

© А.В.Смирнов, И.Ю.Панина, Н.Н.Петрищев, В.А.Добронравов, М.А.Меншутина, Ф.А.Тугушева, О.А.Дегтерева, А.Ш.Румянцев, И.И.Трофименко, А.Е.Гаранина, 2005  
УДК 616.61-036.12+616.13-002.2]-07:611.018.74

*А.В.Смирнов, И.Ю.Панина, Н.Н.Петрищев, В.А.Добронравов,  
М.А.Меншутина, Ф.А.Тугушева, О.А.Дегтерева, А.Ш.Румянцев,  
И.И.Трофименко, А.Е.Гаранина*

## ЗНАЧЕНИЕ АННЕКСИНА-5 В ОЦЕНКЕ ТЯЖЕСТИ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ НА ДОКЛИНИЧЕСКОЙ СТАДИИ АТЕРОСКЛЕРОЗА У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ ПОЧЕК

*A.V. Smirnov, I.Yu. Panina, N.N. Petrishchyev, V.A. Dobronravov,  
M.A. Menshutina, F.A. Tugusheva, O.A. Degtereva, A.Sh. Rumyantsev,  
I.I. Trofimenko, A.E. Garanina*

## SIGNIFICANCE OF ANNEXIN-5 IN EVALUATION OF THE DEGREE OF ENDOTHELIAL DYSFUNCTION AT THE PRECLINICAL STAGE OF ATHEROSCLEROSIS IN PATIENTS WITH CHRONIC KIDNEY DISEASE

Кафедра патофизиологии и кафедра пропедевтики внутренних болезней Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П.Павлова, Россия

### РЕФЕРАТ

**ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ.** Оценить значение аннексина-5 (Ан-5) на доклинической стадии атеросклероза у больных хронической болезнью почек. **ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ.** Обследовали 46 больных ХБП без клинической симптоматики атеросклероза. Определяли показатели липидограммы, комплекс интима-медиа сонной артерии, реактивность сосудов микроциркуляторного русла, уровень Ан-5. **РЕЗУЛЬТАТЫ.** Снижение скорости клубочковой фильтрации сопровождается нарастанием уровня Ан-5. Его концентрация взаимосвязана с показателями липидограммы. Повышение уровня аннексина-5 сопровождается наиболее выраженной дисфункцией эндотелия. **ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Повышение уровня Ан-5 в крови больных ХБП особенно информативно при отсутствии клинической симптоматики атеросклероза и свидетельствует о наличии вазомоторной формы эндотелиальной дисфункции. Динамическое определение концентрации Ан-5 может улучшить прогностическую оценку вероятности наступления сердечно-сосудистых катастроф при заболеваниях почек.

**Ключевые слова:** хроническая болезнь почек, атеросклероз, эндотелиальная дисфункция, аннексин-5.

### ABSTRACT

**THE AIM** of the investigation was to assess the significance of annexin-5 (An-5) at the preclinical stage of atherosclerosis in patients with chronic kidney disease. **PATIENTS AND METHODS.** Under investigation there were 46 patients with CKD without clinical manifestations of atherosclerosis. The parameters of lipidogram, complex intima-media thickness, endothelial dysfunction and the An-5 level were determined. **RESULTS.** The decreased GFR was followed by an increased An-5 level. Its concentration was interconnected with the lipidogram indices. The increased level of annexin-5 is accompanied by the most pronounced dysfunction of the endothelium. **CONCLUSION.** The elevated level of An-5 in CKD patients' blood is especially informative with the absence of clinical symptoms of atherosclerosis and points to the vasomotor form of endothelial dysfunction. The dynamic detection of An-5 can improve the prognostic value of probable cardiovascular problems in patients with CKD.

