

УДК 616.13-004.6:616.018.54

ИЗМЕНЕНИЯ АТЕРОГЕННОСТИ СЫВОРОТКИ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА: РЕЗУЛЬТАТЫ ПЯТИЛЕТНЕГО НАБЛЮДЕНИЯ

© Павлова К.Н., **Эрбель Р., *Собенни И.А.

Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии, Москва;
* Российский кардиологический научно-производственный комплекс Минздрава РФ, Москва;
** Университетская клиника Эссена, Эссен, Германия
E-mail: profmironov@mmascience.ru

В течение пяти лет у 406 человек наблюдали за уровнем внутриклеточного накопления холестерина, индуцированного сывороткой крови человека, в условиях клеточной тест-системы и основными факторами риска развития атеросклероза. Выявлена корреляция между внутриклеточным накоплением холестерина, индуцированного сывороткой крови человека, в условиях клеточной тест-системы и наличием кальцинатов и уровня накопления кальция в коронарных артериях, а также изменениями плече-лодыжечного индекса. Результаты исследования показывают, что индуцированное сывороткой крови накопление холестерина в условиях клеточного теста может являться новым маркером атеросклеротического процесса, а также служить прогностическим признаком повышения уровня общего холестерина и холестерина липопротеидов низкой плотности.

Ключевые слова: атеросклероз, клеточный тест, атерогенность сыворотки крови.

THE RESULTS OF CHANGING THE HUMAN SERUM ATHEROGENICITY AFTER 5-YEAR FOLLOW-UP

Pavlova K.N., Erbel R., Sobenin I.A.

**Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow;
Russian Cardiology Research Complex, Moscow; Essen University Clinic, Essen, Germany**

During 5 years the level of intracellular cholesterol accumulation induced by human serum under conditions of cell test systems and major risk factors for atherosclerosis were observed in 406 people. There was a correlation between the intracellular accumulation of cholesterol induced by human serum in cell test systems and the presence of calcifications and the level of the coronary calcium accumulation, as well as the changes in ankle-brachial index. The results show that the cholesterol accumulation, induced by serum, in the cell test may be a new biochemical marker of atherosclerosis, and serve as a predictor of elevating total cholesterol and LDL.

Keywords: atherosclerosis, cell test, serum atherogenicity.

Атеросклероз является одной из наиболее серьёзных проблем современной медицины, и его клинические проявления, такие как инфаркт, инсульт, ишемическая болезнь сердца, занимают ведущее место в структуре заболеваемости и смертности [13]. Атеросклероз - заболевание, которое характеризуется развитием дегенеративных изменений в стенках артерий с последующей окклюзией просвета сосудов и ограничением кровоснабжения жизненно важных органов, таких как сердце, головной мозг, почки. Субклинический (бессимптомный) атеросклероз широко распространённая патология; атеросклеротические поражения артерий выявляются уже у молодых лиц и прогрессируют в течение десятилетий, прежде чем проявятся клинически. Уже в среднем возрасте у лиц без клинических проявлений атеросклероза частота выявления атеросклеротических поражений сосудов приближается к 100% [14, 15, 16].

Несмотря на несомненные успехи в понимании атерогенеза, остаётся важным, как для практических, так и научных целей, разработка и внедрение новых, достаточно эффективных и от-

носительно простых методов диагностики атеросклероза и его прогрессирования. Без появления таких методов невозможно широкое применение ранней диагностики атеросклеротического поражения, прежде всего путём скрининга, оценка эффективности лечения, прогноз течения, в том числе естественного, атеросклероза. Для раннего выявления атеросклеротического поражения и динамики его развития используются методы неинвазивной визуализации атеросклеротического поражения (ультразвуковое исследование, компьютерная и магнитно-резонансная томография), оценка факторов риска, включая маркёры активности течения атеросклероза, оценка риска тромботических осложнений и выявление генетического полиморфизма.

Определение способности сыворотки крови вызывать накопление внутриклеточного холестерина в условиях клеточной тест-системы [6] отвечает вышеприведённым условиям. Одним из основных процессов, определяющих атерогенез, является накопление холестерина в клетке с последующим формированием пенных клеток. Понимание значения этого феномена как в теоре-

тическом, так и в практическом плане является общепризнанным, однако для определения пригодности этого феномена для диагностики и прогноза течения атеросклероза требуются дополнительные исследования [11].

