

## СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К ДИАГНОСТИКЕ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ У БОЛЬНЫХ ГИПЕРТОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ

М.М. Петрова, А.Б. Салмина, А.И. Инжутова

Красноярская государственная медицинская академия им. В.Ф. Войно-Ясенецкого, ректор – д.м.н., проф. И.П. Артюхов; кафедра поликлинической терапии и семейной медицины с курсом ИПО, зав. – д.м.н., проф. М.М. Петрова; кафедра биохимии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, зав. – д.м.н., проф. А.Б. Салмина.

***Резюме.** В статье рассматривается перспективность и значимость интегрированных клинико-фундаментальных исследований на примере проведенной междисциплинарной научно-исследовательской работы, в ходе которой был разработан новый высокочувствительный и широкодоступный для практического здравоохранения и исследовательских проектов метод диагностики эндотелиальной дисфункции.*

***Ключевые слова:** эндотелиальная дисфункция, гипертоническая болезнь, методы диагностики.*

Динамическое развитие медицины, достигшей во многих областях знаний значительного практического прорыва, во многом обеспечивается тесной интеграцией клинических и фундаментальных дисциплин. Современное представление об этиологии и патогенезе различных заболеваний базируется на клеточно-молекулярном и генетическом уровне. Всё более различные медицинские науки пользуются методом дедукции, когда, например, повышенное артериальное давление, как общее понимание, рассматривается в виде эндотелиальной дисфункции, заключенной в патологическом функционировании эндотелиоцитов, нарушении баланса биологически активных веществ, изменении межклеточных взаимодействий [1, 3, 7], как

частных составляющих повышенного уровня артериального давления и его осложнений.

В конечном итоге, цель клинико-фундаментальных исследований состоит в предупреждении, ранней диагностике и этиопатогенетической терапии заболеваний. В свою очередь, такой подход позволит не только повышать уровень лечебно-диагностической помощи населению клинического и амбулаторного звена, но и снизить неоправданные затраты в области здравоохранения.

Экономическая составляющая результатов клинико-фундаментального исследования является существенной частью успеха внедрения новых знаний в практическое здравоохранение.

Приведем пример интегрированного клинико-лабораторного исследования, давшего на выходе высокочувствительный и дешевый метод диагностики степени эндотелиальной дисфункции, одобренный и рекомендованный к внедрению в учреждениях здравоохранения Агентством здравоохранения и лекарственного обеспечения Красноярского края [2].

### **Материалы и методы**

В исследовании с информированного согласия приняли участие больные обоего пола (49% мужчин, 51% женщин) в возрасте 30-65 лет, страдающие гипертонической болезнью осложненной инсультом, находившиеся на стационарном лечении в неврологическом отделении МУЗ городская больница №6 им. Н.С. Карповича (110 человек, группа I); больные гипертонической болезнью без острых сосудистых катастроф в анамнезе, состоящие на диспансерном учете в МУЗ городская поликлиника №14 (50, группа II), и 38 относительно здоровых людей, не страдающих гипертонической болезнью и, не имевших сердечно-сосудистых катастроф на момент обследования и в анамнезе, составивших контрольную группу. Все группы сопоставимы по возрастно-половому составу.

При использовании параметрических методов статистического анализа предварительно определялось соответствие выборок закону нормального

распределения с учетом теста Колмогорова-Смирнова с поправкой Лилиефорса. При соответствии данных нормальному распределению для их сравнения использовали t-критерий Стьюдента. В случае отклонения выборок от нормального распределения в сравнительном анализе использовали критерий W Уилкоксона, критерий T Манна-Уитни для непараметрических показателей.

Итак, априори группа I и II имеют эндотелиальную дисфункцию. Однако, нам достоверно не известно какая степень эндотелиальной дисфункции и как назначенные лекарственные препараты воздействуют на патологически измененную сосудистую стенку. Клинически средний уровень артериального давления на момент госпитализации в стационар в группе I составил 160-180/95-100 мм рт. ст. более, чем в 50% случаев; в группе II в основном диагностировался уровень артериального давления в пределах 140-155/90-94 мм рт ст.

