбции костей.

Кроме того, состояние пиридиновых сшивок коллагена типа 1 отражает содержание особых специфических пептидных фрагментов – поперечно сшитых телопептидов коллагена типа 1, которые носят название С-концевых (карбокситерминальных) и N-концевых (аминотерминальных) телопептидов. Оба телопептида принадлежат к источникам пиридиновых сшивок и специфичны именно для костной ткани. С-концевой телопептид – это фрагмент молекулы коллагена типа 1, образующийся за счет поперечного сшивания телопептидов двух альфа-цепей одной молекулы коллагена и спирального участка альфа-1- или альфа-2-цепи другой коллагеновой молекулы; высокоспецифичен для костной ткани, поскольку содержит поперечно сшитые участки, не обнаруживаемые в структуре коллагена типа 1 других тканей. С-концевой телопептид определяют в крови с помощью радиоиммунологического метода (фирма Orion Diagnostica, Финляндия), а в моче – с помощью диагностикума (фирма Osteometer, Дания и Diagnostic Systems Laboratories (США) [16].

N-концевой телопептид – это также фрагмент молекулы коллагена типа 1, образующийся за счет поперечного сшивания N-концевого пептида (телопептида) одной молекулы коллагена со спиральными фрагментами другой. N-концевой телопептид более богат дезоксиридинолиновыми

сшивками, чем С-концевой. В сыворотке крови или моче его определяют с помощью иммунодиагностикума фирмы Ostex International (США) [16].

Для характеристики биохимических процессов, происходящих в соединительной ткани, важна оценка процесса распада протеогликанов. О катаболизме межклеточного вещества соединительной ткани судят по величине экскреции гликозаминогликанов (ГАГ) в суточной моче. ГАГ определяют методом Д. П. Косягина [16]. У пациентов с различными клиническими вариантами дисплазии соединительной ткани наблюдается, как правило, повышенное выведение ГАГ с мочой.

Интенсивность костеобразования оценивают по уровню активности щелочной фосфатазы, по содержанию остеокальцина и общего аминотерминального пропептида проколлагена типа 1 (общий PINP). Остеокальцин – специфический для костной ткани кальций-связывающий белок, характеризующий процессы остеосинтеза. Он продуцируется остеобластами и связывается с микрокристаллами гидроксиапатита во внеклеточном пространстве. Небольшая часть новообразованного остеокальцина попадает в кровоток, где его уровень можно уточнить с помощью иммуноферментной тест-системы, выпускаемой фирмой Roshe (Швейцария).

Общий PINP – специфический индикатор синтеза коллагена типа 1. Сначала PINP имеет трехмерную структуру (выделенный из трехмерной структуры проколлагена), но очень быстро распадается на мономерные фракции в результате эффекта терминальной деградации. Определяется в сыворотке крови с помощью иммунной тест-системы Элексис (фирма «Хоффманн-Ла Рош», Швейцария), получившей название «Элексис общий PINP» [16].

В комплекс биохимических методик, используемых при оценке особенностей метаболизма при ДСТ, входит определение свободных аминокислот методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. По данным [16], для большинства незаменимых и заменимых аминокислот (АК) отмечено увеличение числа больных со сниженным уровнем свободных АК в сыворотке крови. Сходные результаты получены в [9] при определении свободных АК в сыворотке крови взрослых, больных ДСТ.

Существенно дополняет представление об особенностях протекания биохимических процессов в соединительнотканых структурах организма в присутствии ДСТ информация о содержаниях ионов кальция, фосфора, кальцийрегулирующих гормонов. Содержание кальция определяют с помощью ионоселективных электродов на аппарате микролит «Конелаб» (Финляндия), паратиреоидного гормона – с помощью тест-системы DSL-I0-8000 ACTIVE I-PTH ELISA (Финляндия), 25-гидроксивитамина витамина Д – ВСМ-диагностикума (США), Мультискана Lab-system (Финляндия).

В специализированных лабораториях определяют фибронектин. Он играет важную роль в процессе клеточной дифференцировки и представляет собой высокомолекулярный гликопротеид, связывающий между собой коллагеновые волокна, гликозаминогликаны, фибрин и др. Дефицит фибронектина отмечается при синдроме Элерса-Данло 10 типа. Фибронектин определяют в плазме, хранившейся при температуре минус 20 °С не более одного месяца, с помощью стандартной иммуноферментной тест-системы с использованием мультифотометра типа «Multiscan».