До сего времени не известна динамика изменений проявлений данного феномена с течением времени, что делало невозможным применение методов на его основе для наблюдения за естественным течением атеросклероза. Предполагалось, что развитие атеросклеротического процесса с течением времени сопровождается повышением способности сыворотки крови вызывать проатерогенные сдвиги на клеточном уровне. Для оценки этого предположения выполнено открытое проспективное исследование по изучению характера изменений проатерогенных свойств сыворотки крови. Это исследование проводилось в рамках международного сотрудничества в качестве подпрограммы научного исследования Heinz Nixdorf RECALL (Risk Factors, Evaluation of Coronary Calcium and Lifestyle) Study [2].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследование включены 406 человек, у которых оценивалась способность сыворотки крови вызывать накопление холестерина в условиях клеточной тест-системы в двух точках: исходно и через 5 лет наблюдения. Использовались следующие количественные показатели атеросклеротического поражения: 1) толщина интимомедиального слоя сонных артерий, которая определялась с помощью дуплексного ультразвукового сканирования в режиме высокого разрешения; 2) наличие коронарных кальциатов, для выявления и оценки которых применялась электронно-лучевая (рентгеновская) компьютерная томография; 3) плече-лодыжечный индекс, который определяли путём измерения систолического артериального давления на заднеберцовой и плечевой артериях под контролем доплерографии. Определяли липидный профиль (уровень общего холестерина, α -холестерина, холестерина липопротеидов низкой плотности, триглицеридов), а также уровень С-реактивного белка.

Клеточный тест для определения способности вызывать накопление холестерина в культивируемых клетках основан на культуре моноцитов, полученных из крови здоровых доноров [4]. Накопление холестерина выражали в процентах по отношению к принятому за 100% содержанию холестерина в контрольных клетках, инкубированных без добавления исследуемой сыворотки крови. Достоверным накоплением холестерина

считали уровень, более чем на 17% превышающий контрольные значения; данную границу определили экспериментальным методом на основании вычисления трёх стандартных отклонений по результатам серийных оценок положительных (вызывающих 1,3-1,6-кратное накопление холестерина) проб.

Анализировали три показателя: исходное значение, уровень, достигнутый после 5-летнего наблюдения, и абсолютное изменение способности сыворотки крови вызывать накопление холестерина. Помимо оценки абсолютных показателей, также оценивались: наличие способности сыворотки крови вызывать накопление холестерина в начале и по окончании наблюдения (биномиальная шкала); исчезновение, уменьшение, отсутствие изменений, увеличение (ординарная шкала); отсутствие способности сыворотки крови вызывать накопление холестерина в начале наблюдения и по его окончании или появление способности сыворотки крови вызывать накопление холестерина в процессе наблюдения (биномиальная шкала).

Для статистической оценки результатов использовали пакет статистических программ SPSS 14.0 (SPSS Inc., США). Учитывая ненормальное распределение изучаемых показателей, для обработки данных применяли непараметрические тесты [15]. Данные представлены в виде среднего значения, стандартной ошибки среднего и стандартного отклонения. Достоверными считали различия при 95% вероятности безошибочного прогноза.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исходно средний показатель накопления холестерина в клеточном тесте атерогенности составил $125,4 \pm 1,9\%$ (SD 38,5), через 5 лет наблюдения этот показатель повысился до $129,0 \pm 1,7\%$ (SD 34,8), эти изменения статистически достоверны ($Z = -3,284$, $p = 0,001$) (рис. 1).

Группа наблюдаемых неоднородна по исходной способности сыворотки крови вызывать накопление холестерина в клеточной тест-системе, поэтому все наблюдаемые разделены на две группы: I группа — лица, сыворотка крови которых не обладала атерогенными свойствами (208 человек - 51,2%); II группа — наблюдаемые, у которых сыворотка крови на момент включения в исследование достоверно вызвала накопление холестерина в культивируемых клетках (198 человек, 48,8% выборки). В I группе исходное значение накопления холестерина составило $101,3 \pm 0,7\%$ (SD 9,4), во II — $150,8 \pm 2,9\%$ (SD 41,1).

