

УДК 616.839-06:616.831-005-07

© В.А. Визир, И.Н. Волошина, 2012.

ПРОГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ЭЛЕВАЦИИ НЕЙРО-ИММУННЫХ МАРКЕРОВ У БОЛЬНЫХ С ЭССЕНЦИАЛЬНОЙ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ И ПОСЛЕДСТВИЯМИ ИНФАРКТА МОЗГА

В.А. Визир, И.Н. Волошина*Кафедра внутренних болезней №2, Запорожский государственный медицинский университет, г. Запорожье.*

PROGNOSTIC VALUE OF NEUROIMMUNE MARKERS ELEVATION IN POST-STROKE HYPERTENSIVES
V.A. Vizir, I.M. Voloshyna

SUMMARY

The evaluation of serum interleukin-17 level and quantity measurements of antibodies to NR2-peptide in post-stroke hypertensive patients has been done. It has been established that the quantity of antibodies to NR2-peptide has a strong predictive value for cardiovascular complications and recurrent stroke.

ПРОГНОСТИЧНА ЗНАЧИМІСТЬ ЕЛЕВАЦІЇ НЕЙРОІМУННИХ МАРКЕРІВ У ХВОРИХ З ЕСЕНЦІАЛЬНОЮ АРТЕРІАЛЬНОЮ ГІПЕРТЕНЗІЄЮ ТА НАСЛІДКАМИ ІНФАРКТУ МОЗКУ

В.А. Візір, І.М. Волошина

РЕЗЮМЕ

В дослідженні проведено визначення сироваткового вмісту інтерлейкіну-17 і антитіл до NR2-пептиду у пацієнтів з гіпертонічною хворобою III стадії з наслідками інфаркту мозку, встановлено прогностичну значущість цих аутоімунних маркерів для розвитку церебро- і кардіоваскулярних ускладнень.

Ключевые слова: гипертоническая болезнь, интерлейкин-17, антитела к NR2-пептиду.

В последние десятилетия отмечается стойкая тенденция роста распространенности артериальной гипертензии (АГ) во всем мире. Многочисленными эпидемиологическими и рандомизированными исследованиями доказано, что АГ является одним из главных факторов таких грозных осложнений как мозговой инсульт и инфаркт миокарда, принося огромный экономический ущерб [2, 6]. Установлена непрерывная и практически линейная зависимость между уровнем АД (как систолического, так и диастолического) и частотой развития инфаркта мозга. По эпидемиологическим данным, у каждого пятого выжившего пациента возникает повторный ишемический инсульт в течение 5 лет после первой мозговой катастрофы [2, 6]. Несмотря на особую актуальность проблемы вторичной профилактики инсульта, патогенетические аспекты прогрессирования гипертонической болезни после перенесенного инфаркта мозга остаются недостаточно изученными. Проведенными ранее исследованиями показано существование сложной интегральной взаимосвязи между морфофункциональными элементами нервной, эндокринной и иммунной систем, о чем свидетельствует наличие тождественных рецепторов к лимфокинам, нейропептидам и нейрогормонам на плазматических мембранах клеток нервной и иммунной системы. Выявлено, что возникающий дисбаланс нейроиммунных связей может приводить к нарушению

функции иммунной системы и способствовать развитию аутоиммунных реакций к антигенам мозга [4, 6, 9]. В ретроспективном наблюдении А.А. Скоромец и соавт. (2003) было показано, что повышение титров антител к NR2-пептиду, являющимся фрагментом NMDA-рецепторов, экспрессированных преимущественно в центральной нервной системе, ассоциируется с увеличением риска инсульта и транзиторной ишемической атаки. Интерлейкин-17 является недавно выявленным цитокином, который регулирует развитие аутоиммунного ответа, модулирует процессы сосудистого воспаления, участвует в формировании гипертензивных реакций [8]. Целенаправленного изучения патогенетической роли нейроиммунных маркеров и их прогностической ценности у больных с АГ, перенесших ишемический инсульт, ранее не проводилось.

