

Laboratorinė medicina.
2012, t. 14, Nr. 3(55), p. 115–129.

25-hidroksi-vitamino D ir endotelio disfunkcijos biožymenų sąsajos

Andrius Bleizgys
Virginijus Šapoka

Santrauka

Įvadas. Endotelio disfunkcija (ED), laikoma ankstyvąja kraujagyslių ligų stadija, gali būti įvertinama naudojant laboratorinius biožymenis, pavyzdžiui, tirpiąsias adhezijos molekules. Augant susidomėjimui vitamino D svarba kardiologijoje, didėja poreikis ieškoti šio vitamino sąsajų su ED biožymenimis.

Pacientai ir tyrimo metodai. 2012 m. vasarį ir kovą tyrime dalyvavo atsitiktinai atrinkti sąlyginai sveiki 20–39 metų vyrai. Buvo renkami duomenys apie mitybos, rūkymo bei fizinio aktyvumo įpročius, atliekami antropometriniai (ūgio, svorio, liemens ir klubų apimties, arterinio kraujospūdžio) bei laboratoriniai kraujo tyrimai (bendrasis kraujo, lipidograma, didelio jautrumo CRP, gliukozės, testosterono, 25-hidroksi-vitamino D (25(OH)-D) bei tirpiųjų molekulių – ICAM-1 (tarplastelinės adhezijos molekulė), VCAM-1 (kraujagyslių ląstelių adhezijos molekulė), E-selektino ir P-selektino koncentracijos nustatymas).

Rezultatai. Iš viso ištirti 64 vyrai. Ypač maža 25(OH)-D koncentracija (mažiau nei 50 nmol/l) nustatyta 57,8 %, pakankama ji buvo tik 3,1 % vyrų. Atsižvelgiant į kofaktorius, VCAM-1 koncentracija reikšmingai priklausė tik nuo liemens ir klubų apimčių santykio ($r = -0,341$, $p = 0,006$), ICAM – nuo trigliceridų koncentracijos ($r = 0,261$, $p = 0,037$), E-selektino – nuo 25(OH)-D ir gliukozės koncentracijos (atitinkamai $r = 0,345$, $p = 0,004$ ir $r = -0,003$, $p = 0,04$), P-selektino – nuo CRP koncentracijos kategorijos (ar yra didesnis už 1 mg/l) ($r = 0,311$, $p = 0,012$). VCAM-1 ir E-selektinui liko reikšmingi tie patys prediktoriai tarp normalios kūno masės vyrų, bet ne tarp nutukusių ar turinčių antsvorio. Tarp 25(OH)-D koncentracijos tercilių reikšmingesnių adhezijos molekulių koncentracijų skirtumų negauta.

Išvados. Šaltuoju metų laiku beveik visiems 20–39 metų vyrams trūko vitamino D. Nustatytos sąsajos tarp tirpiojo E-selektino ir 25(OH)-D koncentracijos kraujo serume, stipresnės nutukusiems vyrams. Reikšmingų tirpiųjų ICAM-1, VCAM-1 ir P-selektino sąsajų su 25(OH)-D nerasta.

Reikšminiai žodžiai: kalcidiolis, kalcitriolis, endotelio disfunkcija, biožymenys, ICAM-1, VCAM-1, E-selektinas, P-selektinas.

Vilniaus universiteto Medicinos
fakulteto Vidaus ligų, šeimos medicinos
ir onkologijos klinika

Vilnius University Faculty of Medicine,
Clinic of Internal Diseases, Family
Medicine and Oncology

El. paštas: andrius.bleizgys@gmail.com

ĮVADAS

Sergamumas ir mirtingumas nuo širdies ir kraujagyslių (ŠK) ligų tebėra viena aktualiausių šiuolaikinės visuomenės problemų. Lietuvoje sergamumas išemine širdies liga, 2010 metų

duomenimis, buvo 58,7 atvejo tūkstančiui gyventojų, hipertenzinėmis ligomis – 177,5 atvejo tūkstančiui gyventojų; o 2004 m. – atitinkamai 55,8 ir 128,4 atvejo [1]. Nors žinoma daug ŠK ligų rizikos veiksnių, akivaizdu, kad kovos su tradiciniais veiksniais

priemonės yra nepakankamai veiksmingos. Mažinant sergamumą ir mirtingumą nuo ŠK ligų, kyla poreikis ieškoti naujų veiksmių, svarbių šių ligų diagnostikai ir gydymui, o kartu ir naujų profilaktikos bei gydymo būdų. Pastarąjį dešimtmetį itin daug dėmesio skiriama vitamino D sąsajų su įvairiais sveikatos sutrikimais tyrinėjimams. Ankstesnėje publikacijoje [2] išsamiai aptarėme mechanizmus, kuriais šio vitamino stoka organizme gali sukelti nepageidaujamų pokyčių, lemiančių ŠK bei kitų lėtinių ligų atsiradimą. Šiame straipsnyje pateikiame pirmuosius tyrimo, kuriuo vertintos vitamino D sąsajos su adhezijos molekulėmis – ankstyvojo endotelio pažeidimo žymenimis, rezultatus.

Endotelio disfunkcijos sąvoka ir reikšmė

Kaip žinoma, vykstant daugeliui patologinių procesų, prieš atsirandant struktūriniais pakitimams, vystosi funkciniai pokyčiai, kurie dažnai yra grįžtami, juos galima suvaldyti taikant aktyvias terapines priemones ir būtent toje stadijoje pasiekti geriausių rezultatų. Kardiologijos srityje šiuo metu vienas aktyviausiai tyrinjamų aspektų yra endotelio disfunkcija (ED). Plačiąja prasme, ED – tai endotelio funkcionavimo sutrikimas, kai sutrinka pusiausvyra tarp mediatorių, reguliuojančių kraujagyslės tonusą bei kraujo krešėjimą; ji pasireiškia nenormalia kraujagyslių homeostaze, sutrikusiu endotelio-barjero pralaidumu, polinkiu į uždegimą, proliferaciją, vazokonstrikciją, aterosklerozinę būklę bei trombozę [3, 4]. Tačiau dažniau terminu ED vadinamas nuo endotelio priklausomas vazodilatacijos sutrikimas, atsirandantis dėl susilpnėjusio azoto oksido (NO) gamybos endotelėje arba sumažėjusio NO biologinio prieinamumo [3, 5]. Svarbu prisiminti, kad organizme galimi laikini endotelio fenotipo pokyčiai, kai endotelio funkcija sugeba atsikurti [3], todėl tokie pokyčiai ligos nesukelia. Tačiau ilgą laiką (ar reguliariai) veikiant dirgikliams (stresoriams) endotelio gynybiniai pajėgumai išsenka, jo funkcija tampa sutrikusi nuolat ir tuomet vystosi tikroji ED, kuri yra esminis žingsnis vystytis tam tikrai patologijai, pavyzdžiui, aterosklerozei [3]. Žinoma, kad ED kartu su mažu intensyvumu uždegimu ilgai sukelti poendotelinio tarplastelinio užpildo (matriks) sudėties pokyčius, kurie kartu su kitais sienelės struktūros pakitimais lemia padidėjusią arterijų standumą [6]. Taigi endotelio disfunkciją galima laikyti anksty-

vuju aterosklerozės rizikos veiksmiu [5]. ED yra svarbi grandis vystantis tokioms ligoms kaip arterinė hipertenzija, vaskulitai, erekcijos sutrikimai, diabeto komplikacijos [7]. ED yra atėties širdies ir kraujagyslių įvykių rizikos veiksnys, nes šiomis ligomis sergančių ligonių, kuriems nustatoma ED, prognozė yra blogesnė [4, 8]. Vadinasi, pradėjus taikyti aktyvias priemones jau šioje stadijoje, kuri kartais vadinama nebyliaja ateroskleroze, tikimybė sustabdyti patologinio proceso progresavimą ir apsaugoti pacientą nuo ūmių išeminių sindromų yra didesnė [9].

Endotelio disfunkcijos nustatymo metodai

ED iš esmės yra pirmoji patologinio proceso fazė, kurią galima nustatyti taikant šiuolaikinius diagnostikos metodus, t. y. įvertinti vadinamuosius ED biožymenis. Terminu „biožymuo“ (angl. *biomarker*) nusakomas rodiklis (charakteristika), kuris gali būti objektyviai išmatuojamas ir įvertinamas kaip normalaus biologinio proceso, patologinio proceso ar atsako į gydymą priemonės rodiklis, bet nebūtinai priežastiniais ryšiais yra susijęs su klinicine baigtimi [10]. Biožymenis gali būti naudojami įvairiais tikslais: atrankinei patikrai, diagnostikai, prognozavimui (pvz., ligos atkryčio), atsakui į gydymą stebėti [11]. Tačiau prieš įdiegiant naują biožymenį į klinikinę praktiką, klinikiuose tyrimuose turi būti įrodyta jo nauda, o ypač tai, ar tas naujasis biožymuo gali suteikti papildomos informacijos (pvz., prognostinės) šalia tradicinių ligos rizikos veiksmių įvertinimo ir kokios [10, 12].

Yra įvairių ED tyrimo metodų – tiek instrumentinių, tiek laboratorinių. Instrumentiniai metodai skirstomi į neinvazinius ir invazinius. Invazinio metodo pavyzdys – intrakoronariniai mėginiai, kai širdies vainikinių arterijų angiografijos metu lašinant vazoaktyvias medžiagas (acetilcholiną, adenozino difosfatą ir kt.), stebimi šių arterijų skermens pokyčiai. Žinoma, kad sveikose arterijose vyrauja nuo endotelio priklausoma vazodilatacija, o esant endotelio pažeidimui, ima vyrauti vazokonstrikcija. Iš neinvazinių metodų, taikomų Lietuvoje, vertėtų paminėti nuo tėkmės priklausomas vazodilatacijos tyrimą, kuris dažniausiai atliekamas ultragarsu tiriant žasto arterijos skersmens pokyčius, atleisus dilbio veržiklį; įvairius arterijų standumo tyrimus, pavyzdžiui, pulso bangos analizę bei pulso bangos grei-

čio matavimą. Nors yra įrodyta daugelio instrumentinių tyrimų nauda klinikinėje praktikoje, atkreiptinas dėmesys, kad dauguma šių metodų turi vieną ar kelis trūkumus: jie yra brangūs ar reikalinga sudėtinga aparatūra; labai nepatogūs ar net kelia didelę riziką pacientui (ypač invaziniai metodai); dėl kai kurių nėra sutarimo, kokius šių tyrimų rezultatus laikyti normaliais ar patologiniais; tyrėjas, taikantis šiuos metodus, turi būti labai patyręs; gali būti sudėtinga tyrimą pakartoti (angl. *reproduce*); arba tyrimo rezultatai yra labai priklausomi nuo šalutinių veiksmių, kaip antai tiriamąjo galūnės odos ar patalpos temperatūros, ypač taikant mikrocirkuliacijos tyrimo metodus [7].