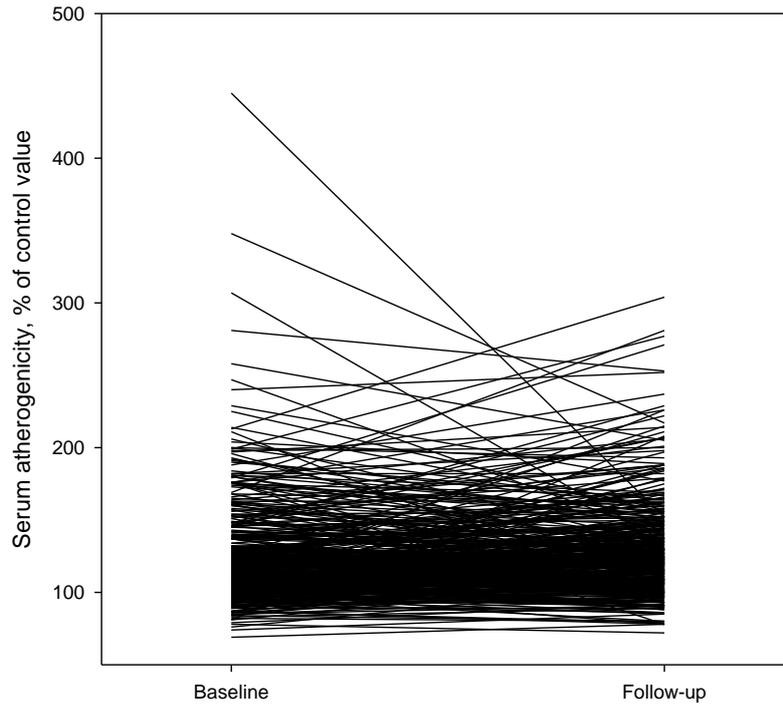


Рис. 1. Распределение способности сыворотки крови вызывать накопление холестерина в условиях клеточной тест-системы в двух точках: исходно и через 5 лет наблюдения у 406 пациентов.

