

Диагностическое значение шаперонной активности белков теплового шока 70 при коронарном атеросклерозе

Ю.А. Котова[✉], А.А. Зуйкова, А.Н. Пашков
ФГБОУ ВО «Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко»
Минздрава России, Воронеж, Россия
[✉]kotova_u@inbox.ru

Аннотация

Цель. Изучить роль шаперонной активности белков теплового шока (БТШ) 70 в патогенезе и диагностике коронарного атеросклероза.

Материалы и методы. В исследовании приняли участие 354 пациента с диагнозом «ишемическая болезнь сердца», верифицированного стандартизированными валидизированными критериями и клинико-функциональными методами. Наличие коронарного атеросклероза у пациентов подтверждалось проведением коронароангиографии по методике Judkins (1967 г.). Тяжесть коронарного атеросклероза определяли на основании индекса Gensini. По индексу Gensini пациенты были разделены на 2 группы: GS0 – 152 пациента без признаков коронарного атеросклероза, GS1 – 202 пациента с поражением коронарного русла. Шаперонную активность БТШ70 определяли термодинамическим способом.

Результаты. В исследовании показаны достоверные различия по уровню шаперонной активности БТШ70 у пациентов с разной выраженностью коронарного атеросклероза. При проведении корреляционного анализа установлена достоверная отрицательная взаимосвязь между шаперонной активностью БТШ70 и индексом Gensini. Установлено отрезное значение шаперонной активности БТШ70, по которому можно судить о наличии или отсутствии коронарного атеросклероза.

Заключение. Выявленный порог шаперонной активности БТШ70 может рассматриваться в качестве возможного маркера выраженности коронарного атеросклероза.

Ключевые слова: шаперонная активность, белки теплового шока, коронарный атеросклероз, ишемическая болезнь сердца, индекс Gensini.

Для цитирования: Котова Ю.А., Зуйкова А.А., Пашков А.Н. Диагностическое значение шаперонной активности белков теплового шока 70 при коронарном атеросклерозе. *CardioСоматика*. 2019; 10 (3): 60–64. DOI: 10.26442/22217185.2019.3.190400

Original Article

Diagnostic value of chaperone activity of heat shock proteins 70 in coronary atherosclerosis

Julia A. Kotova[✉], Anna A. Zuikova, Alexander N. Pashkov
Burdenko Voronezh State Medical University, Voronezh, Russia
[✉]kotova_u@inbox.ru

Abstract

Aim. The aim of the research was to study the role of chaperone activity heat shock proteins (HSP) 70 in pathogenesis and diagnostic in patients with coronary atherosclerosis.

Materials and methods. We examined 354 patients with coronary heart disease, who had coronary atherosclerosis of varying degrees, according to coronary angiography (was performed by the Judkins technique). The severity of coronary atherosclerosis was determined on the basis of the Gensini index. According to the Gensini index, patients were divided into 2 groups: GS0 – 152 patients without signs of coronary atherosclerosis, GS1 – 202 patients with coronary lesions. Chaperone activity was determined by thermodynamic method.

Results. The study showed significant differences in the level of chaperone activity HSP70 in patients with different severity of coronary atherosclerosis. The correlation analysis revealed a significant negative relationship between chaperone activity HSP70 and the Gensini index. The cut-off value of chaperone activity of HSP70, by which can be judged on the presence or absence of coronary atherosclerosis, is establish.

Conclusion. The revealed threshold of chaperone activity can be considered as a possible marker of the severity of coronary atherosclerosis.

Key words: chaperone activity, heat shock proteins, coronary atherosclerosis, coronary heart disease, Gensini index.

For citation: Kotova Ju.A., Zuikova A.A., Pashkov A.N. Diagnostic value of chaperone activity of heat shock proteins 70 in coronary atherosclerosis. *Cardiosomatics*. 2019; 10 (3): 60–64. DOI: 10.26442/22217185.2019.3.190400

Введение

Основным компонентом развития ишемической болезни сердца является коронарный атеросклероз [1, 2].

Представление о том, что в патогенезе атеросклероза участвуют иммунные комплексы, было выдвину-

то G. Wick и соавт., и знание о том, что окисленные липопротеины низкой плотности (ЛПНП) токсичны для эндотелиальных клеток, побудило исследовать природу иммунной реактивности, индуцированной окисленными ЛПНП, и пролиферацию гладкомышечных клеток в артериальных стенках [3].