Для диагностики эндотелиальной дисфункции был выбран самый чувствительный метод, заключающийся в определении концентрации молекул межклеточной адгезии sPECAM-1 в плазме периферической крови (ИФА, human sPECAM-1 ELISA, Bender Med Systems GmbH, Vienna, Austria) чувствительность которого составляет 97,56%, специфичность – 97,85%. Кроме того, определяли концентрацию антител к фосфолипидам, учитывая активационно-апоптотические процессы, сопровождающие изменение клеточных мембран эндотелиоцитов и клеток крови, как патогенез эндотелиальной дисфункции (ИФА, Anti-phospholipid Screen IgG/IgM, ORGENTEC, Germany) [1].

Исходя из гипотезы развития и прогрессирования эндотелиальной дисфункции, нами также было исследовано содержание лимфоцитов в состоянии блеббинга, количество слущенных эндотелиоцитов и коэффициент содержания мембран-высвобожденных микрочастиц в периферической крови [4;5;6].

Для этого у больных производился забор периферической венозной крови в объеме 5 миллилитров, затем на градиенте плотности фиколл-верографин

( $p=1.077$ ) выделяли лимфоцитарно-эндотелиоцитарную фракцию. Подсчет производили с помощью люминесцентного микроскопа с фазово-контрастной насадкой из расчета на 100 лимфоцитов. Для количественной обработки изображения микрочастиц была использована программа Adobe Photoshop CS.

### **Результаты и обсуждение**

Как видно из таблицы 1, наибольшие значения показателей маркеров эндотелиальной дисфункции зафиксированы в группе больных с осложненным течением гипертонической болезни.

*Таблица 1*

#### ***Показатели маркеров эндотелиальной дисфункции в исследуемых группах больных***

*Примечание: p – достоверность различий по сравнению с контрольной группой: \* $p<0,05$ ; \*\* $p,0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ .*

Проведенный корреляционный анализ между изучаемыми клеточными (блеббинг лимфоцитов, мембран-высвобожденные микрочастицы, слущенные эндотелиоциты) и гуморальными (sPECAM-1, антитела к фосфолипидам) показателями эндотелиальной дисфункции представлен (табл. 2) установил, что наибольший коэффициент корреляции (0,97) наблюдался между суммой известных показателей sPECAM + а/тФЛ и предлагаемым нами обобщенным показателем в виде  $(b + m) \times c$ .

*Таблица 2*

#### ***Корреляционный анализ между клеточными и гуморальными маркерами эндотелиальной дисфункции***

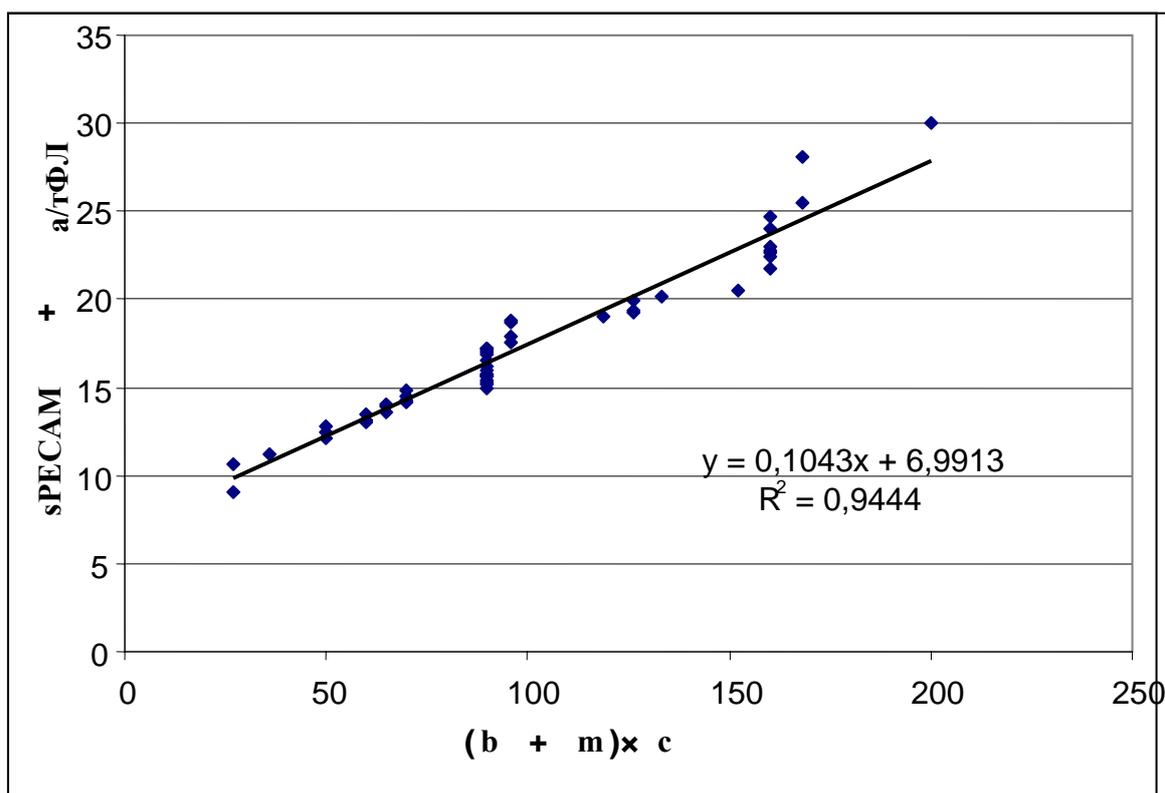
*Примечание: бл (b) – степень выраженности блеббинга; мвм (m) – коэффициент содержания мембран-высвобожденных микрочастиц; сэ (c) – количество слущенных эндотелиоцитов; а/тФЛ – антитела к фосфолипидам.*