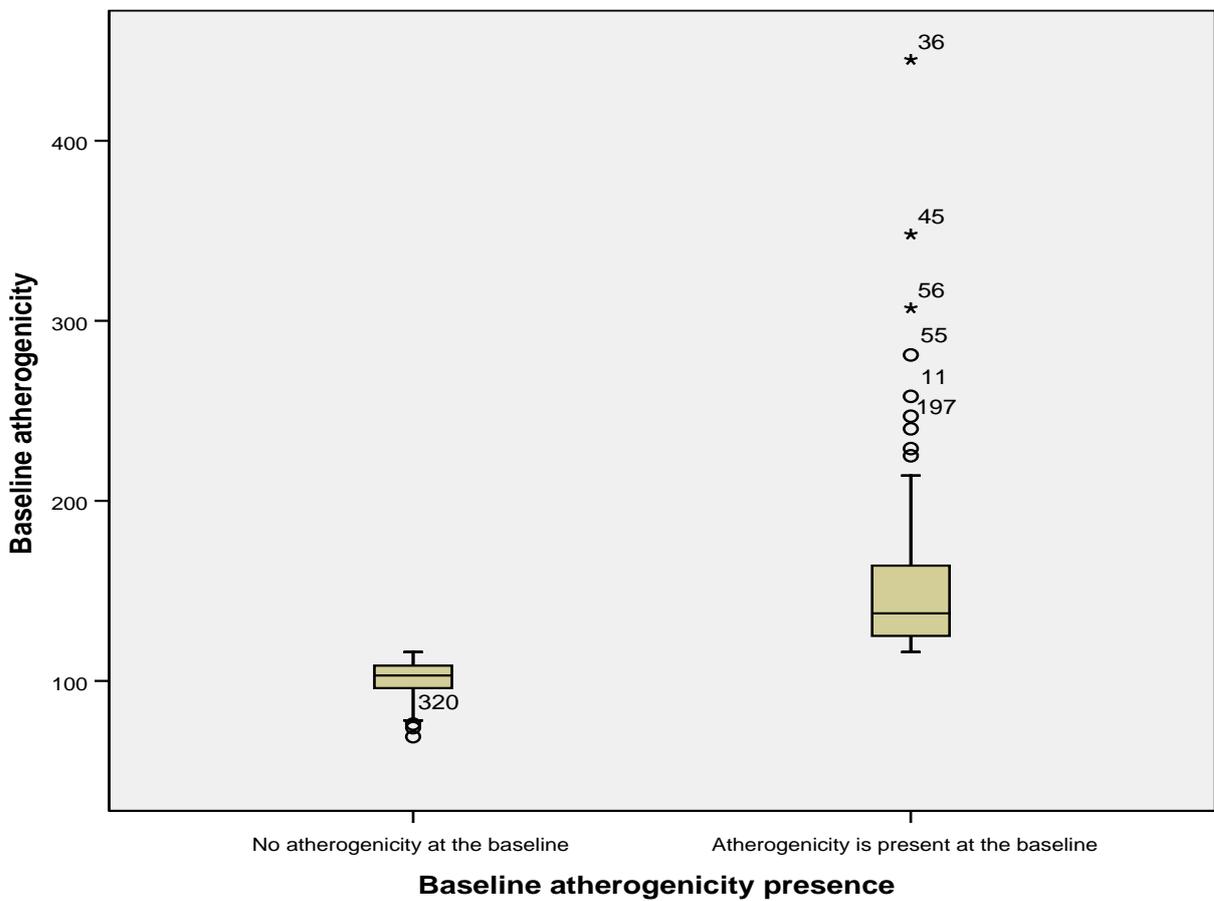


Рис. 2. Первичное измерение накопления холестерина в условиях клеточной тест-системы (исходная атерогенность сыворотки крови).

В I группе через 5 лет отмечено статистически достоверное повышение способности сыворотки крови вызывать накопление холестерина в культивируемых клетках до $117,0 \pm 1,8\%$ (SD 25,5) ($Z = -8,015$, $p < 0,001$). Во II группе, способность сыворотки крови вызывать накопление холестерина в культивируемых клетках достоверно снизилась до $142,9 \pm 2,7\%$ (SD 38,3) ($Z = -2,944$, $p = 0,003$).

После 5 лет наблюдения доля лиц, у которых сыворотка крови способна вызывать накопление внутриклеточного холестерина, возросла с 48,8% до 59,6%, при этом произошло перераспределение показателей. У 59,1% наблюдаемых I группы (123 из 208) сыворотка крови не приобрела атерогенных свойств, а у 40,9% (85 из 208) сыворотка крови вызывала достоверное накопление холестерина (рис. 3). Во II группе клеточный тест стал отрицательным у 20,7% участников (41 из 198), а у 15,7% (31 из 198) способность сыворотки крови вызывать накопление холестерина достоверно уменьшилась, у 43,9% (87 из 198) осталась на прежнем уровне, и у остальных 19,7% (39 из 198) достоверно увеличилась.

Выявлены связи между наличием факторов риска сердечно-сосудистых заболеваний и следующими количественными показателями атеро-

склероза: исходные показатели клеточного теста коррелировали с уровнем общего холестерина ($r = 0,112$; $p = 0,024$), с уровнем С-реактивного белка через 5 лет наблюдения ($r = 0,142$; $p = 0,015$), с показателями клеточного теста через 5 лет наблюдения ($r = 0,449$; $p < 0,001$; $n = 406$), имела место тенденция к корреляции с возрастом ($r = 0,092$; $p = 0,065$). Показатели клеточного теста, оцененные через 5 лет наблюдения, имели отрицательную корреляцию с плече-лодыжечным индексом ($r = -0,121$; $p = 0,008$).

У наблюдаемых из I группы (группа с отрицательными показателями клеточного теста при включении в исследование) показатели клеточного теста исходно не имели корреляции с факторами риска развития атеросклероза и/или количественными показателями выраженности атеросклеротического поражения.

У наблюдаемых из I группы показатели клеточного теста по окончании 5-летнего периода наблюдения имели отрицательную корреляцию с исходным плече-лодыжечным индексом ($r = -0,221$; $p = 0,001$) и положительную корреляцию с изменениями плече-лодыжечного индекса за время наблюдения ($r = 0,150$; $p = 0,037$), положительную корреляцию с исходным наличием кальциатов в коронарных артериях ($r = 0,238$; $p = 0,031$)