Alternatyva yra tirti ED laboratorinius biožymenis. Tai įvairios molekulės, sintetamos arba ekspresuojamos endotelio ląstelėse, dažnai vadinamos tiesiog biožymenimis (nepriedant žodžio „laboratoriniai“). Šiuos biožymenis galima nustatyti kraujo plazmoje ir (ar) endotelio ląstelėse. Tai vazoaktyviosios medžiagos – NO, endotelinas-1, ADMA (asimetrinis dimeetilargininas) ir kt., bei endotelio kilmės žymenys – fon Vilebrando faktorius, PAI-1 (plazminogeno aktyvavimo inhibitorius-1), tirpus trombomodulinas, adhezijos molekulės (AM) ir kt. Kai kurie autoriai ED biožymenims priskiria ir kitus biologinius darinius: CEC (angl. *Circulating Endothelial Cells* – endotelio ląstelės kraujotakoje), EPC (angl. *Endothelial Progenitor Cells* – ląstelės-endotelio pirmtakai), endotelio mikrodaleles (angl. *Endothelial Microparticles*), endotelio glikokaliksą [3, 13]. Didelių populiacijų tyrimuose tirti ED biožymenis kraujyje yra tinkamiau negu atlikti instrumentinius tyrimus [7]. Be abejo, visi laboratoriniai žymenys turi ne tik pranašumą, bet ir trūkumą. Viena iš kliūčių plačiau taikyti biožymenis yra ta, kad dauguma naujų biožymenų dar nėra standartizuoti, priešingai negu C reaktyvusis baltymas ar kiti dažnai klinikinėje praktikoje nustatomi rodikliai, o „normatyvai“ gali smarkiai skirtis priklausomai nuo reagentų gamintojo ir metodikos [14]. Tačiau pagrįžama, kad net tokiu atveju biožymenis gali būti puikus ligos mechanizmo gvildenančių mokslinių tyrimų objektas [10].

Mūsų tyrime kaip ED rodikliai buvo pasirinktos keturios adhezijos molekulės: VCAM-1, ICAM-1, E-selektinas ir P-selektinas. Šios AM, apžvalgų duomenimis [3, 6, 7, 15], yra tarp dažniausiai minimų AM, bene labiausiai atspindinčių endotelio aktyvumą, disfunkciją ir (ar) pažeidimą; kartu

nurodoma, kad nemažai tyrimų patvirtino esant šių AM sąsajų su kitais ŠK ligų rizikos veiksniais. Be to, jau ne vienas tyrimas įrodė šių AM tyrimų naudą vertinant ŠK ligų riziką, ypač jauniems besimptomiams pacientams, kai kartu tiriama keletas biožymenų.

Adhezijos (sulipimo) molekulės – tai įvairūs membranos baltymai, tarpininkaujantys vykstant ląstelių prikibimui viena prie kitos (tarpusavy) arba prie tarpląstelinio užpildo (matrikso) [16]. Adhezija (lot. *adhaesio* – sukibimas, prilipimas) yra gyvybiškai svarbi organizmo ląstelių savybė. Dėl jos galima ląstelių migracija, diferenciacija bei augimas, audinių funkcionavimas bei vientisumo (integralumo) palaikymas [16]. Šiuo metu yra žinoma per 100 molekulių, galinčių atlikti AM funkcijas. Pagrindinės AM klasės yra šios: integrinai, selektinai, imunoglobulinų (Ig) didšeimės AM ir kadherinai [3, 16]. Pirmųjų trijų grupių AM yra reikšmingos leukocitų judėjimui. Kadherinai svarbūs audinių vientisumui palaikyti.

ICAM-1, VCAM-1

Tai AM, priklausančios Ig didšeimei. Šiai gausiai grupei priskiriami visi baltymai, kurių molekulėse yra pasikartojančių struktūrų, panašių į imunoglobulinuose randamus domenų (sritis). Šie domenai sudaryti iš tankiai „supakuotų“ peptidų vijų „vamzdžių“, kuriuos stabilizuoja disulfidinės jungtys [16, 17]. Ig didšeimei priklauso ir kai kurie kiti svarbūs baltymai, kaip antai MHC (angl. *Major Histocompatibility Complex* – didysis audinių suderinamumo kompleksas) antigenai, T-ląstelių receptoriai, PDGF (angl. *Platelet Derived Growing Factor* – trombocitų kilmės augimo faktoriaus) receptoriai, CSF-1 (angl. *Colony Stimulating Factor* – kolonijas stimuliuojančio faktoriaus) receptoriai.

ICAM-1 (*Intercellular Cell Adhesion Molecule-1*) – tarpląstelinio sulipimo molekulė-1), kitaip vadinama CD54 antigenu, yra transmembraniškas glikoproteinas. Jo molekulinė masė nuo 80 iki 114 kDa, priklausomai nuo prijungtų gliukozės molekulių skaičiaus [17]. Šios AM struktūroje skiriamos trys dalys: užląstelinė, transmembraniškas ir trumpa citoplazminė „uodega“. Svarbiausi ICAM-1 ligandai yra 2 integrinai LFA-1 (angl. *Lymphocyte Function-Associated Antigen-1* – su limfocitų funkcija susijęs antigenas; sinonimas CD11a/CD18 antigenas) ir Mac-1 (angl. *Macrophage-1 antigen* – makrofagu-1 antigenas; sinonimas CD11b/CD18 antigenas), kurie ekspresuojami leukocitų

paviršiuje [16, 17]. ICAM-1 gali sąveikauti ir su kitomis struktūromis: fibrinogenu, hialurono rūgštimi, *Plasmodium falciparum* infekuotiems eritrocitais, CD43 antigenu (sialoforinu), rinovirusais [16, 17]. ICAM-1 nėra specifiška endoteliumi, ji randama daugelio tipų ląstelių – epitelinių, limfocitų, monocitų, širdies raumens ląstelių, lygiųjų raumenų ląstelių, eozinofilų, keratinocitų, dendritinių ląstelių, kamieninių kraujodaros ląstelių, fibroblastų, hepatocitų – paviršiuje [3, 16]. Šios AM raiška didėja dėl citokinių, pavyzdžiui, TNF- (angl. *Tumor Necrosis Factor* – naviko nekrozės faktorius alfa), IFN- (interferonas gama), IL-1 (interleukinas-1), ir bakterijų endotoksinų poveikio [16]. Nurodoma, kad ICAM-1, be vaidmens leukocitų migracijos procese, yra svarbi sąveikaujant antigeną pateikiančioms ląstelėms ir T-limfocitams, t. y. susidarant vadinamajai imunologinei sinapsei [17]. Iki šiol nuodugniausiai ištirtas ICAM-1 vaidmuo būtent imuninei, o ne ŠK sistemai [16].

VCAM-1 (angl. *Vascular Cell Adhesion Molecule-1*) – kraujagyslių ląstelių sulipimo molekulė-1; sinonimas CD106) yra 90 kDa molekulinės masės glikoproteinas, struktūra panašus į ICAM-1. Ramiybės būsenos endotelio ląstelių paviršiuje VCAM-1 ekspresuojamos menkai, tačiau jų labai padaugėja veikiant citokinams, pavyzdžiui, IL-1, IL-4, TNF- ar IFN- [3, 16]. VCAM-1 randama ir kitose ląstelėse: kaulų čiulpu fibroblastuose, audinių makrofaguose, dendritinėse ląstelėse, kraujagyslių sienelės lygiųjų raumenų ląstelėse. Ši AM jungiasi su leukocitų paviršiaus 4 1 integrinu (kitaip vadinamu VLA-4, angl. *Very Late Antigen-4*) ir 4 7 integrinu [16].

E-selektinas, P-selektinas

Šiuo metu žinomi trys selektinai. L-selektiną ekspresuoja leukocitai, E-selektiną – endotelis, P-selektiną – trombocitai (angl. *Platelets*) ir endotelis. Tai transmembraniškas glikoproteinas, panašus į lektinus – gamtoje paplitusius angliavandenius prijungiančius baltymus. Visų selektinų struktūra yra panaši: kaip ir ICAM-1 bei VCAM-1, jie sudaryti iš užląstelinės, transmembraniškos ir citoplazminės dalies. Bet, kitaip negu daugumos kitų AM, selektinų funkcija yra labai specifinė: jie dalyvauja tik leukocitų, endotelio ląstelių ir trombocitų sąveikoje. Dalyvaujant kalciumi, selektino užląstelinės dalies lektino sritis jungiasi su gretimų ląstelių molekulėmis, turinčiomis angliavandenių (oligosacharidų liekanų), pavyzdžiui, *sialyl-*

Lewis^x (sLe^x) antigenu [16]. Ši jungtis yra mažo giminingumo, „pereinamojo“ tipo, leukocito ir endotelio sąveika. Vis susidarant ir nutrūkstam šioms jungtims, leukocitas ne prikimba tvirtai, o tarsi „rieda“ endotelio paviršiumi.

E-selektinas, kitaip dar vadinamas CD62E antigenu arba ELAM-1 (angl. *Endothelial-leukocyte adhesion molecule-1*), įdomus tuo, kad neaktyviame endotelio, išskyrus odos mikrokraujagyslių endotelį, nėra ekspresuojamas [18]. Taigi ši AM yra specifiskiausias ED biožymuo iš visų keturių mūsų tirtųjų AM. Iš anksto pagamintų E-selektino atsargų endotelio nėra. Jis pradedamas gaminti tik veikiant endotelio dirgikliams, pavyzdžiui, citokinams, ir per kelias valandas nuo uždegimo proceso pradžios ląstelių paviršiuje labai pagausėja E-selektino molekulių [3]. Nurodoma, kad yra keletas E-selektino ligandų, pavyzdžiui, ESL-1 (angl. *E-Selectin ligand-1*) neutrofilų, monocitų bei kai kurių limfocitų paviršiuje ir PSGL-1 (angl. *P-Selectin Glycoprotein ligand-1*) neutrofilų, monocitų, eozinofilų bei daugelio limfocitų paviršiuje [16, 18].