В последние годы было получено значительное представление об участии врожденной и адаптивной иммунной реактивности в атеросклерозе, а также о роли белков теплового шока (БТШ) 60, 70 и 90 семейств в патогенезе заболевания [4]. БТШ70 ослабляют активацию NF-κB, что предполагает противовоспалительную активность данных БТШ [5]. Установлено, что шаперонная активность БТШ70 в плазме крови имеет обратную ассоциацию с тяжестью атеросклероза [6].

Установлено, что высокий уровень холестерина снижает шаперонную активность БТШ70 [7]. Про- и антиатерогенные эффекты БТШ70 в настоящее время являются предметом обсуждения [8].

В связи с этим становится актуальным изучение роли шаперонной активности в патогенезе и диагностике коронарного атеросклероза.

Цель исследования – изучение роли шаперонной активности БТШ70 в патогенезе и диагностике коронарного атеросклероза.

Материалы и методы

Материалом для исследования стало обследование 354 пациентов с диагнозом «ишемическая болезнь сердца», верифицированного стандартизированными валидизированными критериями и клинико-функциональными методами, в том числе 175 женщин и 179 мужчин в возрасте от 47 до 75 лет, средний возраст $61,8 \pm 8,1$ года, находившихся на лечении в кардиологическом отделении №2 БУЗ ВО ВГКБСМП №1.

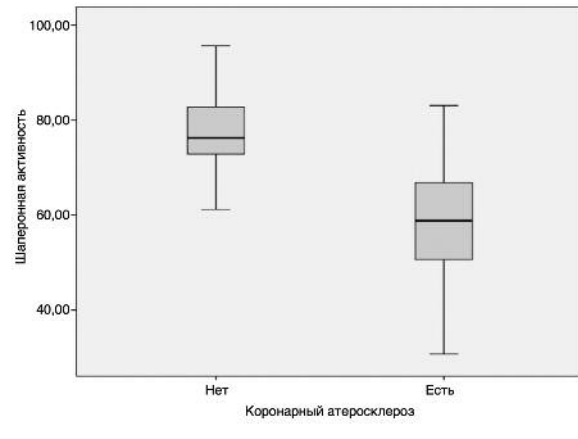
Всем пациентам в стационаре проводился полный спектр обследования с определением показателей липидного профиля. Наличие коронарного атеросклероза у пациентов подтверждалось проведением коронароангиографии по методике Judkins (1967 г.). Исследование проводилось при помощи ангиографической системы General Electric Innova-3100 (GE Healthcare, США). Доступ осуществлялся правым трансфеморальным доступом по Seldinger.

Тяжесть коронарного атеросклероза определяли на основании индекса Gensini. Индекс Gensini определяется как сумма произведений индекса тяжести каждого стеноза и индекса функционального значения, рассчитанного для каждого сегмента коронарных артерий [9]. По индексу Gensini пациенты были разделены на 2 группы: GS0 – 152 пациента без признаков коронарного атеросклероза (необструктивное поражение коронарных артерий), GS1 – 202 пациента с поражением коронарного русла.

Шаперонную активность определяли с помощью добавления к раствору фосфатного буфера (1,6 мл), инсулина (50 мкл) и дитиотреитола (50 мкл), далее к полученному раствору добавляли 2,5 мкл сыворотки (производитель Cloud-Clone Corp.). Затем пробу нагревали до температуры 42°C. Регистрация шаперонной активности проводилась методом динамического светорассеяния при длине волны 430 нм на приборе Spekol Carl Zeiss Jena с термостатируемой приставкой EK-5 путем построения кинетической кривой с лаг-периодом, измерения проводились в процентах [10].

Определение окислительной модификации белков в сыворотке крови проводили по методике Дубининой [11]. Оптическую плотность 2,4-динитрофенилгидразонов регистрировали на спектрофотометре СФ-36: при длине волны 356 и 370 нм определялось содержание альдегидо- и кетонпроизводных динитрофенилгидразонов нейтрального характера (АДФГн и КДФГн), при длине волны 430 и 530 нм –

Рис. 1. Значения шаперонной активности БТШ70 в группах с наличием и отсутствием коронарного атеросклероза.
Fig. 1. Values of chaperone activity HSP70 in groups with and without coronary atherosclerosis.



альдегидо- и кетонпроизводных основного характера (АДФГн и КДФГн).