Целью исследования явилось определение прогностической значимости содержания интерлейкина-17 и антител к NR2-пептиду у больных с эссенциальной артериальной гипертензией и последствиями инфаркта мозга.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Данное клиническое исследование проводилось в соответствии с этическими принципами Хельсинкской Декларации после получения соответствующего разрешения локального этического комитета ЗГМУ. Обследовано 120 больных (76 мужчин, 44 жен-

щин)с диагнозом «Гипертоническая болезнь III стадии (ГБ), последствия перенесенного ишемического инсульта», перенесших ИМ давностью более 12 месяцев. Топография церебрального поражения была представлена следующим образом: в 39 случаях – в вертебро- базилярном бассейне, у 29 пациентов – в системе каротид справа, в 33 случаях – в системе каротид слева; 19 пациентов перенесли ранее более одного ИМ. Средний возраст пациентов составил $59 \pm 0,9$ лет. Критерии включения больных в исследование: установленный диагноз ГБ III стадии, наличие перенесенного ишемического инсульта давностью более 1 года, возраст больных старше 18 лет, синусовый ритм сердца, согласие на участие в исследовании.

Критерии исключения: наличие симптоматических артериальных гипертензий, тяжелая сердечная недостаточность, сахарный диабет, острый коронарный синдром в анамнезе давностью менее 6 меся-

цев, фракция выброса левого желудочка $<45\%$, тяжелая почечная и печеночная недостаточность, аутоиммунные заболевания, наличие любых воспалительных процессов на момент включения, органическая неврологическая патология кроме перенесенного ишемического инсульта.

Контрольную группу составили 20 клинически здоровых лиц (12 мужчин, 8 женщин) в возрасте $54 \pm 3,8$ года, не имеющих в анамнезе артериальной гипертензии и цереброваскулярных заболеваний. Всем пациентам и волонтерам было проведено общеклиническое обследование с определением клинического уровня АД, частоты сердечных сокращений (ЧСС), индекса массы тела (ИМТ), уровня липопротеидов низкой плотности (ЛПНП). Клиническая характеристика обследованных лиц представлена в табл. 1, из которой видно, что по полу, возрасту, частоте курения и массе тела группы обследуемых были сопоставимы.

Таблица 1

Клиническая характеристика обследованных лиц

Показатель	Группа с ГБ III стадии (n=120)	Контрольная группа (n=30)	P
Возраст, лет	$59 \pm 0,9$	$54 \pm 3,8$	>0.05
Пол, % женщин	44 (36,7%)	8 (40%)	>0.05
Курение, %	31 (25,8%)	4 (20%)	>0.05
ИМТ, кг/м ²	$28 \pm 0,5$	$28 \pm 0,9$	>0.05
АД			
Систолическое, мм рт.ст.	$159,7 \pm 1,1$	126 [123-129]	<0.05
Диастолическое, мм рт.ст.	$99,3 \pm 0,7$	76 [73-79]	<0.05
ЧСС, уд/мин.	76 ± 4	71 ± 2	>0.05
Длительность ГБ, лет	$18,1 \pm 0,8$	-	NA
ЛПНП, ммоль/л	$3,8 \pm 0,4$	$2,3 \pm 0,3$	<0.05
Тяжесть АГ, I/II/III, %	47/45/8	-	NA
Сопутствующая ИБС, %	12 (10%)	-	NA
Сопутствующая СН (I-II ФК NYHA), %	13 (10,8%)	-	NA

Примечание: Данные представлены в виде средней (M) либо в долях; ДИ – доверительный интервал; NA – «неприменимо», СН – сердечная недостаточность, ИБС – ишемическая болезнь сердца, ИМТ – индекс массы тела; P – уровень значимости.