Несмотря на широкую распространенность ДСТ, до настоящего времени не существует единого мнения по вопросам терми-

нологии, дифференциально-диагностических тестов, оценки риска развития, подходов к профилактике данной патологии. Несомненно, что для диагностики ДСТ необходим комплексный подход с использованием клинико-генеалогического метода, анамнеза болезни и жизни пациента, клинического

обследования больного и членов его семьи, а также физико-химического, биохимического и молекулярно-генетического методов диагностики. Весьма перспективна разработка новых методик определения биомаркеров ДСТ с использованием инструментария Центра коллективного пользования СФУ.

Список литературы

1. Нечаева Г.И., Яковлев В.М., Конев В.П., Друк И.В., Морозов С.Л. Дисплазия соединительной ткани: основные клинические синдромы, формулировка диагноза, лечение // Лечащий врач. – 2008. – № 2. – С. 22-25.
2. Zannad F, Pitt B. Biomarkers of extracellular matrix turnover // Heart Fail Clin. 2009. Vol. 5. No. 4. P. 589-99.
3. Saito M. Biochemical markers of bone turnover. New aspect. Bone collagen metabolism: new biological markers for estimation of bone quality // Clin Calcium. 2009. Vol. 19. No. 8. P. 1110-1117.
4. Ishikawa T, Sakuraba K. Biochemical markers of bone turnover. New aspect. Bone metabolism movement in various sports and physical activities // Clin Calcium. 2009. Vol. 19. No. 8. P. 1125-1131.
5. Дисплазия соединительной ткани: Материалы симпозиума / Под ред. Г.И. Нечаевой. – Омск: ОГМА, 2005. – 250 с.
6. Козычева Е. В., Слезка И.Е. Липидкорректирующее действие морских полиненасыщенных жирных кислот в профилактике сердечно-сосудистых заболеваний у мальчиков // Вопросы питания. 1998. № 4. С. 27-31.
7. Козычева Е.В., Новгородцева Т.П., Эндакова Э.А. Влияние жира сельди «Иваси» на эритроцитарные полиненасыщенные ω -6 и ω -3 жирные кислоты при реабилитации больных сердечно-сосудистыми заболеваниями // Вопросы питания. – 1998. – № 5-6. – С. 29-33.
8. Титов В. Н. Биологическое обоснование применения полиненасыщенных жирных кислот семейства ω -3 в профилактике атеросклероза // Вопросы питания. – 1999. – № 3. – С. 34-41.
9. Яковлев В.М., Нечаева Г.И. Кардио-респираторные синдромы при дисплазии соединительной ткани. – Омск: ОГМА, 1994. – 217 с.
10. Громова О.А. Магний и пиридоксин: основы знаний. – М.: ПротоТип, 2006. – 234 с.
11. Спасов А.А. Магний в медицинской практике. – Волгоград, 2000. – 272 с.
12. Senni K., Foucault-Bertaud A., Godeau G. Magnesium and connective tissue // Magnes Res. 2003. Vol. 16. No. 1. P. 70-74.
13. Долгов В.В., Ермакова И.П. Лабораторная диагностика нарушений обмена минералов и заболеваний костей: учебное пособие. – М.: РМАПО, 1998. – 64 с.
14. Laurant P., Hayoz D., Brunner H., Berthelot A. Dietary magnesium intake can affect mechanical properties of rat carotid artery // Br J Nutr. 2000. Vol. 84. No. 5. P. 757-764.

15. Leonard F., Moscovitz P., Hodge J.W., Adams J.P. Age related Ca-Mg content and strength in turkey tendon // *Calcif Tissue Res.* 1976. Vol. 19. No. 4. P. 331-336.
16. Кадурина Т.И., Горбунова В.Н. Дисплазия соединительной ткани. Руководство для врачей. – СПб.: Элби-СПб, 2009. – 704 с.

Using of Biomarkers in Diagnostics of Connective Tissue Dysplasia

**Lidiya S. Evert^a, Svetlana V. Borozdun^a,
Elena I. Bobrova^a, Elena S. Panicheva^a,
Vasiliy S. Kuznezhov^a and Sergey V. Kachin^{b*}**

^a *SII of Medical Problems of North, SB RAMS,
3 G P. Zhelezniak st., Krasnoyarsk, 660022 Russia*

^b *Siberian Federal University,
79 Svobodny, Krasnoyarsk, 660041 Russia*

Methods and ways of pathology diagnostics in different organs and systems of human being dealing with connective tissue dysplasia (CTD) are discussed. Number of some compounds such as biomarkers are proposed for evaluation of morphological and functional breaking of visceral and locomotive motor organs associated with (CTD). Perspective activity of the Centre for Collective Work's (Siberian Federal University) facilities for working out new methods of biomarkers' determination has been underlined.

Keywords: connective tissue dysplasia, biomarkers, diagnostics.