P-selektinas, dar vadinamas CD62P, GMP-140 (angl. *Granule Membrane Protein 140* – granuliu ir membranos baltymas), PADGEM (angl. *Platelet Activation-Dependent Granule to External Membrane Protein* – nuo trombocitų aktyvavimo priklausomas granuliu ir išorinės membranos baltymas), yra 140 kDa baltymas. Kitaip nei E-selektinas, P-selektinas yra sintetinas iš anksto ir kaupiamas specifinėse granulėse: -granulėse – trombocituose bei *Weibel-Palade* kūneliuose – endotelio ląstelėse. Iš čia jis gali būti greitai „mobilizuotas“ į ląstelės paviršius, veikiant įvairiems dirgikliams, kaip antai trombinui, histaminui, komplemento faktoriams, laisviesiems radikalams, citokinams [16]. Taigi P-selektinas gali būti laikomas ne tik endotelio, bet ir trombocitų aktyvacijos žymeniu, ypač jeigu įvertinamas jo raiškos intensyvumas trombocitų paviršiuje. Manoma, kad endotelio P-selektino ligandas yra PSGL-1 leukocituose ir jis tik po specialaus glikozilinimo proceso gali sąveikauti kaip ligandas [16].

Tirpiosios adhezijos molekulės

Adhezijos molekulės galima tirti endotelio ląstelėse, paimtose iš kraujo ar kraujagyslių, tačiau patogiau tirti jų tirpiąsias (angl. *soluble*) formas, ypač jeigu moksliniame tyrime dalyvauja

daug individų. Tam galime taikyti įvairias metodikas, pavyzdžiui, ELISA metodu nustatyti tirpiųjų AM koncentraciją kraujo plazmoje arba serume. Tirpioji adhezijos molekulė – tai atitinkamos adhezijos molekulės užląstelinė dalis, kuri veikiant tam tikriems fermentams proteazėms „nukerpama“ maždaug ties įėjimo į plazminę membraną vieta. Mokslinėje literatūroje jų pavadinimai dažniausiai sudaromi pridodant „s“ raidę prie atitinkamo AM pavadinimo. Pavyzdžiui, sVCAM-1 suprantama kaip VCAM-1 tirpioji forma. Tirpiųjų AM randama ir kituose skysčiuose, pavyzdžiui, smegenų skystyje ar bronchų alveolinėse nuoplovose [16]. Manoma, kad tirpioji AM gali atsiskirti nuo aktyvintos, bet nepažeistos ląstelės paviršiaus arba būti išlaisvinama apoptozės metu. Laikoma, kad tirpiųjų adhezijos molekulių kiekis yra proporcingas „visa-verčių“ adhezijos molekulių, ekspreseuotų ląstelių membranose, kiekiui [19]. Antai nustatyta, kad sVCAM-1 kiekis kraujo plazmoje atitinka maždaug 20 % „ląstelinės“ sVCAM-1 kiekio [20]. Vadinasi, pagausėjus AM endotelio ląstelėse, kraujo plazmoje padidėja tirpiųjų molekulių koncentracija, ir tai gali būti laikoma endotelio pažeidimo arba aktyvacijos žymeniu. Kitais žodžiais, kuo didesnis yra sisteminio endotelio pažeidimo/aktyvacijos ir disfunkcijos laipsnis, tuo didesnė AM raiška ląstelėse ir sykiu atitinkamų tirpiųjų AM koncentracija [6, 16].

Biologinė tirpiųjų AM prasmė nėra visiškai aiški. Iš pirmo žvilgsnio tirpioji AM yra tarsi „nevisavertė“, neveiklios molekulės. Tačiau kai kurie tyrimai rodo, kad tokios AM formos gali būti netgi labai aktyvios. Antai tiriant gyvūnus paaiškėjo, jog sergant reumatoidiniu artritu sVCAM-1 gali skatinti T limfocitų chemotaksį ir tuo būdu dalyvauti vykstant sinovitiui; sergant bronchų astma, sVCAM-1 gali skatinti eozinofilų migraciją į plaučių audinį [20]. Tyrimais *in vitro* nustatyta, kad sICAM-1 gali aktyvinti uždegimą, pavyzdžiui, skatindama TNF- α , IL-6, INF- γ bei kai kurių MIP (angl. *Macrophage Inflammatory Proteins* – makrofagų uždegiminiai baltymai) gamybą, stiprinti lygiųjų raumenų ląstelių migraciją bei angiogenezę; todėl manoma, kad sICAM-1 gali būti svarbi progresuojant aterosklerozei bei sergant kitomis lėtinėmis uždegimo sukeltomis ligomis [17]. *In vitro* nustatyta, kad sE-selektinas gali turėti uždegimą slopinantį poveikį, nes, sugebėdamas jungtis su tuo pačiu epitopu kaip ir endotelio paviršiuje fiksuotas E-selektinas, konkuruoja su pastaruoju dėl ligando, todėl leukocitų adhezija

prie endotelio menkėja [21]. Kiti tyrėjai nustatė, kad sVCAM-1 ląstelių kultūrose gali slopinti monocitų adheziją prie endotelio ląstelių [19]. Manoma, kad AM „nukirpimas“ proteolizės būdu egzistuoja kaip reguliacinis mechanizmas, nes sumažėja AM raiška endotelio ląstelėse ir slopinama leukocitų adhezija prie kraujagyslių sienelių [19].

Adhezijos molekulių vaidmuo migruojant leukocitams

Žinoma, kad leukocitų migracija į kraujagyslės sienelę ir audinius yra daugelio patologinių procesų, ypač uždegimo, grandis. Įprastomis sąlygomis kraujotakoje esantys leukocitai ir endotelis tiesiogiai nesąveikauja. AM, ekspresuojamas ant nepažeisto endotelio, vykdo kitas funkcijas: tarpininkauja sąveikaujant endotelioцитams su matriksu ir reguliuoja kraujagyslių laidumą. Patologijos atveju (pvz., esant uždegimui) AM raiška endotelio ląstelių paviršiuje keičiasi, jos pradeda dalyvauti sąveikoje tarp leukocitų ir aktyvuoto endotelio [16]. Veikiant citokinams, pavyzdžiui IL-1 ar TNF- α , endotelis aktyvinamas ir jo paviršiuje gausėja integrinų, selektinų ir Ig didšeimės molekulių. Jau ir normaliomis sąlygomis leukocitai kraujagyslėse linke judėti arčiau sienelės, priešingai negu, pavyzdžiui, eritrocitai. O sulėtėjus kraujo tėkmės greičiui (dėl vazodilatacijos, kuri dažna uždegimo metu), leukocitai turi daugiau galimybių prisitarti prie kraujagyslės sienelės, kur jie „pagaunami“ (angl. *recruiting*) endotelio paviršiaus E- ir P-selektinams sąveikaujant su sialoproteinais leukocitų paviršiuje bei leukocitų paviršiaus L-selektinui – su atitinkamais ligandais endotelio paviršiuje. Tokie leukocitai, genami kraujo srovės, juda jau lėčiau, tarsi „rieda“ endotelio, nes selektinų formuojamos jungtys yra palyginti silpnos. Sulėtėjusius leukocitus stipriau veikia citokinai bei chemokinai ir dėl to leukocitai aktyvinami, kinta jų paviršiuje esančių integrinų konformacija [17], tuomet tokie integrinai jau geba sudaryti tvirtas jungtis su Ig didšeimės molekulėmis, ypač ICAM-1 ir VCAM-1. Tvirtai „prilipus“ leukocitams, gali prasidėti jų migracija gilyn – kiaurai per endotelį.

Širdies ir kraujagyslių ligų rizikos veiksniai ir adhezijos molekulės

Viena iš ED patogenezės grandžių yra oksidacinis stresas, o jį skatina įvairūs

ŠK ligų rizikos veiksniai – hipertenzija, dislipidemija, cukrinis diabetas, rūkymas, hiperhomocisteinemia ir kt. [9, 22]. Mechanizmu, per kuriuos pasireiškia šis poveikis, yra keletas, tarp jų – tiesioginis endotelio pažeidimas, simpatinės nervų sistemos aktyvinimas, padidėjęs renino-angiotenzino-aldosterono sistemos (RAAS) aktyvumas ir kt. Tai skatina tiek endotelio, tiek lygiųjų raumenų ląstelių, tiek leukocitų aktyvinimą bei padidėjusią laisvųjų radikalų gamybą. Kaip žinome, reaktyvūs deguonies (daug jų pagamina NADPH oksidazė) ir azoto radikalai sukelia NO gamybos arba veikimo sutrikimus [9, 23]. Pavyzdžiui, pagausėjus laisvųjų radikalų, endotelio ląstelėse daugėja ADMA ir kt. medžiagų, kurios trikdo endogeninio NO sintezę, konkuruodamos su NO sintazės substratu L-argininu [5, 24]. Kita vertus, superoksido anijonas geba reaguoti su NO, taip susidaro peroksinitritas; peroksinitritas oksiduoja tetrahidrobiopteriną (NO sintezės kofaktorių), todėl pakitusios konfigūracijos (angl. *uncoupled*) eNOS (endotelio NO sintazė) gamina mažiau NO, bet daugiau superoksido [25]. NO biologinio prieinamumo sumažėjimas skatina AM raišką [23], nes NO slopina tokių sulipimą skatinančių baltymų kaip P-selektinas, ICAM-1 ir VCAM-1 raišką [5]. Įrodyta, kad adhezijos molekulių ICAM-1, VCAM-1, E-selektino ir P-selektino raišką skatina ir kiti uždegimo mediatoriai, pavyzdžiui, C reaktyvusis baltymas [26, 27]. Dėl endotelio ir lygiųjų raumenų ekspresuojamų AM migravusių leukocitų išskiriami citokinai bei chemokinai toliau skatina tiek uždegimo procesą, tiek endotelio pažeidimą. Be to, kartu silpnėja endotelio gynybiniai pajėgumai. Pavyzdžiui, NO, pasižymintčio oksidacinį stresą bei uždegimą slopinančiu poveikiu, kiekio sumažėjimas prisideda prie to, kad uždegimo procesas toliau stiprėja ir vis mažina NO gamybą [28]. Todėl daroma išvada, kad padidėjusi AM raiška sergant lėtinėmis ligomis yra perteklinės oksidantų ir citokinų gamybos požymis [16], o dėl sutrikusių reguliacinių mechanizmų susidaro „ydingas ratas“: vis tęsiasi leukocitų „gaudymas“ iš kraujotakos ir nesibaigiantis uždegimas.