На рисунке 1 представлены экспериментальные данные и функциональная зависимость между суммой показателей sPECAM + а/тФЛ и обобщенным показателем  $(b + m) \times c$ , позволяющие рассчитать суммарное значение sPECAM-1 и антител к фосфолипидам по формуле:

$$\text{sPECAM} + \text{а/тФЛ} = 6,9913 + 0,1043 \times c \times (b + m)$$

Адекватность полученной модели оценивали по критерию Фишера ( $F$  расчетный = 1,06;  $F$  табличный = 1,59).

Данная математическая модель расчета суммарного показателя sPESAM-1 и антител к фосфолипидам позволяет произвести экспресс-диагностику степени эндотелиальной дисфункции по разработанной нами шкале (табл. 3)



*Рис. 1. Функциональная зависимость между суммой показателей sPESAM-1 и антител к фосфолипидам и обобщенным показателем (степень блеббинга + коэффициент содержания мембран-высвобожденных микрочастиц) × количество слущенных эндотелиоцитов*

*Таблица 3*

***Шкала перевода расчетных значений суммы гуморальных маркеров в степень эндотелиальной дисфункции***

При этом крайне тяжелому поражению эндотелия соответствует расчетный индекс  $\geq 26,5$  (см. рис.2).

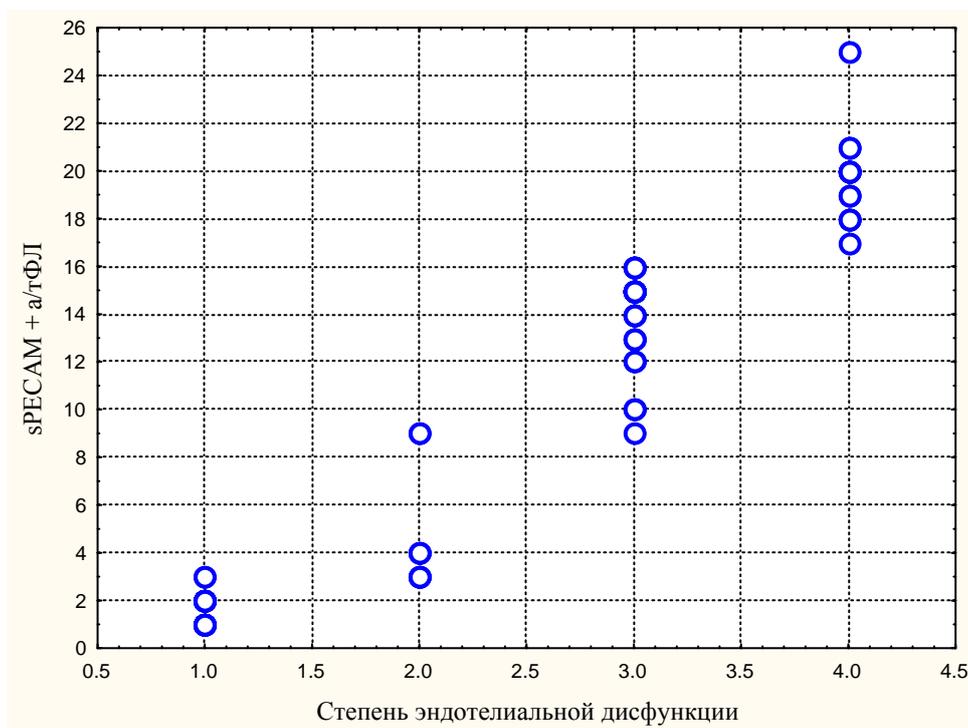


Рис. 2. График соотношения степени эндотелиальной дисфункции (коэффициент) и суммарного показателя sPECAM-1 и антител к фосфолипидам (ЕД/мл).

Себестоимость определения маркеров эндотелиальной дисфункции sPECAM-1 и антитела к фосфолипидам (здесь и далее выкладки в ценах 2006 года) в плазме периферической крови для одного больного равна 2000 рублей (с учетом стоимости реактива, расходного материала, амортизации оборудования). Наборы реактивов для определения sPECAM и антител к фосфолипидам, общей стоимостью 947 евро, рассчитаны на одновременное проведение анализа плазмы крови у 90 человек. Себестоимость расчета содержания суммарной концентрации указанных гуморальных маркеров эндотелиальной дисфункции по клеточным маркерам равна 30 рублям для одного больного (с учетом реактива, расходного материала, амортизации оборудования). Предложенная нами математическая модель позволяет экономить время и средства, а также определять наличие эндотелиальной дисфункции у одного больного независимо от других.