**Key words:** chronic renal disease, atherosclerosis, endothelial dysfunction, annexin-5

### ВВЕДЕНИЕ

Многочисленными исследованиями установлено, что сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) являются важной причиной снижения качества жизни и смертности при хронической болезни почек (ХБП) [1, 2]. К «классическим» модифицируемым факторам риска ССЗ относят такие, как протеинурия, артериальная гипертензия, ожирение, курение, дислипидемия [3]. Важно, что они столь же ответственны не только в отношении развития ССЗ, но и

снижения скорости клубочковой фильтрации. Вместе с тем существуют и дополнительные факторы риска, позволяющие оценить патофизиологические механизмы развития сердечно-сосудистых заболеваний, такие как воспаление, дисфункция эндотелия, оксидативный стресс, нарушение регуляции систем коагуляции и фибринолиза. Эти маркеры несут независимую прогностическую информацию и позволяют оценить риск раньше, чем «классические».

ХБП сопровождается ускорением апоптоза [4].

В качестве одного из маркеров этого процесса рассматривается аннексин-5 (Ан-5). В семейство аннексинов объединены белки, обладающие структурным сходством и функциональной способностью связываться с фосфолипидами в присутствии ионов кальция. Ан-5 – наиболее широко распространенный представитель этой группы белков, с массой около 35 килоДальтон. Он обнаруживается в гладкой и скелетной мускулатуре, миокарде, эндотелии, хондроцитах и некоторых видах нейронов [5, 6].

Мембрана клеток, находящихся в состоянии апоптоза изменяется: отрицательно заряженные фосфолипиды внутреннего слоя цитоплазматической мембраны (в частности, фосфатидилсерин) экспрессируются на поверхность клетки [7]. Данный процесс запускает каскад реакций воспаления и коагуляции [8, 9]. Циркулирующий Ан-5 способен блокировать «дефектные» участки цитоплазматической мембраны и тем самым ингибировать прокоагулянтную и провоспалительную активность клеток, в том числе и эндотелия. Следовательно, повышение концентрации Ан-5 в крови может свидетельствовать не только об активизации апоптоза, но и о связанных с ним нарушениях микроциркуляции [10].

В связи с тем, что зарубежные публикации по изучению диагностической роли Ан-5 при ХБП единичны [11, 12], а в России отсутствуют, было принято настоящее исследование. Его цель –

выявить роль аннексина-5 в оценке тяжести эндотелиальной дисфункции на доклинической стадии атеросклероза у больных хронической болезнью почек.

## ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Обследовали 46 больных ХБП без клинической симптоматики атеросклероза с измененной липидограммой (табл. 1), из них 18 мужчин и 28 женщин в возрасте  $49,6 \pm 2,8$  лет (35–60 лет). По диагнозам больные распределились следующим образом: хронический гломерулонефрит 69%, хронический пиелонефрит 8%, диабетическая нефропатия 5%, прочие 18%. У всех больных проведено традиционное нефрологическое обследование. Концентрацию циркулирующего Ан-5 определяли иммуноферментным методом (набор Bender Medsystems, Австрия). За норму принимали значения показателя не выше 0,8 нг/мл).

У всех пациентов помимо традиционного клинико-лабораторного обследования определяли величину комплекса интима-медиа (КИМ) на аппарате Vivid 7 Pro.

Микроциркуляцию в коже оценивали методом высокочастотной ультразвуковой доплерографии («Минимакс-доплер-К», датчик с частотой излучения 25 МГц, лоцирующий ткани на глубину 5 мм). Для оценки реактивности сосудов микроциркуляторного русла исследовали эндотелий-зависимую и эндотелий-независимую вазодилатацию, применяя ионофорез ацетилхолина хлорида и нитроглицерина [13].

Математический анализ полученных данных проводился с применением общепринятых методов параметрической и непараметрической статистики. Критический уровень достоверности нулевой статистической гипотезы (об отсутствии различий и влияний) принимался равным 0,05. Междугрупповые различия оценивали по *t*-критерию Стьюдента. Для выявления взаимосвязей между изучаемыми показателями вычисляли коэффициент линейной корреляции *r* Пирсона, а также проводили канонический корреляционный анализ.