Активность супероксиддисмутазы определяли спектрофотометрическим методом с расчетом процента гашения.

Для определения уровня гомоцистеина использовали тест-систему для количественного определения общего L-гомоцистеина в человеческой сыворотке или плазме (фирма-производитель Axis-Shield).

Статистическая обработка результатов исследования проводилась с помощью пакетов программ SPSS Statistics 20. Различия между группами определялись с помощью критерия Манна–Уитни (достоверные различия при $p < 0,05$). Описание признаков с распределением, отличным от нормального, представлено в виде Me [Q₂₅; Q₇₅], где Me – медиана, Q₂₅ и Q₇₅ – 25 и 75-й квартили. Для сравнения качественных признаков использовался χ^2 -критерий Пирсона. Для оценки корреляционных связей между параметрами использовался критерий Спирмена. Коэффициент корреляции считался значимым при $p < 0,05$. Для оценки вероятности обнаружения коронарного атеросклероза применяли линейный регрессионный анализ. Шансом в каждой группе пациентов называли вероятность наличия исследуемого признака к вероятности его отсутствия. Чувствительность и специфичность маркера определяли при помощи ROC-анализа.

Результаты

При наличии коронарного атеросклероза значения шаперонной активности БТШ70 оказались в среднем на 22,8% выше относительно второй группы больных без признаков поражения артерий сердца по данным коронароангиографии. Сравнение значений шаперонной активности БТШ70 в этих группах выявило значимые различия по U-критерию Манна–Уитни: шаперонная активность БТШ70 в первой группе составила 58,85 [50,61; 66,83], а во второй – 76,25 [72,83; 82,77] ($U=2431,5$, $p=7,1E-42$).

Распределение пациентов по показателю шаперонной активности БТШ70 послужило основанием для определения ориентировочного порогового значения на границе 68%, так как именно при этом значении и ниже резко возрастает частота встречаемости пациентов с признаками коронарного атеросклероза и снижается частота встречаемости больных с ишемической болезнью сердца без поражения коронарных артерий (рис. 1, 2). При анализе таблиц со-

Таблица 1. Коэффициенты регрессии и их значимость (результаты линейного регрессионного анализа)
Table 1. Regression coefficients and their significance (results of linear regression analysis)

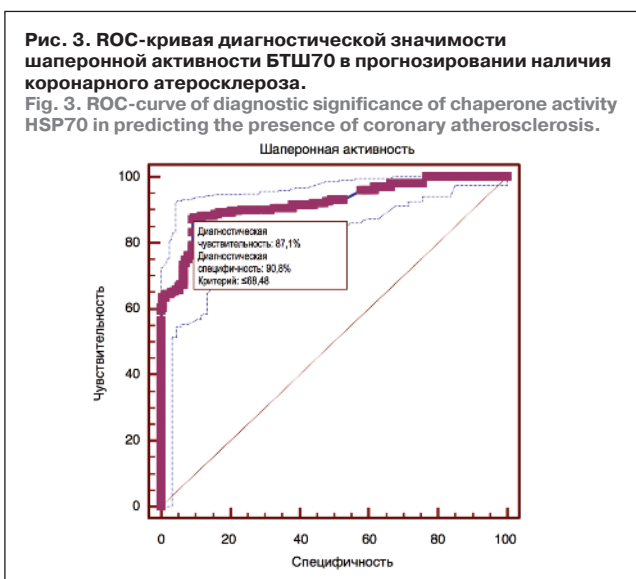
Независимые переменные	B	β	p
Шаперонная активность	-0,508	-0,491	0,00003
Гомоцистеин	1,878	0,232	0,05
ЛПНП	1,667	0,130	0,05
Окружность талии	0,150	0,165	0,025
КДФГо	0,849	0,169	0,029

Примечание. B – коэффициент регрессии, β – стандартизированный коэффициент регрессии (β-веса), p – уровень значимости.

Таблица 2. Диагностическая ценность модели прогнозирования наличия коронарного атеросклероза по уровню шаперонной активности БТШ70
Table 2. Diagnostic value of the model for predicting the presence of coronary atherosclerosis by the level of chaperone activity HSP70

Параметр	Значение	95% ДИ
Диагностическая чувствительность, %	87,13	87,1–91,4
Диагностическая специфичность, %	90,79	85,0–94,9
Отношение правдоподобия отрицательного результата, %**	0,14	0,08–0,3
Отношение правдоподобия положительного результата, %*	9,46	8,8–10,2
Положительная прогностическая ценность, %*	92,6	87,9–95,9
Отрицательная прогностическая ценность, %**	84,1	77,6–89,4

*Положительный результат – наличие коронарного атеросклероза. **Отрицательный результат – отсутствие коронарного атеросклероза.