Nenuostabu, kad daugelis autorių tokias AM kaip VCAM-1, ICAM-1, E-selektinas ir P-selektinas priskiria „uždegimo žymenims“. Iš tiesų, šios AM tiesiogiai dalyvauja uždegimo procese, ypač svarbioje jo grandyje – leukocitų migracijoje; be to, uždegimo metu randama didesnė tirpiųjų molekulių koncentracija [14]. Tačiau, kaip minėta, kai kurios AM, pavyzdžiui,

VCAM-1 ir ICAM-1, ekspresuojamos ir „ramybės“ metu, nesant uždegimo. Be to, endotelio pažeida gali būti laikina, taigi ne kiekvienas ED ar endotelio aktyvacijos epizodas, kai pagausėja AM raiška ir migruoja pavieniai leukocitai, pereina į tikrąjį uždegimo procesą. Kai kurių igimtų sindromų atvejais, sutrikus tam tikros AM ar jos ligando gamybai ir bent vienam leukocitų adhezijos etapui, leukocitų migracija išvis nevyksta, nors kitos AM gali būti gausiai ekspresuojamos endotelyje [16], taigi sutrinka visas uždegimo procesas. Įdomu tai, kad uždegimo metu galimas priešingas vyksmas – AM raiškos susilpnėjimas: uždegimo mediatoriai, pavyzdžiui, TNF- α , IL-1, ir chemokinau stimuliuoja iNOS (indukuojamoji NO sintazė) atpalaidavimą, o veikiant jos gaminamam NO, slopinama leukocitų adhezija prie endotelio, mažinamas uždegimo mediatorių kiekis bei AM raiška [29]. Todėl būtų tikslingiau minėtas keturias AM vadinti ne uždegimo, o endotelio aktyvavimo arba aktyvavimosi žymeniais, nes normali „ramybės“ būsenos endotelio ląstelė ekspresuoja mažai AM, o jų pagausėja tik ląstelei „suaktyvėjus“, bet nebūtinai dėl uždegimo. Savaiame suprantama, kad „aktyvacija“ įvyksta esant funkciniam ar mechaniniam ląstelės dirginimui / pažeidimui, kuriam užsitęsęs vystosi ir tikroji ED. Todėl visiškai priimtina adhezijos molekules vadinti ir ED žymenimis.

Adhezijos molekulių klinikinė reikšmė

Daugėja įrodymų, kad adhezijos molekulių dalyvauja jau ankstyvose aterosklerozės stadijose [30] ir kituose procesuose, kai vyksta endotelio disfunkcija ir aktyvacija. Yra duomenų apie AM svarbą progresuojant aterosklerozinei plokštei, sergant miokardo infarktu, esant pošeminiam-reperfuziniam pažeidimui, persodinto organo kraujagyslių pažeidimui (angl. *allograft vasculopathy*), miokarditui, hipertrofinei kardiomiopatijai [16]. Daugiau tyrimų yra atlikta būtent su tirpiosiomis AM formomis. Pavyzdžiui, esant aterosklerozinės plokštelės plyšimui ir ūmiems koronariniams sindromams, randama didesnė tokių AM, kaip sICAM-1 ir sVCAM-1, koncentracija [10]. Nustatyta, kad sICAM-1 ir sVCAM-1 pagausėja progresuojant diabetinei nefropatijai [12]. sVCAM-1 koncentracija būna padidėjusi sergant *lupus* nefritu [31]. Rasta reikšmingų sP-selektino sąsajų su lėtinėmis inkstų ligomis, ypač dia-

betine nefropatija su mikroalbuminurija [32].

Kai kurių autorių nuomone, tokių žymenų kaip adhezijos molekulių, PAI-1, matriksu metaloproteinazių ir jų inhibitorių kiekio tyrimai gali būti naudingi vertinant ne tik ED lygį, bet ir ŠK ligų riziką [33]. Lietuvių autorių metodinėse rekomendacijose nurodoma, kad tirpūs ICAM, VCAM, E- ir P-selektinai gali būti sveikų vyrų ir moterų ŠK ligų prediktoriai [34]. Išties rasta sąsajų tarp sP-selektino kiekio ir kardiovaskulinių komplikacijų sergant ŠK ligomis bei ateities ŠK ligų rizikos „sveikiems“ individams [35]. Nustatyta, kad sVCAM-1 koncentracija reikšmingai koreliavo su pagyvenusių asmenų mirtingumu per ketverius metus [20]. Atkreiptinas dėmesys, kad Lietuvoje buvo atlikta tyrimų, vertinusių adhezijos molekulių reikšmę patologiniams procesams. M. Balčiūnas nustatė [36], kad didesnė priešoperacinė tirpiosios VCAM-1 koncentracija gali būti nepriklausomas didesnės kardiovaskulinių komplikacijų po aortos vainikinių jungčių suformavimo operacijų rizikos žymuo. Taigi galbūt AM – „naujieji“ rizikos veiksniai – kada taps svarbūs kasdienėje praktikoje individų sveikatai vertinti ir rizikai stratifikuoti, gal net bus galima laisvai išgyti asmeninių testų, grindžiamų AM nustatymu [10]. Manoma, kad tolesni moksliniai AM tyrimai gali būti naudingi farmacijos pramonei, pavyzdžiui, kuriant vaistus, galinčius blokuoti ICAM-1 ir LFA-1 sąveiką [17].

Vitaminas D, endotelio disfunkcija ir adhezijos molekulių

Žmogaus organizmui pagrindinis vitamino D (Vit. D) šaltinis yra oda, kurioje jis gaminasi veikiant saulės UV spinduliams. Tiek odoje susintetintas, tiek su maistu gautas vitaminas D kepenyse virsta 25-hidroksi-vitaminu D (25(OH)-D), o šis vėliau inkstu ir kai kuriose kitose ląstelėse virsta aktyviaja vitamino D forma – 1,25-dihidroksi-vitaminu D (1,25(OH) $_2$ -D), kuris geba veikti Vit. D receptorius (VDR). Patikimiausiu vitamino D atsargų organizme rodikliu šiuo metu laikoma 25(OH)-D koncentracija kraujyje.

Yra keletas patologinių fiziologinių mechanizmų, kuriais Vit. D stoka gali sukelti ŠK sistemos sutrikimus. Žinome, kad įvairių ŠK rizikos veiksnių galutinis poveikio rezultatas yra išliekantis uždegimas, oksidacinis stresas bei nuolatinis endotelio dirginimas. O VDR aktyvinimas slopina

RAAS, slopina uždegimą ir moduliuoja imuninės sistemos aktyvumą, taigi veikia esminius mechanizmus, lemiančius ŠK vystymąsi [37]. Taip pat nustatyta, kad, nepakankamai gausiant Vit. D, didėja parathormono gamyba prieskydinėse liaukose, o ilgalaikis hiperparatiroidizmas yra nepageidaujamas dėl įvairialypio poveikio ŠK sistemai. Kai kurie tyrimai parodė palankų Vit. D poveikį lipidų bei angliavandenių apykaitai, be to, vitamino D stoka siejama su padidėjusia nutukimo rizika. Įvairius Vit. D poveikio ŠK sistemai mechanizmus išsamiai aptarėme ankstesnėje publikacijoje [2].

Manoma, kad yra įmanomas ir tiesioginis vitamino D poveikis endoteliui, pavyzdžiui, NO sintazės aktyvumo didinimas ir uždegimui palankių transkripcijos faktorių, kaip antai NF B (angl. *Nuclear Factor-KappaB*) signalų perdavimo blokavimas [38]. Gana naujas radinys yra tai, kad apiktas vitamino D poveikis H $_2$ S (vandenilio sulfido) apykaitai. H $_2$ S, kaip ir NO, yra galinga dujinė signalinė molekulė, gebanti mažinti ED išsivystymo riziką keliais mechanizmais: ji slopina oksidacinį stresą, NF B aktyvinimą, uždegimą skatinančių citokinų, pavyzdžiui, TNF- α , IL-1, IL-6 ir IL-8, gamybą bei leukocitų adheziją prie kraujagyslių endotelio [39]. Vit. D geba padidinti cistationo- α 1-iazės, vieno iš H $_2$ S sintetinančių fermentų, raišką, taigi ir H $_2$ S kiekį [40]. Todėl daroma prielaida, kad, trūkstant Vit. D, H $_2$ S „signalinė sistema“ sutrinka, todėl stiprėja kraujagyslių uždegimas, didėja ED ir sykiu ŠK ligų rizika.

Nenuostabu, kad dėl tokio įvairialypio vitamino D poveikio jo stygius jau vadinamas naujuoju savarankišku ŠK ligų rizikos veiksniu [8, 41]. Jeigu Vit. D yra pajėgus gerinti endotelio funkciją, tiek slopindamas bent kai kurių tradicinių rizikos veiksnių poveikį ŠK sistemai, tiek, matyt, ir tiesiogiai veikdamas endotelį, turėtų būti sąsajų tarp organizmo aprūpinimo vitaminu D rodiklių bei endotelio disfunkcijos biožymenų. Kitaip sakant, kuo daugiau yra 25(OH)-D kraujyje, tuo, viena vertus, silpniau kraujagysles veikia tokie sisteminiai veiksniai kaip RAAS, kita vertus, pačios endotelio ir kitos ląstelės dėl savojo fermento 1-hidroksilazės gali daugiau pasigaminti 1,25(OH) $_2$ -D (kai tam fermentui turi pakankamai substrato, t. y. 25(OH)-D), kuris, veikdamas autokrininiu ir parakrininiu būdu, geba slopinti endotelio aktyvinimą, uždegimą ir laisvųjų radikalų gamybą, o to padarinys – sumažėjusi AM raiška endotelyje ir mažesnis atitinkamų tirpiųjų

AM formų kiekis. Verta paminėti dar vieną įdomų radinį, kuris bent iš dalies gali pagrįsti sąsajas tarp 25(OH)-D ir endotelio funkcijos: nustatyta, kad, esant Vit. D stygiui, endotelio ląstelėse mažiau ekspresuojama VDR ir 1 -hidroksilazės [42], taigi tuomet tikimybė atsirasti ED didesnė.

Išties, ne vieno tyrimo rezultatai patvirtino esant ryšį tarp 25(OH)-D ir endotelio funkcijos, vertinamos instrumentiniais metodais. Tiriant sveikus savanorius Turkijoje [43], nustatyta, kad endotelio funkcija, vertinama pagal tėkmės lemiama vazodilatacija žasto arterijoje, buvo statistiškai reikšmingai prastesnė asmenų, kurių 25(OH)-D koncentracija kraujyje buvo mažesnė nei 25 nmol/l, palyginti su kontroline grupe, t. y. Vit. D nestokojančiais asmenimis, kurių 25(OH)-D koncentracija kraujyje buvo bent 75 nmol/L. Maža to: atvejo grupės (turtiems Vit. D nepakankamumą) asmenims skyrus gydymą Vit. D preparatu (300 000 TV vitamino D3 į raumenis kartą per mėnesį), po 3 mėnesių nustatyta, kad tėkmės lemiama vazodilatacija statistiškai reikšmingai pagerėjo. JAV atliktas tyrimas [42] irgi parodė, kad neadekvačiai maža 25(OH)-D koncentracija kraujyje yra susijusi su ED (vertinant pagal tėkmės lemiama vazodilatacijos tyrimo rezultatus) vidutinio amžiaus ir vyresniems suaugusiems asmenims.