Статистическая обработка материала выполнялась с использованием стандартного пакета программ прикладного статистического анализа (Statistica for Windows v. 6.0).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Данные об основных параметрах обследования приведены в табл. 1. Среди классических факторов риска развития атеросклероза следует обратить внимание на легкую степень ожирения, умеренное повышение пульсового АД. Курение

Таблица 1

### Основные показатели обследованных больных

| Показатель                                | $\bar{X} \pm m$   |
|-------------------------------------------|-------------------|
| Систолическое АД, мм рт ст                | 132,3 $\pm$ 2,2   |
| Диастолическое АД, мм рт ст               | 78,6 $\pm$ 1,0    |
| Пульсовое АД, мм рт ст                    | 53,8 $\pm$ 1,6    |
| Индекс Кетле, кг/м <sup>2</sup>           | 26,8 $\pm$ 0,4    |
| Диурез, л                                 | 1,44 $\pm$ 0,04   |
| Концентрация альбумина крови, г/л         | 36,4 $\pm$ 0,7    |
| Концентрация креатинина сыворотки, моль/л | 0,197 $\pm$ 0,013 |
| Концентрация мочевины сыворотки, ммоль/л  | 11,3 $\pm$ 0,6    |
| Концентрация натрия сыворотки, ммоль/л    | 140,8 $\pm$ 0,2   |
| Концентрация калия сыворотки, ммоль/л     | 4,84 $\pm$ 0,07   |
| Концентрация кальция сыворотки, ммоль/л   | 2,37 $\pm$ 0,01   |
| Концентрация фосфора сыворотки, ммоль/л   | 1,47 $\pm$ 0,04   |
| Протеинурия, г/сут                        | 2,52 $\pm$ 0,38   |
| Скорость клубочковой фильтрации, мл/мин   | 44,7 $\pm$ 2,6    |

Таблица 2

### Данные липидограммы

| Показатель                                   | $\bar{X} \pm m$ |
|----------------------------------------------|-----------------|
| Холестерин, ммоль/л                          | 7,23 $\pm$ 0,22 |
| Липопротеиды высокой плотности, ммоль/л      | 1,26 $\pm$ 0,03 |
| Липопротеиды низкой плотности, ммоль/л       | 4,71 $\pm$ 0,15 |
| Липопротеиды очень низкой плотности, ммоль/л | 0,88 $\pm$ 0,04 |
| Триглицериды, ммоль/л                        | 2,36 $\pm$ 0,21 |
| Коэффициент атерогенности                    | 5,30 $\pm$ 0,35 |

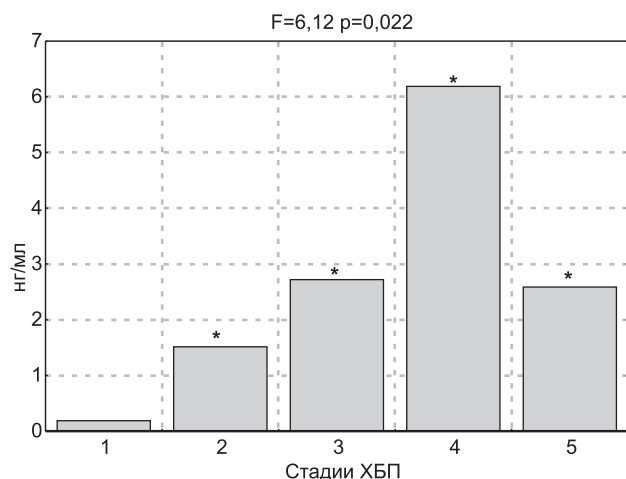


Рис. 1. Концентрация аннексина-5 у больных на разных стадиях ХБП. Примечание: \* – различия с уровнем Ан-5 при ХБП 1 ст достоверны,  $p < 0,05$ .