Таким образом, проведенное клинико-фундаментальное исследование

позволило не только разработать принципиально новый и широкодоступный способ диагностики эндотелиальной дисфункции (чувствительность 97,56%; специфичность – 97,85%, точность – 97,85%), а также идентифицировать патогенетические механизмы прогрессирования эндотелиальной дисфункции, заключающиеся в изменении свойств наружной цитоплазматической мембраны клеток (блеббинг лимфоцитов периферической крови, образование мембран-высвобожденных микрочастиц), изменение содержания биологически активных веществ (молекул межклеточной адгезии и антител к фосфолипидам), а так же значительную апоптотическую гибель эндотелиоцитов.

Кроме того, полученная формула позволила производить оценку эффективности назначаемой гипотензивной терапии по восстановлению функции эндотелия. Так подгруппа 1.1, получавшая в ходе исследования периндоприл, имела к 20 суткам госпитализации 1 степень эндотелиальной дисфункции против подгруппы 1.2, получавшей стационарно эналаприл, имевшей к 20 суткам госпитализации 2 степень эндотелиальной дисфункции (изначально большинство больных группы I имели 3 степень эндотелиальной дисфункции).

В заключение, подчеркнем, что клинико-фундаментальные исследования обозначены РАМН как перспективные и важные направления медицинских изысканий.

## **MODERN APPROACH TO DIAGNOSTICS OF ENDOTHELIAL DYSFUNCTION IN PATIENTS WITH HYPERTENSION**

M.M. Petrova, A.B. Salmina, A.I. Inzhutova

Krasnoyarsk state medical academy named in honour of V.F. Vojno-Yasenetskij

In the lead interdisciplinary research work the new high-sensitivity and cheap method of endothelial dysfunctions diagnostics has been developed

### **Литература**

1. Инжутова А.И., Петрова М.М., Салмина А.Б. Эндотелиальная дисфункция

– причина и терапевтическая точка осложненных форм гипертонической болезни // Сиб. мед. журнал. – 2006. – Т. 21, №3. – С. 44-47.