пряженности выявлена высокая статистическая взаимосвязь между наличием коронарного атеросклероза и снижением шаперонной активности БТШ70 68% и ниже: $\chi^2_{(1)}=211,272, \phi=0,773 (p=0,000)$.

Оценка относительного риска (OR) коронарного атеросклероза в таблицах сопряженности показала отношение шансов для уровня шаперонной активности БТШ70≤68%=64,664 (доверительный интервал – ДИ 32,830–127,366), относительный риск OR1 для когорты «шаперонная активность БТШ70>69%» составил 7,283 (ДИ 5,027–10,551), OR2 для когорты «шаперонная активность БТШ70≤68%» составил 0,113 (ДИ 0,069–0,183). Таким образом, шанс найти больных с шаперонной активностью БТШ70≤68% среди лиц с признаками коронарного атеросклероза высокий и составляет 7,283, а среди пациентов без поражения коронарных артерий крайне мал и составляет 0,113.

С целью подтверждения значимости шаперонной активности БТШ70 в патогенезе коронарного атеросклероза выполнен корреляционный анализ Спирмена с расчетом коэффициентов ранговой корреляции. Выявлена высокая отрицательная корреляционная взаимосвязь между уровнем шаперонной активности БТШ70 и индексом Gensini ($r=-0,840, p<0,0001$).

Выявленные закономерности подтверждают роль шаперонной активности БТШ70 в формировании атеросклероза коронарных артерий.

С целью определения значимости шаперонной активности БТШ70 и ее места среди традиционных и биохимических патогенетических факторов развития и прогрессирования атеросклероза артерий сердца был проведен многофакторный линейный регрессионный анализ. В качестве зависимой переменной выступило значение GS, рассчитанное для каждого больного, а в качестве независимых переменных в регрессионную модель ступенчатым методом включались следующие параметры: мужской пол, возраст (лет), индекс массы тела (кг/м²), окружность талии (см), уровень систолического и диастолического артериального давления (мм рт. ст.), курение, наличие перенесенного в анамнезе инфаркта миокарда, общий холестерин (ммоль/л), триглицериды (ммоль/л), ЛПНП (ммоль/л), липопротеины высокой плотности – ЛПВП (ммоль/л), уровень гомоцистеина сыворотки крови (мкмоль/л), С-реактивный белок (мг/л), шаперонная активность (%), маркеры окислительного стресса: АДФГн (усл. Ед/мг),

КДФГн (усл. Ед/мг), АДФГО (усл. Ед/мг), КДФГО (усл. Ед/мг), супероксиддисмутаза (%).

Первой переменной в уравнение регрессии была включена шаперонная активность, что говорит о ее высокой прогностической значимости среди представленных показателей. Пошаговая итерация закончилась на 5-й итерации. В модель-5 оказались включены шаперонная активность БТШ70, гомоцистеин, ЛПНП, окружность талии, КДФГО. Достоверность корреляционных связей подтвердили выявленные в данной модели GLM ($p < 0,05$) ассоциации указанных биомаркеров и окружности талии с фактом наличия коронарного атеросклероза (табл. 1). Скорректированный R^2 для этой модели составил 78,5%, $F=39,025$, $p < 0,0001$.

Как видно из табл. 1, модуль стандартизированного коэффициента регрессии для шаперонной активности БТШ70 в рамках данной модели самый высокий, что подтверждает высокий уровень взаимосвязи шаперонной активности БТШ70 и коронарного атеросклероза. Отрицательное значение коэффициентов регрессии шаперонной активности БТШ70 говорит о том, что чем выше выраженность коронарного атеросклероза, тем ниже уровень шаперонной активности БТШ70.

Такой высокий уровень взаимосвязи шаперонной активности БТШ70 и коронарного атеросклероза в рамках данных регрессионных моделей позволил сделать предположение о возможности создания упрощенной модели диагностики исключительно на основе определения шаперонной активности БТШ70. Был применен метод ROC-анализа для определения диагностической ценности шаперонной активности БТШ70, где в качестве одного независимого предиктора коронарного атеросклероза выступил уровень шаперонной активности БТШ70.