Уровни нейроиммунных маркеров определяли иммуноферментным методом (ИФА) на базе центральной научно-исследовательской лаборатории ЗГМУ (зав. д.мед.н. проф. Абрамов А.В.). Образцы крови для ИФА брали из локтевой вены, контрлатеральной той руке, где измерялось АД, утром, натощак, до приема медикаментов, в состоянии покоя. На момент проведения исследования все обследованные лица либо не получали постоянной антигипертензивной терапии, либо она была отменена за 48 часов до включения больных в исследование. Сыворотку крови отделяли методом центрифугирования и незамедлительно замораживали при темпера-

туре -70°C до момента проведения анализа. Наличие аутоиммунного ответа и антител к мозговым антигенам определяли следующим образом: сывороточный уровень интерлейкина-17 измеряли с помощью наборов eBioscience (Австрия); количественное определение антител к NR2-единице рецептора NMDA производилось с помощью наборов Gold Dot NR2 Antibody Test, Biotech, INC (Германия). Полученные лабораторные данные использовались в построении последующей прогностической модели выживания.

После этапа рандомизации, всем больным назначалась комплексная терапия, включавшая ацетил-

салициловую кислоту, аторвастатин и, как минимум, два антигипертензивных препарата «первой» линии: индапамид+карведилол либо индапамид+лерканидипин. В соответствии с целью исследования была создана первичная конечная клиническая точка, в качестве которой рассматривали все случаи смерти по любой причине, а также случаи нефатальных церебро- и кардиоваскулярных событий (мозговой инсульт, инфаркт миокарда, фибрилляция предсердий). Период наблюдения составил 365 ± 10 дней от момента включения пациентов в исследование.

Полученные результаты представляли в виде средней (M) и стандартной ошибки среднего (m), или 95% доверительного интервала ($ДИ$). Оценку выживания больных осуществляли путем построения кривых доживания методом Каплана-Майера. Для выявления предикторов неблагоприятного течения ГБ использовали модель пропорциональных рисков Кокса. Чувствительность и специфичность предикторов определяли путем построения ROC-кривых. Внутри- и межгрупповые различия оценивали с по-

мощью двухвыборочного Т-теста или χ^2 -теста в зависимости от вида данных в рамках программы StatPlus 2009. Статистически достоверными считали различия между показателями при отклонении нулевой гипотезы и уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка выживаемости в группе исследуемых пациентов проводилась через один год от момента включения в исследование. За указанный период наблюдения зарегистрировано 11 комбинированных конечных клинических точек, что составило 9,16% от общего числа больных ($n=120$), включенных в исследование. Кумулятивное выживание больных с АГ и последствиями ИМ составило 90,8%.

Осложнения, приведшие к смерти, были зарегистрированы в трех случаях (2,5%). Частота возникновения всех инсультов составила 4,9%; кардиальных осложнений – 4,16%. Структура зарегистрированных осложнений представлена на рис. 1, исходя из условия, что общее количество неблагоприятных исходов принято за 100%.