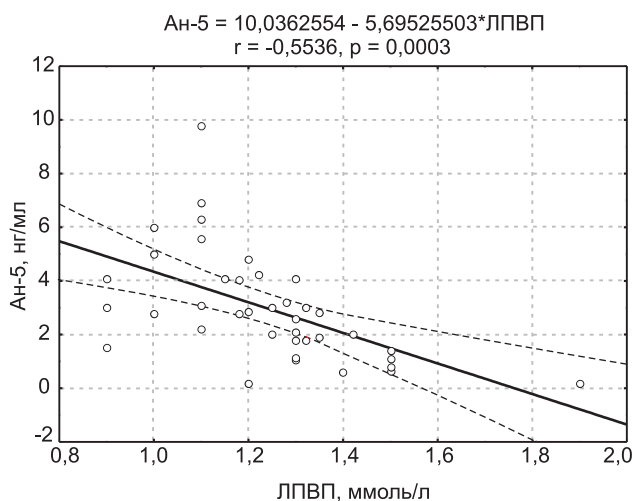


Рис. 2. Взаимосвязь между концентрацией в крови Ан-5 и ЛПВП (95% доверительный интервал).

отмечено лишь у трети больных. Степень протеинурии не достигала уровня нефротической, концентрация альбумина сыворотки не была снижена (см. табл. 1). Следовательно, активность патологии почек у больных была относительно небольшой.

Дислипидемия у больных проявлялась гиперхолестеринемией, гипертриглицеридемией и снижением уровня ЛПНП (табл. 2).

КИМ в целом по группе не был изменен и составил на левой сонной артерии  $0,759 \pm 0,039$  мм, на правой  $0,751 \pm 0,038$  мм, различия недостоверны ( $p > 0,1$ ).

Повышение уровня Ан-5 отмечалось при ХБП 2 – 4 ст (рис. 1). Наиболее высокая концентрация Ан-5 зарегистрирована при ХБП 4 ст. В нашем исследовании уровень Ан-5 не зависел от возраста и пола, величины индекса Кетле, систолического, диастолического и пульсового АД.

По результатам корреляционного и канонического анализа взаимосвязи между величиной КИМ и показателями липидограммы не выявлено. Уровень

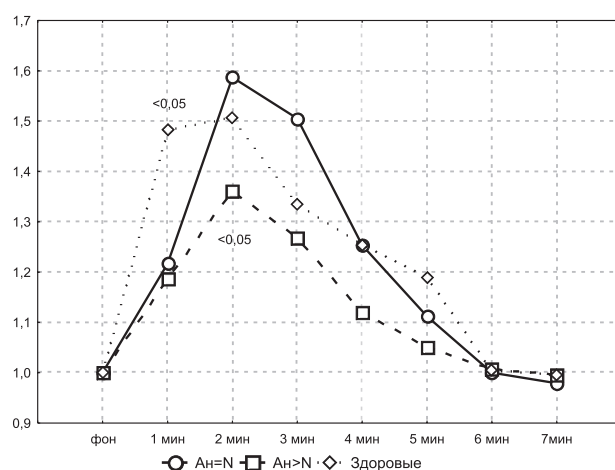


Рис. 3. Прирост скорости объемного кровотока в сосудах кожи по сравнению с фоном в пробе с ацетилхолином.

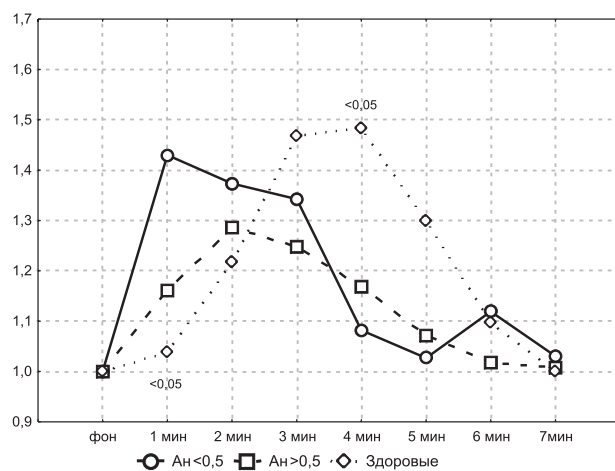


Рис. 4. Прирост скорости объемного кровотока в сосудах кожи по сравнению с фоном в пробе с нитроглицерином.

Ан-5 коррелировал с концентрацией липопротеидов высокой плотности:  $r = -0,55$ ,  $p = 0,0003$  (рис. 2).

Канонический анализ между концентрацией Ан-5 и показателями липидограммы выявил достоверную зависимость:  $R = 0,76$ ,  $\chi^2 = 13,5$ ,  $p = 0,018$ .