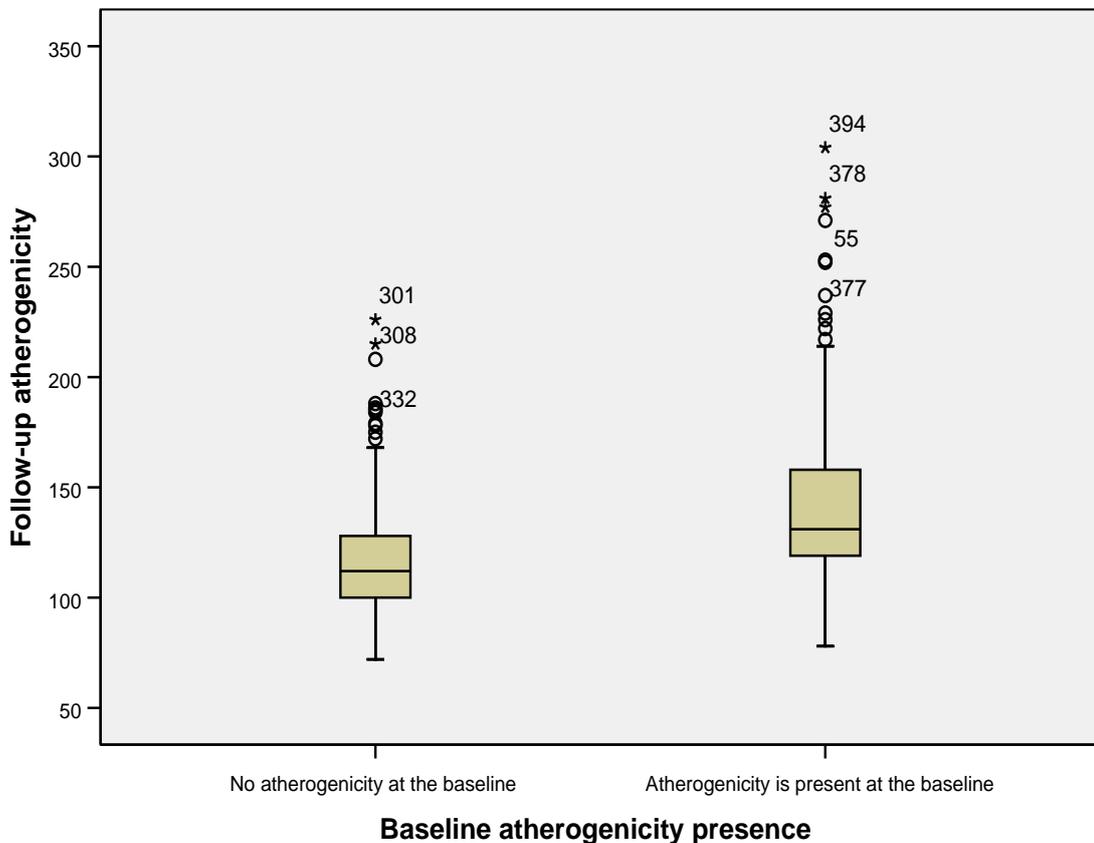


Рис. 3. Распределение накопления холестерина в условиях клеточной тест-системы после измерения через 5 лет (без атерогенных свойств в исходном измерении и с исходным накоплением холестерина как при первичном измерении, так и после 5 лет).

и с увеличением количества коронарного кальция за 5-летний период наблюдения ($r=0,223$; $p=0,048$).

Изменения абсолютных показателей клеточного теста с исходными показателями плече-лодыжечного индекса имели отрицательную корреляцию ($r=-0,201$; $p=0,004$), положительная корреляция имела место с показателями плече-лодыжечного индекса после 5-летнего наблюдения ($r=0,165$; $p=0,021$) и с уровнем коронарного кальция после 5-летнего наблюдения ($r=0,266$; $p=0,016$).

Во II группе наблюдаемых (лица с положительными показателями клеточного теста при включении в исследование) имела место тенденция к снижению плече-лодыжечного индекса за период 5-летнего наблюдения с $1,17 \pm 0,01$ до $1,14 \pm 0,01$ ($Z=-1,832$, $p=0,067$). Исходные показатели клеточного теста в этой группе коррелировали с таковыми после 5-летнего наблюдения ($r=0,477$; $p<0,001$) и с исходным значением толщины интимомедиального слоя сонных артерий ($r=0,146$; $p=0,046$; $n=186$).

Показатели клеточного теста во II группе по окончании 5-летнего наблюдения показали положительную корреляцию с исходным уровнем липопротеидов низкой плотности ($r=0,143$; $p=0,045$) и отрицательную корреляцию с уровнем С-реактивного белка после 5-летнего наблюдения ($r=-0,193$; $p=0,021$).

Изменения показателей клеточного теста во II группе коррелировали с исходным уровнем липопротеидов низкой плотности ($r=0,145$; $p=0,041$; $n=198$); других значимых корреляций не выявлено.