Klinikinių tyrimų, vertinusių 25(OH)-D ir AM sąryšius, nėra gausu. Tiriant metaboliniu sindromu sergančius ligonius [44], rasta didesnė sICAM-1 koncentracija kraujyje tų asmenų, kuriems nustatyta per maža 25(OH)-D koncentracija, palyginti su asmenimis, nestokojančiais Vit. D. Analizuodami daugiau kaip 3000 vyresnių (vidutinis amžius 62 ± 10 m.) pacientų 25(OH)-D ir $1,25(\text{OH})_2\text{-D}$ sąryšius su mirtingumu nuo ŠK ligų ir bendruoju mirtingumu, H. Dobnig su bendraautoriais kartu aptiko šių Vit. D formų sąsają su tirpiosiomis ICAM-1 ir VCAM-1, kurios išliko reikšmingos netgi atsižvelgiant į tokius kofaktorių kaip amžius, lytis, KMI, fizinio aktyvumo lygmuo, rūkymas (rūko ar ne), serga ar neseraga cukriniu diabetu, serga ar neseraga arterine hipertenzija, bei MTL-cholesterolio koncentracija [45].

Reikėtų pabrėžti, kad apskritai didesnė dalis klinikinių studijų vertino įvairias Vit. D sąsajas su ŠK sistema tirdamos sergančius arba pagyvenusius asmenis, o šių tyrimų jauniems ir palyginti sveikiems asmenims, kuriems mažiausiai tikėtini dideli struktūriniai kraujagyslių pokyčiai, trūksta. Kita vertus, dabartinės rekomen-

dacijos kol kas aiškiai nenurodo, jog Vit. D vartojimas gali apsaugoti nuo ŠK ligų bei komplikacijų, todėl moksliniai tyrimai, analizuojantys įvairius vitamino D poveikio ŠK sistemai aspektus, šiandien ypač reikalingi [46, 47].

Daug studijų rodo [48–53], kad nuo pusiaujo nutolusiose šalyse, iš jų ir Lietuvoje, Vit. D kiekis organizme per metus kinta, didžiausias jis yra rugpjūčio ir rugsėjo mėnesiais (šiltasis sezonas), mažiausias – vasarį ir kovą (šaltasis sezonas), ir tai visų pirma lemia saulės šviesos intensyvumo kaita per metus. Todėl pasirinkome matuoti Vit. D koncentraciją kraujyje du kartus: pirmą – rugpjūtį arba rugsėjį, antrą – vasarį arba kovą, tikėdamiesi rasti pakankamai didelį skirtumą tarp vitamino D koncentracijų. Kartu atliekami ir kiti laboratoriniai tyrimai, tarp jų – AM, tikintis rasti AM koncentracijų skirtumus būsiant priešingus Vit. D kiekiu kitimui, t. y. didesnius šaltuoju sezonu. Tikriname hipotezę, jog sąlyginai sveikiems atsitiktinai parinktiems jauniems vyrams ši koreliacija galėtų būti atvirkščiai proporcinga ir būti reikšminga abiem sezonais. Būtent pirmojo tyrimo etapo, vykusio 2012 m. vasarį ir kovą, rezultatus pateikiame šioje publikacijoje.

TYRIMO METODIKA

Tiriamieji

Dalyvauti tyrime buvo kviečiami 20–39 metų atsitiktinės atrankos metodu iš informacinės sistemos duomenų bazės atrinkti sąlygiškai sveiki VšĮ Vilniaus Centro poliklinikos pacientai vyrai. Buvo gautas Vilniaus regioninio biomedicininio tyrimų etikos komiteto leidimas atlikti šį tyrimą. Visi tyrimo dalyviai buvo informuoti apie tyrimo eigą ir sutiko dalyvauti tyrime, pasirašydami sutikimo formą.

Apie atrinkto asmens tinkamumą dalyvauti tyrime buvo sprendžiama susipažinus su įrašais jo ambulatorinio gydymo kortelėje ir VšĮ Vilniaus Centro poliklinikos informacinėje sistemoje. Atmetimo kriterijai: tyrimo metu asmuo serga ūimomis (pvz., infekcinėmis) ar lėtinėmis ligomis: ŠK sistemos, endokrininėmis ar medžiagų apykaitos ligomis (pvz., cukriniu diabetu, dislipidemija), kvėpavimo sistemos, kraujo arba sisteminėmis jungiamojo audinio ligomis, piktybiniais navikais arba psichikos ligomis; diagnozuotas III laipsnio (morbidišnis) nutukimas; nuolat vartoja vaistus arba maisto papildus; sirgęs miokardo in-

farktu, galvos smegenų insultu, tromboze; atlikta chirurginė procedūra mažiau nei prieš 3 mėn.; neturės galimybių atvykti į ištyrimo vietą du kartus per metus. Potencialūs tyrimo dalyviai buvo kviečiami el. paštu arba telefonu. Visi tiriamieji yra nuolatiniai Vilniaus miesto ir jo apylinkių gyventojai.

Tyrimo struktūra

Pirmasis etapas vyko 2012 m. vasarį ir kovą. Šiuo laikotarpiu tiriamiesiems reikėjo atvykti vieną kartą. Tyrimai buvo atliekami ryta stabilios temperatūros (22 ± 2 C) patalpoje. Bent 12 valandų iki tyrimo pacientas turėjo būti nevalges, negėres ir nerūkęs. Tiriamieji buvo apklausti naudojant specialią anketą, į kurią buvo įrašomi duomenys apie amžių bei tam tikrus ŠK ligų rizikos veiksnius: šeiminei ŠK ligų anamnezę, rūkymo bei kai kuriuos mitybos ir fizinio aktyvumo įpročius. Jei pacientas rūko dabar, buvo teiraujamasi apie rūkymo „stažą“ ir vidutiniškai per parą surūkomų cigarečių skaičių; jeigu rūkė anksčiau – prieš kiek metų metė rūkyti; jeigu asmuo metė rūkyti mažiau nei prieš 1 metus, jis buvo laikomas rūkančiu. Apie mitybą buvo teiraujamasi, ar mėgsta papildomai sūdyti maistą, ar maitinasi subalansuotai (t. y. bent 3 porcijos vaisių ir daržovių per dieną, mažai gyvulinių riebalų). Fizinio aktyvumo lygis buvo vertinamas teiraujantis, kiek įprastai kartų per savaitę tiriamasis užsiima aktyvia fizine veikla, trunkančia bent 30 min., t. y. bėgioja, važinėja dviračiu, vaikščioja lauke (įskaitant ėjimą į/iš darbo), dirba sode ar darže, žaidžia judriuosius žaidimus ir pan. Remiantis PSO rekomendacijomis, jeigu tiriamasis fiziškai aktyvus būna mažiau negu 7 kartus per savaitę (arba atitinkamai $7 \times 30 = 210$ min., jeigu fiziškai aktyviai judama dažnai, bet trumpiau nei 30 min.), toks asmuo buvo vertinamas kaip nepakankamai fiziškai aktyvus [54].

Visiems buvo matuojamas ūgis, svoris, liemens ir klubų apimtis, tiriamiesiems dėvint lengvus viršutinius drabužius ir be batų. Apskaičiuotas kūno masės indeksas (KMI), t. y. svorį (kg) dalijant iš ūgio (m), pakelto kvadratu. Remiantis PSO rekomendacijomis, asmenys buvo laikomi normalios kūno masės, jeigu jų KMI yra tarp 18,5 ir 24,9; turinčiais antsvorio, jeigu KMI yra nuo 25 iki 29,9; nutukusiais, jeigu jų KMI yra 30 ir daugiau. Liemens apimtis matuota vidurinėje linoje tarp apatinės šonkaulių lanko ribos ir klubakaulio sparno, tiriamajam normaliai iškvėpus. Klubų apimtis

matuota per plačiausią klubų vietą. Apskaičiuotas liemens apimties (cm) ir klubų apimties (cm) santykis. Abiejų rankų sistolinis ir diastolinis arterinis kraujo spaudimas matuotas sėdint, naudojant standartinį žasto manometrą. Apskaičiuoti abiejų rankų sistolinio ir diastolinio arterinio kraujospūdžio verčių aritmetiniai vidurkiai (atitinkamai žymimi SKS ir DKS) bei vidutinis arterinis kraujo spaudimas (VAKS) pagal formulę $VAKS = 1/3 \times SKS + 2/3 \times DKS$.

Buvo imami kraujo iš venos mėginiai į vakuuminius mėgintuvėlius (BD, NJ, JAV): bendrajam kraujo tyrimui į mėgintuvėlį su EDTA; biocheminiam kraujo tyrimui į du SST mėgintuvėlius (su krešėjimo aktyvikiu ir atskiriamuoju geliu); gliukozės koncentracijai nustatyti į mėgintuvėlį su natrio fluoridu ir kalio oksalatu. Mėgintuvėliai su natrio fluoridu ir kalio oksalatu buvo centrifuguojami per 15 min. nuo kraujo mėginių paėmimo. Kraujo mėginiai SST mėgintuvėliuose buvo paliekami iki 1 val. stovėti kambario temperatūroje, iki visiškai sukresės. Centrifugavimas buvo atliekamas fiksuoto kampo centrifuga 1300 RCF 10 min. Visi mėginiai po pirminio aporošimo buvo laikomi 0–4 °C temperatūroje ir per 6 val. specialia transportavimo šaldytuve pristatomi į VUL Santariškių klinikų Laboratorinės medicinos centrą.

Bendrasis kraujo tyrimas buvo atliekamas „Sysmex E-5000“ hematologiniu analizatoriumi. Dauguma biocheminių kraujo tyrimų atlikti naudojant „Architect“ ci8200 analizatorių (Abbott Laboratories, IL, JAV):

- 25(OH)-D ir testosterono koncentracija serume – chemiluminescencinės imunologinės analizės metodu;
- CRB koncentracija – imunoturbidimetriniu metodu (apatinė jautrumo riba – 0,2 mg/l);
- Bendrojo cholesterolio koncentracija (BCh) – fermentiniu (cholesterolio esteražės / oksidazės) metodu;
- Trigliceridų (TG) koncentracija – glicerolio fosfato oksidazės metodu;
- MTL cholesterolio koncentracija (MTL-Ch) – tiesioginiu kiekybiniu selektyvaus detergento fermentiniu metodu;
- DTL cholesterolio koncentracija (DTL-Ch) – tiesioginiu kiekybiniu akceleratoriaus/selektyvaus detergento metodu;
- Gliukozės koncentracija – heksokinazės metodu.