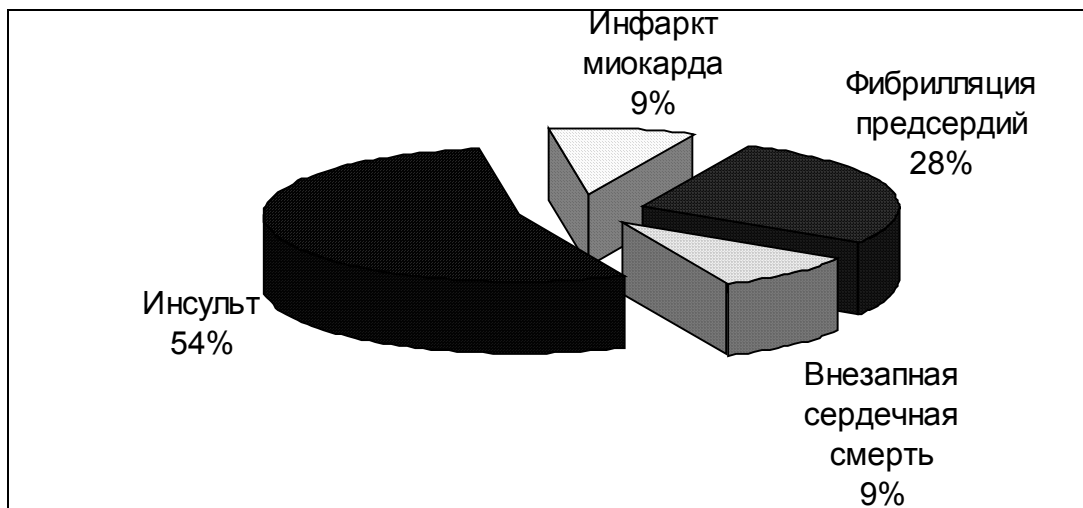


Рис. 1. Структура зарегистрированных первичных конечных точек за период наблюдения.

Анализ сывороточного содержания нейроиммунных маркеров показал, что достоверно более высокие значения как ИЛ-17, так и количества антител к NR2-

пептиду отмечались у пациентов с ГБ III стадии, перенесших ИМ, по сравнению с нормотензивными лицами без цереброваскулярной патологии (табл. 2).

Таблица 2

Сывороточные уровни интерлейкина-17 и количество антител к NR2-пептиду у обследованных лиц

Показатели	ГБ III стадии	Контрольная группа	P
ИЛ-17, пг/мл	$4,49 \pm 0,3$	$3,4 \pm 0,3$	$< 0,05$
Количество антител к NR2-пептиду, нг/мл	$4,07 \pm 0,3$	$1,55 \pm 0,1$	$< 0,05$

Примечание. P – уровень достоверности.

При анализе сывороточной концентрации антител к NR2-пептиду в зависимости от количества зон инфаркта мозга, обнаружено, что множественные инфаркты были ассоциированы с двукратным увеличением скорости антителообразования, по сравнению с теми пациентами, у которых в анамнезе был

только один ишемический инсульт (рис.2).

На рис. 3 (А и Б) представлены графические данные ROC-анализа, исходя из которого видно, что определение количества антител к NR2-пептиду является достаточно чувствительным и специфичным методом для прогнозирования церебро- и кардиовас-

кулярных осложнений. Граничным значением (cut-off), при превышении которого регистрируется дос-

товерное увеличение частоты осложнений, выявилось 3,97 нг/мл.

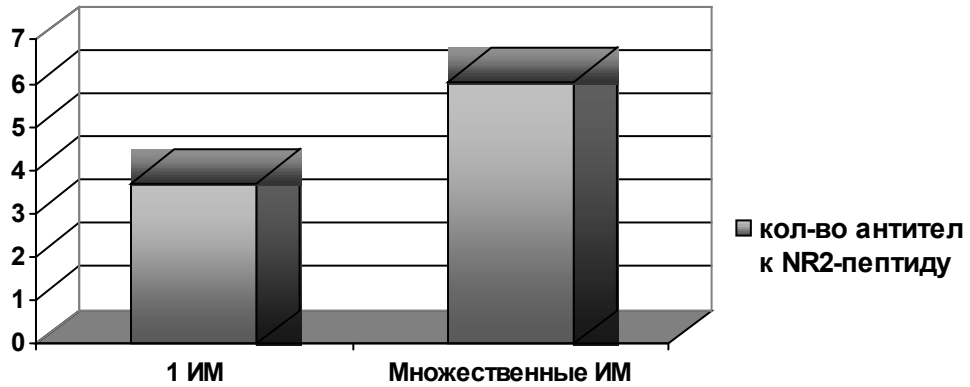


Рис. 2. Содержание антител к NR2-пептиду в зависимости от числа перенесенных инфарктов мозга.