2. Петрова М.М., Салмина А.Б., Инжутова А.И. Диагностика степени эндотелиальной дисфункции и тяжести состояния больных гипертонической болезнью, осложненной ишемическим инсультом: метод. рек. для практ. врачей и студентов мед. вузов. – Красноярск: ККМИАЦ ОИиПД, 2007. – 36с.
3. Повреждение цитоскелета и клеточных мембран при апоптозе / А.Б. Егорова, Ю.А. Успенская и др. // Усп. соврем. биологии. – 2001. – № 5. – С. 502-510.
4. Регистрация блеббинга плазматической мембраны лимфоцитов периферической крови как экспресс-метод оценки тяжести состояния больных осложненными формами гипертонической болезни / А.И. Инжутова, А.Б. Салмина, М.М. Петрова и др. // Бюллетень СО РАМН. – 2007. – №1 (123). – С. 6-10.
5. Dignat-George F., Sampol J. Circulating endothelial cells in vascular disorders: new insights into an old concept // Eur. J. Haematol. – 2000. – № 65. – P. 215-220.
6. Gores G.J., Herman B., Lemasters J.J. Plasma membrane bleb formation and rupture: a common feature of hepatocellular injury // Hepatology. – 1990. – Vol. 11, № 4. – P. 658-670.
7. Makin A., Silverman S.H., Lip G.Y.H. Peripheral vascular disease and Virchow's triad for thrombogenesis // Q. J. Med. – 2002. – Vol. 95. – P. 199-210.

Таблица 1

**Показатели маркеров эндотелиальной дисфункции в исследуемых группах больных**

Маркер эндотелиальной дисфункции	Количество больных в группах, % (M±m)		
	I	II	Контрольная
Степень выражен. блеббинга лимфоц. периферич. крови (I-наиболее легкая; IV-наиболее тяжелая)	I степень 1,72±1,72***	80,0±5,71**	100,0±2,55
	II - 3,45±2,42***	20,0±5,71***	0±6,5
	III- 72,41±5,92***	0±5,2	0±6,5
	IV- 22,41±5,52***	0±5,2	0±6,5
Слущенные эндотелиоциты	12,83±0,58*	1,54±0,15*	0,35±0,35
Коэфф. Содерж. мембран-высвобожденных микрочастиц	0 коэффициент 0	0±5,2	91,07±5,78***
	1 коэффициент 20,69±5,37**	86,0±4,96***	8,93±3,65
	2 коэффициент 25,86±5,79**	14,0±4,96**	0±6,5
	3 коэффициент 29,31±6,03**	0±5,2	0±6,5
	4 коэффициент 24,14±5,67**	0±5,2	0±6,5
Концентрация sPECAM-1 (нг/мл)	11,0±0,48***	8,76±2,41**	0,23±0,03
Концентр. антител к фосфолипидам (Ед/мл)	5,56±2,12***	1,8±0,72*	0,12±0,12

Примечание: *p* – достоверность различий по сравнению с контрольной группой: \**p*<0,05; \*\**p*,0,01; \*\*\**p*<0,001.

Таблица 2

**Корреляционный анализ между клеточными и гуморальными маркерами эндотелиальной дисфункции**

Параметр	Показатель корреляции									
	бл (b)	мвм (m)	сэ (c)	sPECAM	а/тФЛ	sPECAM x а/тФЛ	sPECAM + а/тФЛ	бл + мвм	бл + мвм + сэ	(бл + мвм) × сэ
Бл	1									
Мвм	0,771	1								
Сэ	0,853	0,918	1							
sPECAM	0,871	0,897	0,967	1						
а/тФЛ	0,817	0,879	0,954	0,981	1					
sPECAM x а/тФЛ	0,803	0,833	0,927	0,967	0,994	1				
sPECAM + а/тФЛ	0,847	0,892	0,964	0,995	0,995	0,986	1			
бл + мвм	0,901	0,945	0,917	0,921	0,871	0,832	0,900	1		
бл + мвм+сэ	0,878	0,941	0,996	0,970	0,951	0,922	0,965	0,945	1	
(b + m) × c	0,897	0,932	0,984	0,971	0,963	0,942	<b>0,972</b>	0,938	0,991	1

Примечание: бл (b) – степень выраженности блеббинга; мвм (m) – коэффициент

содержания мембран-высвобожденных микрочастиц; сэ (с) – количество слущенных эндотелиоцитов; а/тФЛ – антитела к фосфолипидам.

Таблица 3

**Шкала перевода расчетных значений суммы гуморальных маркеров  
в степень эндотелиальной дисфункции**

Степень эндотелиальной дисфункции	Расчетный суммарный показатель (коэффициент) $sPECAM+a/тФЛ = 6,9913+0,1043 \times c \times (b + m)$
1	7 – 8
2	8,15 – 10,0
3	10,50 – 17,0
4	$\geq 17,5$