Kiekvieno tiriamojo serumo dalis buvo užšaldyta iki –20 °C, kol bus atliekamas tirpiųjų adhezijos molekulių tyrimas imunofermentinės analizės

(ELISA) metodu. Kiekvienos adhezijos molekulės koncentracija buvo tirinama naudojant atskirą „Quantikine“ reagentų rinkinį (R&D Systems, MN, JAV), šviesos signalo intensyvumas vertintas mikroplokštelių spektrofotometru „EpochTM“ (Biotek, VT, JAV).

Statistinė duomenų analizė

Duomenys apdoroti naudojant statistinį paketą „SPSS“ (versija 19 „Windows“ OS). Aprašomoji statistika pateikiama kiekybiniais duomenimis – vidurkių ir standartinių nuokrypių pavidalu, kokybiniais – dažnių ir santykinių dažnių (procentais) pavidalu. Duomenys laikomi statistiškai reikšmingais, jeigu p reikšmė mažesnė už 0,05. Kategoriniams duomenims įvertinti buvo taikomas ² kriterijus. Kiekybinių duomenų pasiskirstymo pagal normalųjį dėsnį prielaida tikrinta naudojant Šapiro ir Vilko testą. Normalumo prielaidos netenkinantys duomenys buvo lg(x) transformuojami ir gautosios reikšmės (jeigu kitaip nenurodyta) buvo naudojamos tolesniems skaičiavimams. Kiekybiniais duomenims buvo skaičiuojami Pirsono koreliacijos koeficientai (r). Kiekvienos adhezijos molekulės koncentracijos ir 25(OH)-D koncentracijos bei kitų rizikos veiksnių priklausomybei tirti taikytas tiesinės regresijos pažingsnis „Pirmyn“ (angl. *Forward*) metodas. Prieš sudarant nepriklausomų kintamųjų sąrašą, buvo atsižvelgiama į apskaičiuotąsias pastarųjų tarpusavio koreliacijas, siekiant išvengti tarpusavio priklausomybės įtakos. Kintamasis buvo įtraukiamas į regresijos lygtį, jei $p < 0,05$. Be to, visi tiriamieji, remiantis 25(OH)-D koncentracija, buvo suskirstyti į grupes (terciles) ir šių grupių rodikliai lyginti tarpusavyje, naudojant ANOVA (kai rodiklis tenkina normalumo prielaidą) arba neparametrinį Kruskalio ir Voliso testą (kai normalumo prielaidos rodiklis netenkina). Lyginant kiekybinius parametrus tarp dviejų grupių (pvz., rūkančių ir nerūkančių), buvo naudojamas Stjudento t-testas nepriklausomoms imtims arba neparametrinis Mano ir Vitnio U testas. Visur pateikiamos dvipusės p reikšmės.

REZULTATAI

Bendrosios charakteristikos

Tyrimo dalyvavo 64 vyrai, vidutinis tiriamųjų amžius $30,98 \pm 4,48$ m. Iš jų rūkančių buvo 17 (26,6 %), nerūkančių 47 (73,4 %, įskaitant niekada nerūkiusius ir metusius rūkyti bent prieš

1 lentelė. **Bendroji tiriamųjų charakteristika: antropometriniai ir laboratoriniai rodikliai**

Table 1. **Anthropometric characteristics and laboratory data of the study participants**

Rodiklis	Bendroji grupė
KMI, kg/m ²	25,24 ± 4,47
Liemens apimtis, cm	88,76 ± 10,11
Klubų apimtis, cm	101,88 ± 7,13
Liemens ir klubų santykis	0,87 ± 0,05
SKS, mmHg	115,00 (14,38)
DKS, mmHg	76,25 (11,88)
VAKS, mmHg	90,72 ± 7,21
Leukocitų skaičius (× 10 ⁹ /l)	6,17 ± 1,12
Trombocitų skaičius (× 10 ⁹ /l)	227 (65,78)
BCh, mmol/l	4,83 (1,29)
MTL-Ch, mmol/l	3,08 (0,99)
DTL-Ch, mmol/l	1,21 ± 0,25
TG, mmol/l	1,10 (0,68)
BCh ir DTL-Ch santykis	3,89 (1,70)
MTL-Ch ir DTL-Ch santykis	2,55 (1,39)
Gliukozės plazmoje, mmol/l	5,23 ± 0,4
Testosteronas, mmol/l	19,7 (7,85)
25(OH)-D, nmol/l	46,96 ± 13,74
sVCAM-1, ng/ml	495,29 (116,10)
sICAM-1, ng/ml	162,40 ± 29,40
sE-selektinas, ng/ml	35,12 (13,81)
sP-selektinas, ng/ml	98,12 ± 25,89

Normaliai pasiskirsčiusiems rodikliams pateikiamas vidurkis ± standartinis nuokrypis, normalumo prielaidos netenkinantiems – mediana (tarpkvartilinis plotis). KMI – kūno masės indeksas, SKS – sistolinis kraujo spaudimas, DKS – diastolinis kraujo spaudimas, VAKS – vidutinis arterinis kraujo spaudimas, BCh – bendrasis cholesterolis, MTL-Ch – mažo tankio lipoproteinų cholesterolis, DTL-Ch – didelio tankio lipoproteinų cholesterolis, TG – trigliceridai, CRB – C reaktyvusis baltymas, 25(OH)-D – 25-hidroksi-vitaminas D, sVCAM-1 – tirpioji kraujagyslių lastelių adhezijos molekulė-1, sICAM-1 – tirpioji tarplastelinės adhezijos molekulė-1, sE-selektinas – tirpusis E-selektinas, sP-selektinas – tirpusis P-selektinas.

1 metus). 33 tiriamieji (51,6 %) teigė besimaitinantys subalansuotai; 31 asmuo (48,8 %) nurodė priešingai. Mėgstantys papildomai sūdyti maistą buvo 29 vyrai (45,3 %), nesūdantys – 35 (54,7 %).

Pakankamai ir nepakankamai pravaite fiziškai aktyvių buvo maždaug vienodai – atitinkamai 31 (48,4 %) ir 33 (51,6 %) vyrai. Kitos pacientų skaitinės charakteristikos pateiktos 1 lentelėje. Iš kiekybinių rodiklių normalu-

2 lentelė. Tirpiųjų adhezijos molekulių – endotelio disfunkcijos biožymenų – koncentracijos kraujo serume sąsajos su rizikos veiksniais (tiesinė regresija)

Table 2. Multiple linear regression models predicting levels of soluble adhesion molecules from risk factors

Priklausomas kintamasis*	Nepriklausomas kintamasis	Regresijos koeficientas		p reikšmė
logsVCAM-1 ($R^2=0,116$, koreg $R^2=0,102$, $p=0,006$)	Liemens ir klubų apimčių santykis	-0,693	-0,341	0,006
sICAM-1 ($R^2=0,068$, koreg $R^2=0,053$, $p=0,037$)	logTG	33,649	0,261	0,037
logsE-selektinas ($R^2=0,177$, koreg $R^2=0,150$, $p=0,003$)	Gliukozė 25OH-Vit. D	0,156 -0,003	0,345 -0,244	0,004 0,040
sP-selektinas ($R^2=0,097$, koreg $R^2=0,082$, $p=0,012$)	katėgCRB**	16,361	0,311	0,012

* – šalia priklausomo kintamojo pateikiamas regresijos modelio determinacijos koeficientas R^2 , koreguotas determinacijos koeficientas (koreg R^2) ir p reikšmė; – standartizuotas regresijos koeficientas.

** – katėgCRB kodavimas: 0 – jei CRB < 1 mg/ml, 1 – jei CRB ≥ 1 mg/l.

logTG – log-trasformuota trigliceridų koncentracija, logBCh – log-trasformuota bendrojo cholesterolio koncentracija, 25(OH)-D – 25-hidroksi-vitamino D koncentracija, logsVCAM-1 – log-trasformuota tirpiosios kraujagyslių ląstelių adhezijos molekulės-1 koncentracija, sICAM-1 – tirpiosios tarpląstelinės adhezijos molekulės-1 koncentracija, sE-selektinas – log-trasformuota tirpiojo E-selektino koncentracija, sP-selektinas – tirpiojo P-selektino koncentracija.

3 lentelė. Tirpiųjų adhezijos molekulių – endotelio disfunkcijos biožymenų – koncentracijos kraujo serume sąsajos su rizikos veiksniais (tiesinė regresija) normalios kūno masės asmenims (KMI < 25; n = 37)

Table 3. Multiple linear regression models predicting levels of soluble adhesion molecules from risk factors in normal weight men (BMI < 25; n = 37)

Priklausomas kintamasis*	Nepriklausomas kintamasis	Regresijos koeficientas		p reikšmė
logsVCAM-1 ($R^2=0,195$, koreg $R^2=0,172$, $p=0,006$)	Liemens ir klubų apimčių santykis	-1,400	-0,442	0,006
sICAM-1	Reikšmingų koeficientų negauta			
logsE-selektinas ($R^2=0,222$, koreg $R^2=0,176$, $p=0,014$)	Gliukozė 25OH-Vit.D	0,185 -0,005	0,342 -0,333	0,030 0,034
sP-selektinas ($R^2=0,339$, koreg $R^2=0,300$, $p=0,001$)	logTestost Fiz. aktyvumo katėg.**	112,203 16,753	0,553 0,322	<0,001 0,030

* – šalia priklausomo kintamojo pateikiamas regresijos modelio determinacijos koeficientas R^2 , koreguotas determinacijos koeficientas (koreg R^2) ir p reikšmė; – standartizuotas regresijos koeficientas.

** – fizinio aktyvumo kategorijos kodavimas: 0 – pakankamas fizinis aktyvumas, 1 – nepakankamas.

25(OH)-D – 25-hidroksi-vitamino D koncentracija kraujo serume, logTestost – log-trasformuota testosterono koncentracija, logsVCAM-1 – log-trasformuota tirpiosios kraujagyslių ląstelių adhezijos molekulės-1 koncentracija, sICAM-1 – tirpiosios tarpląstelinės adhezijos molekulės-1 koncentracija, sE-selektinas – log-trasformuota tirpiojo E-selektino koncentracija, sP-selektinas – tirpiojo P-selektino koncentracija.