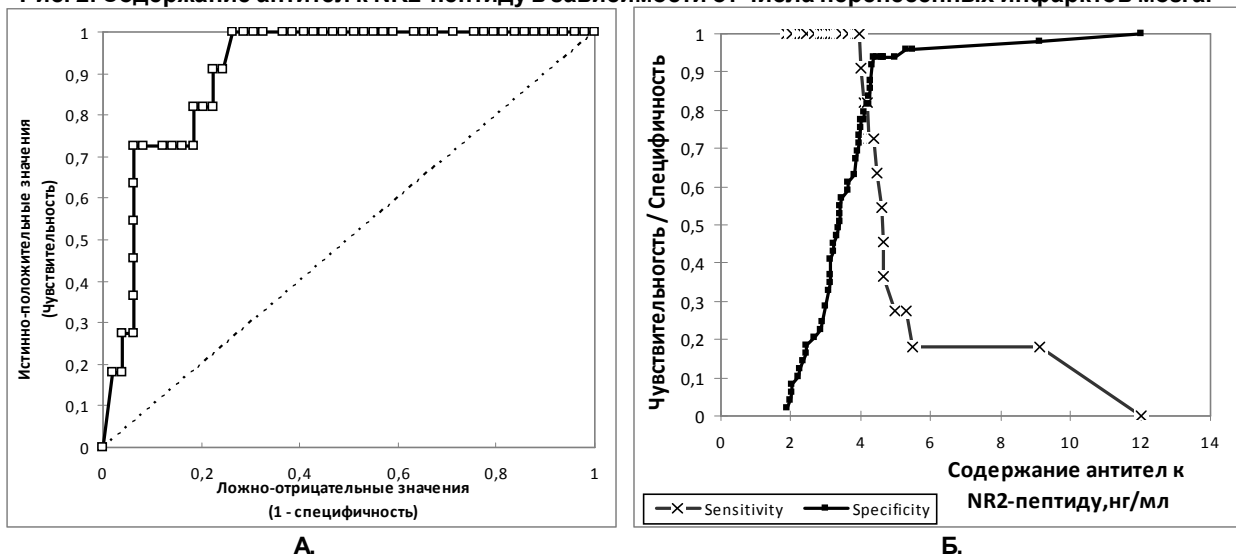


Рис. 3. А. ROC-кривая зависимости частоты церебро- и сердечно-сосудистых событий от количества антител к NR2-пептиду в периферической крови. Площадь под кривой (AUC) – 0,906; чувствительность- 69,5%, специфичность – 59,6%.
 Б. График чувствительности/специфичности количества антител к NR2-пептиду в зависимости от частоты возникновения первичной конечной точки. Граничное значение – 3,97 нг/мл.

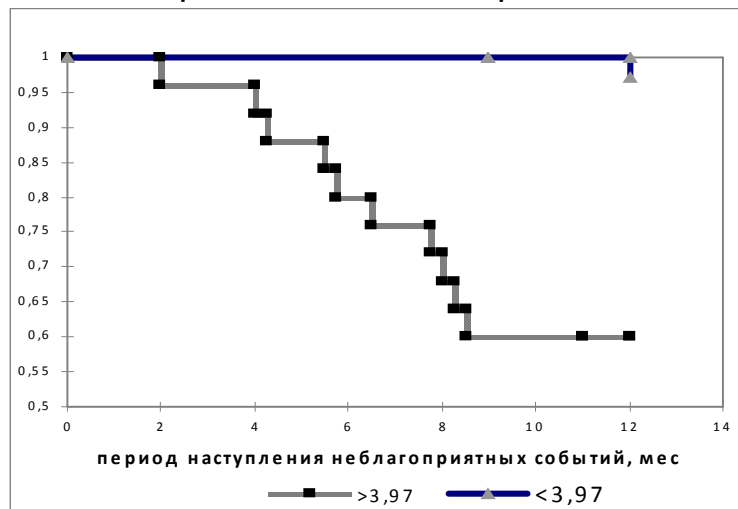


Рис. 4. Кривые выживания (Каплана-Мейера) в течение 12 мес. больных с АТ и последствиями инфаркта мозга в зависимости от количества антител к NR2-пептиду. Значение Log-Rank test=14,4; критичное – 3,84; (p<0,05).