Результаты кожных проб с ацетилхолином и нитроглицерином представлены на рис. 3 и 4. В пробе с ацетилхолином у больных ХБП выявлено нарушение эндотелийзависимой вазодилатации. Максимальный прирост скорости объемного кровотока в коже отмечается не на 2-й минуте, как у здоровых, а на 3-й. У больных с высоким уровнем Ан-5 максимальный прирост объемного кровотока в сосудах кожи снижен по сравнению с больными ХБП, у которых уровень Ан-5 нормальный,  $p < 0,05$  (см. рис. 3).

В пробе с нитроглицерином выявлено нарушение эндотелийнезависимой вазодилатации. Максимальный прирост скорости объемного кровотока у больных ХБП возникает на 1-й и 2-й минутах, а не

на 3-й, как у здоровых. У больных с высоким уровнем Ан-5 максимальный прирост объемной скорости кровотока отмечается позже, чем у больных ХБП с нормальным уровнем Ан-5, и он ниже, чем у здоровых,  $p < 0,05$  (см. рис. 4).

### ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение факторов риска сердечно-сосудистых заболеваний имеет длительную историю. Постепенно их накапливается все больше. Год тому назад A. von Eckardstein задал вопрос «Нужны ли новые факторы риска в кардиологии?». И ответил на него утвердительно, [14] потому что уже известные факторы обладают недостаточной чувствительностью и специфичностью [15].

По понятным причинам среди «новых» факторов риска фигурируют биохимические показатели, характеризующие состояние сосудистой стенки. В частности пристальное внимание исследователей привлекает эндотелий и параметры его дисфункции [16].

Данное исследование посвящено роли Ан-5 в диагностике дисфункции эндотелия у больных ХБП. Повышение концентрации этого белка в крови свидетельствует об активизации процессов апоптоза клеток эндотелия, результатом чего может быть нарушение регуляции сосудистого тонуса. Обследованные нами больные клинически достаточно стабильны. Среди измененных клинико-лабораторных показателей отмечается обусловленная снижением скорости клубочковой фильтрации азотемия и умеренная протеинурия.

Показатели липидограммы однозначно свидетельствуют о наличии дислипидемии. Однако величина КИМ не превышает нормальных значений. Таким образом, можно говорить о «биохимической» стадии атеросклероза. Эндотелиальная дисфункция в этот период, вероятно, является основным механизмом ишемии миокарда, так же как и повышения системного артериального давления.

Результаты кожных проб свидетельствуют о том, что у больных ХБП имеется вазомоторная форма эндотелиальной дисфункции. Причем задействованы как эндотелийзависимые, так и эндотелийнезависимые механизмы. Следовательно, у больных с повышенным уровнем Ан-5 нарушения микроциркуляции выражены в большей степени, что связано с нарушением не только функции эндотелия, но и более глубоко лежащих структур сосудистой стенки. Интересно также, что Ан-5 оказался практически единственным показателем, столь тесно связанным с дислипидемией.

Постепенное повышение уровня Ан-5 по мере

снижения скорости клубочковой фильтрации свидетельствует о прогрессирующем характере расстройств микроциркуляции у больных ХБП. Интересно, что уровень Ан-5 у наших больных ХБП 2-5 ст при умеренной выраженности «классических» факторов риска, и отсутствии клинической симптоматики не отличается от уровня Ан-5 у больных с нестабильной стенокардией и острым инфарктом миокарда [17].

Исследований, посвященных нарушениям микроциркуляции при ХБП, пока немного. В частности, показано снижение поток-опосредованной эндотелийзависимой вазодилатации плечевой артерии не только у больных хроническим гломерулонефритом с нефротическим синдромом [18, 19], но и с изолированным мочевым синдромом [20]. Однако выраженность атеросклероза у этих больных не оценивалась.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты позволяют считать, что определение уровня Ан-5 в крови может служить важным дополнением к традиционно используемым методам оценки состояния сердечно-сосудистой системы у больных ХБП. Его повышение особенно информативно при отсутствии клинической симптоматики атеросклероза и свидетельствует о наличии эндотелиальной дисфункции, в том числе ее вазомоторной формы, обусловленной как эндотелийзависимыми, так и эндотелийнезависимыми механизмами. Кроме того, Ан-5 позволяет оценить выраженность апоптоза и может использоваться для более детальной прогностической оценки вероятности наступления сердечно-сосудистых катастроф у больных ХБП.

### БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Collins AJ, Li Sh, Gilbertson D et al. Chronic kidney disease and cardiovascular disease in the Medicare population. *Kidney Int* 2003; 64 [suppl 87]: 24-31
2. Rabelink TJ. Cardiovascular risk in patients with renal disease: treating the risk or treating the risk factor? *Nephrol Dial Transplant* 2004; 19: 23-26
3. Yusuf S, Reddy S, Ounpuu S, Anand S. Global burden of cardiovascular diseases: part I: general considerations, risk factors and impact urbanization. *Circulation* 2001; 104: 2746-2653
4. Fisher SA, Langille BL, Srivastava D. Apoptosis during cardiovascular development. *Circ Res* 2000; 87: 856-864
5. Gerke V, Moss ES. Annexins: From Structure to Function. *Physiol Rev* 2002; 82: 331-371
6. Hawkins TE, Das D, Young B, Moss SE. DT40 cells lacking the Ca<sup>2+</sup>-binding protein annexin-5 are resistant to Ca<sup>2+</sup>-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci* 2002; 99: 8054-8059
7. Fadok VA, Bratton DL, Warner ML, Henson PM. The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death Differ* 1998; 5: 551-562
8. Bombeli T, Karsan A, Harlan JM. Apoptotic vascular endothelial cells become procoagulant. *Blood* 1997; 89: 2429-2442

9. Bjorkerud S, Bjorkerud B. Apoptosis is abundant in human atherosclerotic lesions, especially in inflammatory cells (macrophages and T-cells), and may contribute to the accumulation of gruel and plaque instability. *Am J Pathol* 1996; 149 (2): 367-380
10. Gerke V, Moss ES. Annexins: From Structure to Function. *Physiol Rev* 2002; 82: 331-371
11. Dayer E, Blanc E, Wauters JPE. Dayer early T cell activation correlates with expression of apoptosis markers in patients with end-stage renal disease. *Am Soc Nephrol* 2002; 13(1): 204-12
12. Martin-Malo A, Carracedo J, Ramirez R, Rodriguez-BenoDayer Et A, Soprano S, Rodriguez M, Aljama P. Effect of uremia and dialysis modality on mononuclear cell apoptosis. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11(5): 936-42
13. Петрищев НН, Меншутина МА, Власов ТД и др. Патент на полезную модель №4720. Приоритет полезной модели от 12.04.2005
14. von Eckardstein A. Is there a need novel cardiovascular risk factors? *Nephrol Dial Transplant* 2004; 19: 761-765
15. Hense HW, Schulte H, Lowel H et al. Framingham risk function overestimates risk of coronary heart disease in men and women from Germany - results from the MONICA Augsburg and Procam cohorts. *Eur Heart J* 2003; 31: 937-345
16. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases. The Role of oxidant stress. *Circ Res* 2000; 87: 840-844
17. Васина АВ. Маркеры апоптоза и дисфункция эндотелия при остром коронарном синдроме. *Регионарное кровообращение и микроциркуляция* 2004; 3 (12): 5-10
18. Ребров АП, Зелепукина НЮ. Дисфункция эндотелия у больных хроническим гломерулонефритом в различных стадиях почечной недостаточности. *Нефрология и диализ* 2001; 3 (4): 39 - 46
19. Watts GF, Herrmann S, Dogra GK et al. Vascular function of the peripheral circulation in patients with nephrosis. *Kidney Int* 2001; 60 (1): 182 - 187
20. Paisley KE, Beaman M, Tooke JE et al. Endothelial dysfunction and inflammation in asymptomatic proteinuria. *Kidney Int* 2003; 63 (2): 624 - 631

Поступила в редакцию 27.04.2005 г.