Площадь под ROC-кривой (AUC) составила $0,929 \pm 0,014$, 95% ДИ $0,888-0,947$ при $z=29,63$, $p < 0,0001$ (рис. 3). Согласно экспертной шкале оценки площади под кривой прогностическая способность данной модели была оценена как отличная. По характеристической кривой было определено оптимальное пороговое значение, соответствующее требованию о максимальной суммарной чувствительности и специфичности модели. Оно составило 68,46%. Таким образом, при уровне шаперонной активности БТШ70 равном или меньше 68,46% модель предсказывает наличие поражения коронарных артерий с диагностической чувствительностью 87,13% и специфичностью 90,76%.

Представленная модель прогнозирования диагностики коронарного атеросклероза по уровню шаперонной активности БТШ70 при выбранном пороге отсечения 68,46% и менее демонстрирует хорошие характеристики: высокие чувствительность и специфичность, низкое отношение правдоподобия отрицательного результата и высокое положительного результата, высокую положительную прогностическую ценность и несколько меньшую отрицательную, что допустимо с учетом тяжести прогнозируемого положительного состояния наличия коронарного атеросклероза (табл. 2).

Обсуждение

Выявление пациентов с ранним развитием коронарного атеросклероза остается глобальной проблемой. В связи с этим актуальным представляется более детальное изучение развития данного состояния.

Шаперонная активность – это способность БТШ сы-воротки крови связываться с поврежденными или восстановленными белковыми молекулами, а также транспортировать их через внутриклеточные мембраны и экспонировать их белкомодифицирующими системами [12]. В нашем исследовании установлены снижение уровня шаперонной активности при наличии коронарного атеросклероза, а также значимая взаимосвязь с индексом Gensini. В ряде работ показано наличие взаимосвязи между БТШ70, которые и обладают шаперонной активностью, и сердечно-сосудистыми заболеваниями [12]. В экспериментальных работах установлено, что гиперэкспрессия шаперонов защищает сердце от ишемического и реперфузионного повреждения, а снижение экспрессии увеличивает гибель кардиомиоцитов [13]. Рандомизированное исследование (E. Dulín и соавт., 2010) продемонстрировало, что внеклеточные БТШ были значительно ниже в популяции с атеросклерозом и что оба белка могут служить в качестве биомаркеров для прогрессирования атеросклеротического заболевания [14].

Выводы

В ходе исследования выявлены достоверные различия между группами с коронарным атеросклерозом и без него по уровню шаперонной активности БТШ70. Определена достоверная взаимосвязь между уровнем шаперонной активности БТШ70 и выраженностью коронарного атеросклероза. Выявленный порог шаперонной активности БТШ70 может рассматриваться в качестве возможного маркера выраженности коронарного атеросклероза.

Финансовая поддержка. Научная работа выполнена на средства гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук (грант №МК-552.2018.7).

Sources of funding. This work was partially supported by the Council on Grants of the President of the Russian Federation for the state support of young scientists (Grant MK-552.2018.7).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests. The authors declare that there is no conflict of interests.

Литература/References

1. Рагино Ю.И., Чернявский А.М., Еременко Н.В. и др. Ключевые лабораторно-диагностические биомаркеры коронарного атеросклероза. *Кардиология*. 2011; 3: 42–6. [Ragino Ju.I., Cherniavskii A.M., Eremanko N.V. et al. Klyuchevye laboratorno-diagnosticheskie biomarkery koronarnogo ateroskleroza. *Kardiologiya*. 2011; 3: 42–6 (in Russian).]
2. Рудакова Д.М., Веселовская Н.Г., Чумакова Г.А. Коронарный атеросклероз у мужчин с метаболическим синдромом: факторы риска, роль миокардиальных цитопротекторов. *Доктор.ру*. 2017; 10 (139): 15–20. [Rudakova D.M., Veselovskaia N.G., Chumakova G.A. Koronarnyy ateroskleroza u muzhchin s metabolicheskim sindromom: faktory riska, rol' miokardial'nykh tsitoprotektorov. *Doktor.ru*. 2017; 10 (139): 15–20 (in Russian).]
3. Negre-Salvavre A, Auge N, Camare C et al. Dual signaling evoked by oxidized LDLs in vascular cells. *Free Radic Biol Med* 2017; 106: 118–33.
4. Wick G, Knoflach M, Xu Q. Autoimmune and inflammatory mechanisms in atherosclerosis. *Annu Rev Immunol* 2017; 22: 361–403.