При построении модели пропорциональных рисков Кокса установлено, что достоверной прогностической значимостью обладает показатель количества антител к NR2-пептиду, в то время как повышение

ИЛ-17 недостоверно коррелирует с частотой первичной конечной точки. Кривые выживания Каплана-Мейера, распределенные в зависимости от уровня антител к NR2-пептиду, представлены на рис. 4.

Таблица 3

Однофакторная модель Кокса вероятных предикторов первичной конечной точки у больных ГБ III ст. с последствиями инфаркта мозга

№	Показатель, граничные значения	b	M	p	Отношение рисков (HR)	95% ДИ
1	Количество антител к NR2-пептиду >3,97 нг/мл	0,222	0,081	<0,05	1,25	1,06-1,46
2	Уровень ИЛ-17 >3,8 пг/мл	0,02	0,015	>0,05	1,02	0,95-1,34

Примечание: b – коэффициент регрессии; m – стандартная ошибка; HR – hazard ratio; p – степень достоверности.

Таким образом, полученные результаты исследования отражают участие аутоиммунных факторов в патогенезе прогрессирования гипертонической болезни и возникновения церебро- и кардиоваскулярных осложнений у больных, перенесших ишемический инсульт. Достоверно более высокая сывороточная концентрация ИЛ-17 у гипертонических пациентов с хронической цереброваскулярной патологией является признаком иммуновоспалительной активации с аутоиммунным компонентом. Ранее в экспериментальных исследованиях было показано, что у животных с отсутствием гена, ответственного за продукцию ИЛ-17, не наблюдается хронизации гипертонической реакции и нарушения эндотелий-зависимой вазодилатации, в отличие от животных с индуцированной гипертонией. Было выявлено, что ИЛ-17 стимулирует хемотаксис клеток воспаления и частично высвобождает из них хемокины. Аккумуляция лимфоцитов в сосудистой стенке была достоверно меньшей у мышей с отсутствием ИЛ-17, чем у гипертонических животных [1, 5]. В клинических исследованиях повышение сывороточной концентрации ИЛ-17 наблюдалось у больных с псориазом и ревматоидным артритом [7]. Элевация уровня данного цитокина у больных ГБ с последствиями инфаркта мозга не является прогностически специфичной, однако, отражает степень иммуновоспалительного ответа.

Последствия тяжёлых иммунологических изменений в организме при остром инсульте описаны во многих исследованиях [9]. Наблюдений, касающихся изучения иммунологического статуса в отдаленные периоды после церебральной катастрофы на фоне гипертонии, накоплено недостаточно. В данной работе впервые получены данные о том, что в условиях стойкого, хронического повышения артериального давления, в отдаленные сроки после острой церебральной ишемии, регистрируется повышение количества антител к пептидному остатку NMDA-рецепторов, т.е. аутоантигенам мозговой ткани. Пер-

вый контакт иммунокомпетентных клеток с нервной системой происходит на уровне гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), где NMDA-рецепторы представлены на эндотелии капилляров, таким образом, первичная аутоагрессия происходит именно на уровне церебральных микрососудов [3]. Очевидно, что в условиях неконтролируемой гипертонии, аутоиммунный процесс приобретает хронический прогрессирующий характер дальнейшим поражением структур центральной нервной системы. Это подтверждает выявленный нами факт почти двукратного увеличения количества антител к NR2-пептиду у больных с множественными инфарктами мозга. Несмотря на то, что данное исследование носило проспективный характер, пациенты получали агрессивную комплексную терапию, включающую антиагреганты, статины и двойную антигипертоническую терапию, включающую диуретик, антагонист кальция или бета-блокатор III поколения [10], за достаточно длительный период наблюдения – 1 год, были получены конечные клинические точки, что отражает высокий кардиоваскулярный риск данной категории пациентов. Из прогностических моделей следует, что при превышении сывороточной концентрации количества антител к NR2-пептиду свыше 3,97 нг/мл, кумулятивный риск развития церебро- и кардиоваскулярных осложнений у больных с ГБ III ст., перенесших ИМ, составляет 25% (HR=1,25). Вычисленная прогностическая модель обладает достаточной степенью точности (AUC=0,906), что позволяет рекомендовать использование данного показателя в клинической практике.