Полученные в ходе исследования результаты показали, что индуцированное сывороткой крови накопление холестерина в условиях клеточного теста может служить биохимическим маркером атеросклеротического процесса и является прогностическим признаком повышения уровня общего холестерина и холестерина липопротеидов низкой плотности. Показатели клеточного теста положительно коррелируют с показателями коронарного кальция и его накоплением в коронарных артериях, а также с изменениями плече-лодыжечного индекса, что может свидетельствовать о связи этого маркера с прогрессированием атеросклероза.

Среди потенциальных биомаркеров развития атеросклероза, индуцированное сывороткой крови накопление внутриклеточного холестерина может играть существенную роль. Отложение внутриклеточного холестерина с последующим образованием пенных клеток является ключевым моментом в развитии атеросклероза [11], этот процесс, в свою очередь, является теоретиче-

ским основанием для использования феномена накопления холестерина в условиях клеточной тест-системы для диагностики и прогноза развития атеросклеротического процесса.

Сыворотка крови у большинства больных с доказанным наличием коронарного атеросклероза, в отличие от сыворотки крови здоровых лиц, способна вызывать накопление липидов в культуре клеток [1, 6]. Разработаны клеточные модели, основанные на первичных культурах человеческих клеток интимы аорты и моноцитах-макрофагах крови человека, которые показали наличие этого явления и позволили оценить его количественно и качественно [1, 7]. Показатели клеточного теста тесно коррелируют со степенью выраженности атеросклероза коронарных артерий [1, 6]. Частота выявления положительных результатов теста выше у лиц с субклиническим атеросклерозом и у больных с высоким сердечно-сосудистым риском (например, при сахарном диабете 2 типа, системной красной волчанке, выраженной гиперлипидемии) [5, 12]. Феномен накопления холестерина в условиях тест-системы производит впечатление фактора, независимого от таких факторов риска развития атеросклероза, как липиды сыворотки крови, артериальное давление, возраст и, вероятно гендерная принадлежность. В основании феномена накопления холестерина в условиях тест-системы лежит наличие модифицированных липопротеидов низкой плотности [1, 12] и некоторых факторов, не связанных с липидами [3, 10].

Результаты теста накопления внутриклеточного холестерина могут быть использованы в качестве интегральной характеристики первого этапа атерогенеза, моделируемого *in vitro*, поскольку внутриклеточное накопление липидов является пусковым механизмом других патологических изменений на уровне клетки, например усиления синтеза клеточного белка и компонентов соединительнотканного матрикса, миграции клеток, клеточной пролиферации и, вероятно, развития местных воспалительных реакций [8].

Результаты 2-летнего проспективного исследования у мужчин с бессимптомным атеросклерозом [9] показали, что имеется связь между показателями клеточного теста и развитием атеросклероза. Повышение способности сыворотки крови вызывать накопление холестерина в условиях клеточной тест-системы коррелирует с прогрессом атеросклероза, а снижение или отсутствие этой способности ассоциировано с регрессом начальных атеросклеротических поражений.

До настоящего времени недостаточно достоверных данных о возможности применения показателей клеточного теста в качестве маркера атеросклеротического поражения и процесса. Отсут-

ствуют эпидемиологические исследования о возможном диагностическом значении показателя клеточного теста. Прогностическая значимость показателя клеточного теста до сих пор изучалась на небольшой выборке и оценивалась исключительно в отношении прогрессирования субклинического атеросклероза сонных артерий, но не клинических проявлений атеросклероза. Связь показателя клеточного теста с факторами риска и данными визуализации субклинических атеросклеротических поражений требует дальнейшего изучения.

Выявленные в исследовании значения клеточного теста положительно коррелируют со значениями коронарного кальция и с изменениями плече-лодыжечного индекса, следовательно, индуцированное сывороткой крови накопление холестерина в условиях клеточного теста может являться маркером атеросклеротического процесса и использоваться как прогностический признак повышения уровня общего холестерина и холестерина липопротеидов низкой плотности.