4 lentelė. Tirpiųjų adhezijos molekulių – endotelio disfunkcijos biožymenų – koncentracijos kraujo serume sąsajos su rizikos veiksniais (tiesinė regresija) nutukusiems ar antsvorio turintiems asmenims (KMI ≥ 25; n = 27)

Table 4. Multiple linear regression models predicting levels of soluble adhesion molecules from risk factors in obese or overweight men (BMI ≥ 25; n = 27)

Priklausomas kintamasis*	Nepriklausomas kintamasis	Regresijos koeficientas		p reikšmė
logsVCAM-1	Reikšmingų koeficientų negauta			
sICAM-1 ($R^2=0,204$, koreg $R^2=0,172$, $p=0,018$)	Liemens ir klubų apimčių santykis	233,086	0,452	0,018
logsE-selektinas ($R^2=0,207$, koreg $R^2=0,175$, $p=0,017$)	VAKS	0,009	0,455	0,017
sP-selektinas ($R^2=0,209$, koreg $R^2=0,177$, $p=0,017$)	logTestost	-92,830	-0,457	0,017

* – šalia priklausomo kintamojo pateikiamas regresijos modelio determinacijos koeficientas R^2 , koreguotas determinacijos koeficientas (koreg R^2) ir p reikšmė; – standartizuotas regresijos koeficientas.

logTestost – log-trasformuota testosterono koncentracija, VAKS – vidutinis arterinis kraujo spaudimas

mo prielaidos netenkino kai kurie antropometriniai (KMI, SKS ir DKS) bei laboratoriniai (BCh, MTL-Ch, TG bei testosterono koncentracijos, trombocitų skaičius (PLT), tirpiųjų VCAM-1 ir E-selektino koncentracija kraujo serume, BCh ir DTL-Ch santykis, MTL-Ch ir DTL-Ch santykis). Prieš skaičiuojant koreliacijos koeficientus ir taikant tiesinės regresijos modelius, šių

rodiklių reikšmės buvo lg(x)-transformuotos, jos tuomet normalumo prielaidą tenkino ir toliau tekste atitinkamai įvardijamos logKMI, logSKS, logDKS, logBCh, logMTL-Ch, logTG, logTestost, logPLT, logsVCAM-1, logsE-selektinas, log(BCh/DTL) ir log(MTL/DTL).

25(OH)-D koncentracija įvertinta remiantis dabar galiojančiomis nor-

momis [2]. Tik dviem vyrams (3,1 %) buvo nustatyta pakankama 25(OH)-D koncentracija (bent 75 nmol/l). 37 vyrams (57,8 %) 25(OH)-D koncentracija buvo ypač sumažėjusi (t. y. mažiau negu 50 nmol/l), kitiems 25 (39,1 %) buvo nedaug mažesnė už normą (daugiau negu 50 nmol/l, bet mažiau negu 75 nmol/l). Kadangi nė vieno tiriamojo CRB koncentracija neviršijo

5 lentelė. Antropometrinių ir laboratorinių rodiklių palyginimas, sugrupavus asmenis pagal 25(OH)-D koncentraciją
Table 5. Comparison of anthropometric and laboratory data in 25(OH)-D tertiles

Rodiklis	Pirmoji grupė† (n=21)	Antroji grupė (n=22)	Trečioji grupė (n=21)	p reikšmė
KMI, kg/m ²	25,37 ± 4,49	26,32 ± 4,89	23,96 ± 3,83	0,224
Liemens apimtis, cm	88,91 ± 10,72	93,48 ± 9,74	83,67 ± 7,48	0,003*
Klubų apimtis, cm	102,29 ± 7,43	104,00 ± 7,46	99,24 ± 5,83	0,116
Liemens ir klubų santykis	0,87 ± 0,06	0,90 ± 0,05	0,84 ± 0,04	0,001*
SKS, mmHg	121,31 ± 10,45	117,16 ± 8,36	115,12 ± 11,55	0,114
DKS, mmHg	79,05 ± 6,45	76,25 ± 5,96	76,19 ± 7,40	0,187
VAKS, mmHg	93,13 ± 6,88	89,89 ± 5,91	89,17 ± 8,39	0,046**
Leukocitų skaičius (× 10 ⁹ /l)	6,56 ± 1,11	6,23 ± 1,21	5,74 ± 0,91	0,059
Trombocitų skaičius (× 10 ⁹ /l)	244,05 ± 77,43	240,66 ± 43,24	215,27 ± 34,17	0,036**
BCh, mmol/l	5,06 ± 0,92	5,32 ± 1,01	4,85 ± 1,15	0,164
MTL-Ch, mmol/l	3,31 ± 0,83	3,51 ± 0,81	3,01 ± 0,79	0,130
DTL-Ch, mmol/l	1,19 ± 0,27	1,16 ± 0,23	1,29 ± 0,24	0,221
TG, mmol/l	1,22 ± 0,76	1,41 ± 0,90	1,18 ± 0,94	0,391
BCh ir DTL-Ch santykis	4,49 ± 1,31	4,83 ± 1,62	3,90 ± 1,23	0,296
MTL-Ch ir DTL-Ch santykis	2,95 ± 1,00	3,20 ± 1,17	2,43 ± 0,81	0,031*
Gliukozė plazmoje, mmol/l	5,20 ± 0,37	5,30 ± 0,42	5,20 ± 0,41	0,659
CRB 1 mg/ml	12 (18,75 %)	8 (12,5 %)	5 (7,81 %)	0,820
sVCAM-1, ng/ml	521,06 ± 129,09	465,02 ± 115,61	530,98 ± 173,57	0,408
sICAM-1, ng/ml	160,94 ± 28,98	164,96 ± 25,84	161,17 ± 34,23	0,316
sE-selektinas, ng/ml	37,95 ± 11,76	34,87 ± 11,64	30,64 ± 16,89	0,031**
sP-selektinas, ng/ml	93,27 ± 20,89	96,30 ± 29,09	104,87 ± 26,66	0,116

Pateikiamas rodiklio vidurkis ± standartinis nuokrypis; kategoriniams kintamiesiems – asmenų skaičius ir procentai.

† grupės – tercilės pagal 25(OH)-D koncentraciją: pirmoji – mažiau nei 40,16 nmol/l, antroji – nuo 40,16 iki 53,33 nmol/l, trečioji – daugiau nei 53 nmol/l.

* – skirtumas reikšmingas tarp II ir III grupės, pateikta atitinkama p reikšmė.

** – skirtumas reikšmingas tarp I ir III grupės, pateikta atitinkama p reikšmė.

KMI – kūno masės indeksas, SKS – sistolinis kraujo spaudimas, DKS – diastolinis kraujo spaudimas, VAKS – vidutinis arterinis kraujo spaudimas, BCh – bendrasis cholesterolis, MTL-Ch – mažo tankio lipoproteinų cholesterolis, DTL-Ch – didelio tankio lipoproteinų cholesterolis, TG – trigliceridai, CRB – C reaktyvusis baltymas, 25(OH)-D – 25-hidroksi-vitaminas D, sVCAM-1 – tirpioji kraujagyslių ląstelių adhezijos molekulė-1, sICAM-1 – tirpioji tarpląstelinės adhezijos molekulė-1, sE-selektinas – tirpusis E-selektinas, sP-selektinas – tirpusis P-selektinas.

3 mg/ml, remiantis Amerikos širdies asociacijos (angl. *American Heart Association* – AHA) rekomendacijomis [55], visi tiriamieji buvo suskirstyti į dvi kategorijas: mažos rizikos (CRB < 1 mg/l) ir vidutinės rizikos (CRB 1 mg/ml); tokių vyrų buvo atitinkamai 39 (60,9 %) ir 25 (39,1 %). Normalios kūno masės buvo 37 vyrai (57,8 %), antsvorio turinčių buvo 17 (26,6 %), nutukusių – 10 (15,6 %).

Tirpiųjų adhezijos molekulių, 25-hidroksi-vitamino D koncentracijos kraujyje ir širdies bei kraujagyslių ligų rizikos veiksniai priklausomumas

Buvo skaičiuojami Pirsono koreliacijos koeficientai tarp šių rodiklių: amžiaus, logKMI, liemens apimtys, klubų apimtys, vidutinio AKS, logSKS, logDKS, liemens ir klubų apimčių santykio, logBCh, logMTL-Ch, DTL-Ch, logTG, log(BCh/DTL), log(MTL/DTL),

gliukozės, 25(OH)-D, logTestost, logsVCAM-1, sICAM-1, logsE-selektino, sP-selektino.

25(OH)-D reikšmingai koreliavo tik su leukocitų skaičiumi ($r=-0,287$, $p=0,021$), beveik reikšmingai su logsE-selektinu ($r=-0,241$, $p=0,055$). sICAM-1 reikšmingai koreliavo su logTG: $r=0,261$, $p=0,037$. Aptikome reikšmingų logsVCAM-1 koreliacijų su liemens ir klubų apimčių santykiu ($r=0,341$, $p=0,006$), logBCh ($r=-0,309$, $p=0,013$), logMTL-Ch ($r=-0,328$, $p=0,008$), log(BCh/DTL) ($r=-0,261$, $p=0,037$) ir log(MTL/DTL) ($r=-0,279$, $p=0,026$).

sP-selektino reikšmingos koreliacijos nebuvo nė su vienu kiekybiniu rodikliu. Tačiau nustatėme reikšmingą logsE-selektino koreliaciją su daugeliu kitų rodiklių: liemens ir klubų apimtimis (atitinkamai $r=0,285$, $p=0,022$ ir $r=0,282$, $p=0,024$), logKMI ($r=0,324$, $p=0,009$), VAKS ($r=0,312$, $p=0,012$), gliukoze ($r=0,343$, $p=0,006$), DTL-Ch ($r=-0,273$, $p=0,029$), logTG ($r=0,278$, $p=0,026$),

log(BCh/DTL) ($r=0,296$, $p=0,017$), log(MTL/DTL) santykiu ($r=0,272$, $p=0,030$). Beje, buvo gauta reikšminga koreliacija tarp dviejų adhezijos molekulių – sICAM-1 ir logsVCAM-1 ($r=0,315$, $p=0,011$).

Sudarant daugialypės tiesinės regresijos modelius, priklausomu rodikliu buvo kiekvienos iš keturių tirtųjų AM koncentracija: logsVCAM-1, sICAM-1, logsE-selektino ir sP-selektino. Nepriklausomi kintamieji: amžius, antropometriniai ir kiti laboratoriniai rodikliai, tarp jų ir 25(OH)-D. Kaip nepriklausomi kintamieji į modelius buvo įtraukiami ir kategoriniai rodikliai arba pseudokintamieji: rūkymas (1 – rūko dabar, 0 – nerūko), mitybos ypatumai (nesubalansuota mityba – 1, subalansuota – 0; pasūdo maistą – 1, nepasūdo – 0), fizinis aktyvumas (pakankamas – 0, nepakankamas – 1). CRB įvertinimas kaip kintamasis kategCRB irgi buvo įtraukiamas į AM regresijos modelius: maža rizika (CRB yra mažiau nei 1 mg/ml) koduojama 0, o vidutinė (CRB koncentracija 1 mg/ml ir didesnė) – 1. Regre-

sijos modelių charakteristikos pateiktamos 2 lentelėje.