ВЫВОДЫ

1. У больных гипертонической болезнью III стадии с последствиями инфаркта мозга наблюдаются процессы нейроиммунной активации, проявляющиеся элевацией сывороточных концентраций интерлейкина-17 и количества антител к NR2-пептиду.

2. У больных с артериальной гипертонией и множественными инфарктами мозга количество ан-

тител к NR2-пептиду достоверно выше, чем у пациентов, перенесших один эпизод церебральной ишемии.

3. Превышение сывороточной концентрации количества антител к NR2-пептиду свыше 3,97 нг/мл, ассоциируется с увеличением кумулятивного риска развития церебро- и кардиоваскулярных осложнений на 25% у больных с гипертонической болезнью III стадии, перенесших инфаркт мозга.

Перспективы дальнейших исследований. Учитывая полученные результаты данной работы об участии аутоиммунных факторов в патогенезе прогрессирования гипертонической болезни у больных, перенесших ишемический инсульт, считаем целесообразным проведение дальнейших проспективных исследований по изучению патогенетической роли аутоиммунного процесса при цереброваскулярной патологии на фоне артериальной гипертензии.

ЛИТЕРАТУРА

1. A distinct subset of natural killer T cells produces IL-17, contributing to airway infiltration of neutrophils but not to airway hyperactivity / Lee K.A., Kang M.H., Lee Y.S. [et al.] // *Cell Immunol.* – 2008. – Vol. 251. – P. 50–55.

2. Blood pressure and stroke: an overview of published reviews / Lawes C.M., Bennett D.A., Feigin V.L., Rodgers A. // *Stroke.* – 2004. – Vol. 35. – p. 776–85.

3. Blood test detecting autoantibodies to N-methyl-D-aspartate neuroreceptors for evaluation of patients with transient ischemic attack and stroke / S.A. Dambinova,

G.A. Khounteev, G.A. Izykenova [et al.] // *Clin. Chem.* – 2003. – Vol. 49. – P. 1752–1762.

4. Bornstein N.M. Antibodies to brain antigens following stroke / N.M. Bornstein, B. Aronovich, A.D. Korczyn [et al.] // *Neurology.* – 2001. – Vol. 56. – P. 529–530.

5. Differential regulation of central nervous system autoimmunity by Th-1 and Th-17 cells / I.M. Stromnes, L.M. Cerretti, D. Liggitt [et al.] // *Nat. Med.* – 2008. – Vol. 14. – P. 337–342.

6. Evidence-based practice for stroke / Langhorne P, Sandercock P, Prasad K. // *Lancet Neurology.* – 2009. – Vol. 8. – P. 308–309.

7. Foxp3⁺ CD25⁺ CD4⁺ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease / Sakaguchi S., Ono M., Setoguchi R. [et al.] // *Immunol Rev.* – 2006. – Vol. 212. – P. 8–27.

8. Furuzawa-Carballeda J. Autoimmune inflammation from the Th17 perspective / J. Furuzawa-Carballeda, M.I. Vargas-Rojas, A. R. Cabral // *Autoimmun Rev.* – 2007. – Vol. 6. – P. 169–175.

9. Peak plasma interleukin-6 and other peripheral markers of inflammation in the first week of ischaemic stroke correlate with brain infarct volume, stroke severity and long-term outcome / C.J. Smith, H.C. Emsley, C.M. Gavin [et al.] // *BMC Neurol.* – 2004. – Vol. 4. – P. 223–228.

10. Reappraisal of European guidelines on hypertension management: a European Society of Hypertension Task Force document / G. Mancia, S. Laurent, E. Agabiti-Rosei [et al.] // *Blood Pressure.* – 2009. – Vol. 27. – P. 2121–2158.