Необходима более детальная оценка возможностей теста, а также проведение дальнейших исследований для определения связи показателей клеточного теста и прогрессирования атеросклероза, а также развития его клинических проявлений и осложнений.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Tertov V.V., Orekhov A.N., Martsenyuk O.N. et al.* Low-density lipoproteins isolated from the blood of patients with coronary heart disease induce the accumulation of lipids in human aortic cells // *Exp. Mol. Pathol.* – 1989. – Vol. 50. – P. 337-347.
2. *Schmermund A., Moehlenkamp S., Stang A. et al.* Assessment of clinically silent atherosclerotic disease and established and novel risk factors for predicting myocardial infarction and cardiac death in healthy middle-aged subjects: Rationale and design of the Heinz Nixdorf RECALL Study // *Am. Heart J.* – 2002. – Vol. 144. – P. 212-218.
3. *Orekhov A.N., Tertov V.V., Kabakov A.E. et al.* Auto-antibodies against modified low density lipoprotein. Nonlipid factor of blood plasma that stimulates foam cell formation // *Arterioscler. Thromb.* – 1991. – Vol. 11. – P. 316-326.
4. *Tertov V.V., Orekhov A.N., Nikitina N.A. et al.* Peritoneal macrophages: a model for detecting atherogenic potential in patients blood serum // *Ann. Med.* 1989. – Vol. 21. – P. 455-459.
5. *Kabakov A.E., Tertov V.V., Saenko V.A. et al.* The atherogenic effect of lupus sera: systemic lupus erythematosus-derived immune complexes stimulate the accumulation of cholesterol in cultured smooth muscle cells from human aorta // *Clin. Immunol. Immunopathol.* – 1992. – Vol. 63. – P. 214-220.
6. *Chazov E.I., Tertov V.V., Orekhov A.N. et al.* Atherogenicity of blood serum from patients with coronary heart disease // *Lancet* – 1986. – Vol. 2. – P. 595-598.
7. *Orekhov A.N., Tertov V.V., Lyakishev A.A. et al.* Use of cultured atherosclerotic cells for investigation of antiatherosclerotic effects of anipamil and other calcium antagonists // *J. Hum. Hypertens.* – 1991. – Vol. 5. – P. 425-430.
8. *Orekhov A.N., Tertov V.V., Kudryashov S.A. et al.* Triggerlike stimulation of cholesterol accumulation and DNA and extracellular matrix synthesis induced by atherogenic serum or low density lipoprotein in cultured cells // *Circ. Res.* – 1990. – Vol. 66. – P. 311-320.
9. *Sobenin I.A., Suprun I.V., Orekhov A.N.* New insight into non-statin prevention and treatment of atherosclerosis // In: *Atherosclerosis: risk factors, diagnosis, and treatment.* Eds. G. M. Kostner, K. M. Kostner. Monduzzi Editore. – 2002. – P. 305-308.
10. *Orekhov A.N., Tertov V.V., Pokrovsky S.N. et al.* Blood serum atherogenicity associated with coronary atherosclerosis. Evidence for nonlipid factor providing atherogenicity of low-density lipoproteins and an approach to its elimination // *Circ. Res.* – 1988. – Vol. 62. – P. 421-429.
11. *Orekhov A.N., Tertov V.V., Novikov I.D. et al.* Lipids in cells of atherosclerotic and uninvolved human aorta. I. Lipid composition of aortic tissue and enzyme-isolated and cultured cells // *Exp. Mol. Pathol.* – 1985. – Vol. 42. – P. 117-137.
12. *Sobenin I.A., Tertov V.V., Koschinsky T. et al.* Modified low density lipoprotein from diabetic patients causes cholesterol accumulation in human intimal aortic cells // *Atherosclerosis.* – 1993. – Vol. 100. – P. 41-54.
13. *American Heart Association.* Heart disease and stroke statistics – 2003 Update. Dallas, American Heart Association, 2002.
14. *Berenson G.S., Srinivasan S.R., Bao W.* Association between multiple cardiovascular risk factors and atherosclerosis in children and young adults // *N. Engl. J. Med.* – 1998. – Vol. 338. – P. 1650-1656.
15. *McGill H.C., Herderick E.E., McMahan C.A. et al.* Atherosclerosis in youth. // *Minerva Pediatr.* – 2002. – Vol. 54, N 5. – P. 437-447.
16. *Tuzcu E.M., Kapadia S.R., Tutar E.* High prevalence of coronary atherosclerosis in asymptomatic teenagers and young adults: evidence from intravascular ultrasound // *Circulation.* – 2001. – Vol. 103. – P. 2705-2710.
17. *Lang T.A., Secic M.* How to report statistics in medicine: annotated guidelines for authors, editors, and reviewers. Second edition. American College of Physicians, Philadelphia. – 2006. – 490 p.