5. Пастухов Ю.Ф., Екимова И.В. Молекулярные, клеточные и системные механизмы протективной функции белка теплового шока 70 кДа. *Нейронауки*. 2005; 2 (2): 3–25. [Pastukhov Yu.F., Ekimova I.V. Molekuliarnye, kletochnye i sistemnye mekhanizmy protektivnoi funktsii belka teplovogo shoka 70 kDa. *Neironauki*. 2005; 2 (2): 3–25 (in Russian).]
6. Martin-Ventura JL, Leclercq A, Blanco-Colio LM et al. Low plasma levels of HSP70 in patients with carotid atherosclerosis are associated with increased levels of proteolytic markers of neutrophil activation. *Atherosclerosis* 2007; 194: 334–41.
7. Xie F, Zhan R, Yan LC et al. Diet-induced elevation of circulating HSP70 may trigger cell adhesion and promote the development of atherosclerosis in rats. *Cell Stress Chaperones* 2016; 21: 907–14.
8. Bielecka-Dabrowa A. HSP 70 and atherosclerosis-protector or activator? *Expert Opin Ther Targets* 2009; 13: 307–17.
9. Gensini Goffredo G. A more meaningful scoring system for determining the severity of coronary artery disease. *Am J Cardiol* 1983; 51: 606. DOI: 10.1016/S0002-9149(83)80105-2
10. Борзова ВА. Механизмы защитного действия шаперонов при агрегации белков. Дис. ... канд. биол. наук. М., 2016. [Borzova VA. *Mekhanizmy zashchitnogo deistviia shaperonov pri agregatsii belkov*. Dis. ... kand. biol. nauk. Moscow, 2016 (in Russian).]
11. Котова ЮА, Зуйкова АА, Пашков АН. и др. Шаперонная активность в диагностике коронарного атеросклероза. Системный анализ и управление в биомедицинских системах. 2018; 17 (3): 563–6. [Kotova YuA., Zuikova AA, Pashkov AN. et al. *Shaperonnaia aktivnost' v diagnostike koronarnogo ateroskleroza. Sistemnyi analiz i upravlenie v biomeditsinskikh sistemakh*. 2018; 17 (3): 563–6 (in Russian).]
12. Morimoto RI, Kline MP, Bimston DN, Cotto JJ. The heat-shock response: regulation and function of heat-shock proteins and molecular chaperones. *Essays biochem* 1997; 32: 17–29.
13. Willis MW, Patterson C. Hold me tight: the role of HSP family of chaperones in cardiac disease. *Circulation* 2010; 122 (17): 1740–51.
14. Dulin E, Garcia-Barreno P, Guisasola MC. Extracellular heat shock protein 70 (HSPA1A) and classical vascular risk factors in a general population. *Cell Stress Chaperones* 2010; 15 (6): 929–37.

Информация об авторе / Information about the author

Котова Юлия Александровна – канд. мед. наук, доц. каф. поликлинической терапии ФГБОУ ВО «ВГМУ им. Н.Н. Бурденко». E-mail: kotova_u@inbox.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0236-2411>

Зуйкова Анна Александровна – д-р мед. наук, проф., зав. каф. поликлинической терапии ФГБОУ ВО «ВГМУ им. Н.Н. Бурденко». E-mail: zuikova-terapia23@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2392-3134>

Пашков Александр Николаевич – д-р биол. наук, проф., зав. каф. биологии ФГБОУ ВО «ВГМУ им. Н.Н. Бурденко». E-mail: vgma-pashkov@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2454-0397>

Julia A. Kotova – Cand. Sci. (Med.), Burdenko Voronezh State Medical University. E-mail: kotova_u@inbox.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0236-2411>

Anna A. Zuikova – D. Sci. (Med.), Prof., Burdenko Voronezh State Medical University. E-mail: zuikova-terapia23@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2392-3134>

Alexander N. Pashkov – D. Sci. (Biol.), Prof., Burdenko Voronezh State Medical University. E-mail: vgma-pashkov@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2454-0397>

Статья поступила в редакцию / The article received: 24.05.2019

Статья принята к печати / The article approved for publication: 17.09.2019