Matome, kad visų keturių regresijos modelių determinacijos koeficientai pakankamai maži (mažesni nei 0,20), todėl įvertinę, kad šie modeliai nepakankamai gerai aprašo sąsajas tarp AM koncentracijos ir kitų parametrų visoje 64 asmenų imtyje, atlikome papildomus skaičiavimus atskiriems pogrupiams. 3 ir 4 lentelėse pateikiamos regresijos modelių charakteristikos, kai jie sudaromi atitinkamai tik normalios kūno masės (KMI mažesnis nei 25) ir tik padidėjusios kūno masės asmenims (KMI lygus 25 ir didesnis). Atkreiptinas dėmesys, kad pastarųjų regresijos modelių aprašomumas pagerėjo – determinacijos koeficientai padidėjo ir beveik visuose viršija 0,20. Be to, normalios kūno masės asmenims aptikti panašūs dėsnin-gumai kaip ir bendroje imtyje: logsVCAM-1 koncentracija liko reikšmingai priklausoma nuo liemens ir klubų apimčių santykio, o logsE-selektino koncentracija – nuo gliukozės ir 25(OH)-D koncentracijos. Kitoms dviem molekulėms – sICAM-1 ir sP-selektinui – regresijos modeliuose reikšmingais tapo kiti parametrai arba nė vienas iš jų.

Dar asmenys buvo grupuojami pagal kiekvieną iš kategorinių rodiklių: rūkantys ir nerūkiantys; pakankamai ir nepakankamai fiziškai judantys; subalansuoti ir nesubalansuoti besimaitinantys; linkę papildomai pasūdyti maistą ir to nedarantys. Buvo lyginami 25(OH)-D ir kiekvienos iš keturių tirpiųjų AM koncentracijos tarp tokių grupių ir reikšmingų skirtumų negauta (duomenys nepateikiami). Tačiau palyginus minėtų medžiagų koncentracijas asmenų, kurių CRB koncentracija mažesnė nei 1 mg/l, su asmenų, kurių CRB koncentracija 1 mg/l ir didesnė, rasta, jog pirmiesiems 25(OH)-D koncentracija buvo reikšmingai didesnė, o sP-selektino koncentracija reikšmingai mažesnė (atitinkamai $50,69 \pm 13,89$ nmol/l vs. $41,14 \pm 11,51$ nmol/l, $p = 0,006$; ir $91,73 \pm 23,64$ ng/ml vs. $108,09 \pm 26,55$ ng/ml, $p = 0,012$).

Rodiklių analizė tarp 25-hidroksi-vitamino D koncentracijos tercilių

Visi tiriamieji buvo suskirstyti į tris grupes (terciles) pagal 25(OH)-D koncentraciją: pirmoji grupė – mažiau nei 40,16 nmol/l, antroji – nuo 40,16 iki 53,33 nmol/l, trečioji – daugiau nei 53 nmol/l. Rodikliai tarp šių grupių palyginti taikant atitinkamai ANOVA

testą (ir Bonferonio *post hoc* kriterijū, kai dispersijos lygios, ar Tamhane *post hoc* kriterijū, kai dispersijos nelygios) arba neparаметrinį Kruskalio ir Voliso testą. Kiekybiniai rodikliai prieš šią analizę nebuvo transformuoti. Rezultatai pateikiami 5 lentelėje. Matome, kad tam tikrą bendrą dėsnin-gumą tarp visų grupių galima išvėgti vertinant tokius rodiklius kaip SKS, DKS, leukocitų skaičius, CRB ir trombocitų skaičius, kurie, einant nuo mažiausių 25(OH)-D koncentracijų tercilės link didžiausių, linkę mažėti, bei tirpaus P-selektino koncentracija, kuri – priešingai – linkusi didėti, tačiau šios tendencijos nėra statistiškai reikšmingos.

Keletas reikšmingų skirtumų tarp tercilių visgi buvo aptikta: liemens apimtis ir liemens ir klubų santykis patikimai buvo mažesni, o MTL-Ch ir DTL-Ch santykis didesnis asmenų, kurių 25(OH)-D koncentracijos vidutinės, palyginti su asmenimis, kurių 25(OH)-D koncentracijos didžiausios. Lyginant mažiausias ir didžiausias 25(OH)-D koncentracijas turinčius vyrus, pirmiesiems buvo statistiškai reikšmingai didesnis VAKS, trombocitų skaičius ir tirpiojo E-selektino koncentracija.

Liemens apimtys bei liemens ir klubų santykio skirtumai tarp antrosios ir trečiosios tercilės išliko statistiškai reikšmingi netgi atsižvelgus į tokius šalutinius veiksnus kaip amžius, rūkymas (dabar rūko ar ne), mitybos ypatumai, fizinio aktyvumo lygmuo (pakankamas ar ne), gliukozės ir testosterono koncentracija kraujyje (p reikšmės atitinkamai 0,035 ir 0,013, taikyta ANCOVA ir Bonferonio *post hoc* kriterijus). MTL-Ch ir DTL-Ch santykio, VAKS, trombocitų skaičiaus ir tirpiojo E-selektino koncentracijos skirtumai, koregavus pagal tas pačias minėtas kovariantes, tapo statistiškai nereikšmingi.

DISKUSIJA

Kaip vieną esminių tyrimo rezultatų reiktų pabrėžti tai, kad beveik visiems šaltuoju sezonu tirtiems vyrams buvo nustatyta pernelyg maža 25(OH)-D koncentracija (mažesnė negu 75 nmol/l), taigi konstatuotas nepakankamas aprūpinimas vitaminu D. Žinoma, kad esant mažesnei nei 75 nmol/l (t. y. mažesnei negu 30 ng/ml) 25(OH)-D koncentracijai, didėja ne tik ŠK ligų, bet ir infekcinių, odos, nervų sistemos ir kt. ligų rizika [2]. Mūsų tyrimo duomenys atitinka prieš keletą metų I. Gailytės ir kt. at-

likto tyrimo rezultatus, kai iš 123 jaunuų sveikų vyrų 98,3% buvo nustatytas vitamino D trūkumas arba nepakankamumas (25(OH)-D koncentracija, mažesnė nei 75 nmol/l) [56]. Todėl manome, kad mūsų tyrimo rezultatai gali būti dar vienas argumentas, pagrindžiantis būtinybę jau rudens pabaigoje ne tik vyrams, bet ir visiems Lietuvos gyventojams, pasikonsultavus su gydytoju, pradėti vartoti vitamino D papildus. Tai būtų geriausia išeitis šaltuoju sezonu. Žinoma, kad maiste Vit. D yra labai nedaug, o dirbtiniai UV spinduliuotės šaltiniai (pvz., soliariumai) šaltuoju sezonu nerekomenduojami, nes jie siejami su padidėjusia melanomos ir kitų odos ligų rizika.

Šis tyrimas, mūsų žiniomis, yra pirmasis Lietuvoje, kuriame kompleksškai vertinama jaunuų vyrų tirpiųjų adhezijos molekulių – endotelio disfunkcijos biožymenų – koncentracijos kraujyje sąsajos ne tik su aprūpinimo Vit. D lygmeniu, bet ir su kai kuriais vadinamaisiais tradiciniais ŠK ligų rizikos veiksniais. Tai vertintina kaip mūsų tyrimo privalumas, nes analizavome ne tik tiesioginius 25(OH)-D koreliacinių ryšių ypatumus su tirpiosiomis AM, bet kartu atsižvelgėme į galimą kitų, t. y. šalutinių, nuo vitamino D nepriklausančių ar tik iš dalies priklausančių, bet sugebančių daryti įtaką endotelio funkcijai, veiksmų poveikį.

Galime teigti, kad bent iš dalies mūsų prielaida apie AM sąsajas su 25(OH)-D koncentracija pasitvirtino: taikydami tiesinės regresijos modelį, nustatėme, kad 25(OH)-D reikšmingai ir atvirkščiai koreliavo su viena iš tirpiųjų AM – sE-selektinu, netgi atsižvelgiant į kitus veiksnus, kaip antai gliukozės kiekis kraujyje, lipidų rodikliai, KMI, vidutinis AKS, rūkymo statusas bei mitybos ypatumai. Kadangi minėtas dėsnin-gumas pastebėtas ir sudarius regresijos modelį normalios kūno masės tiriamiesiems, darytina išvada, kad aiškios sąsajos tarp Vit. D ir E-selektino egzistuoja bent jau nenutukusiems žmonėms. Analogiška atvirkštinė tendencija pastebėta ir lyginant sE-selektino koncentracijas tarp 25(OH)-D tercilių, deja, ji tapo statistiškai nereikšminga atsižvelgus į minėtus šalutinius veiksnus. Visiškai priešinga ir sunkiai paaiškinama tendencija pasizymėjo tirpusis P-selektinas: jo koncentracija augo didėjant Vit. D atsargoms (žr. 5 lentelę). Kadangi trombocitų skaičius augant 25(OH)-D koncentracijai buvo linkęs mažėti, visiškai tikėtina, kad tirpiojo P-selektino koncentracija didėja jam atsipalaiduojant daugiausia iš endotelio ląstelių, o ne iš trombocitų, nes var-

giai įmanoma, kad netgi sumažėjus trombocitų kiekiui cirkuliuojančiame kraujyje jie gebėtų tiek suaktyvėti, kad juose labai smarkiai pagausėtų P-selektino raiška ir jo atsipalaidavimas į kraujo plazmą taip padidėtų, kad galėtų kompensuoti ir net viršyti sP-selektino kiekį, susidarantį esant kur kas mažesniai trombocitų skaičiui. Bet tai prieštarautų prielaidai, kad endotelis *per se* yra smarkiau aktyvinamas didėjant 25(OH)-D koncentracijai, nes juk tokiu atveju E-selektino, kuris yra specifiškas endoteliui, koncentracija linkusi mažėti. Galbūt sP-selektino raiška ir atpalaidavimas iš endotelio ląstelių visgi gali didėti mažėjant endotelio aktyvumui ar pažeidimui, bet tuomet yra neaiškus tokio reiškinio mechanizmas ir tai, ar vitaminas D čia nors kiek prisideda. Galbūt tai yra „divfazio“ (apverstos U raidės formos) Vit. D poveikio išraiška, kai esant pernelyg mažoms Vit. D koncentracijoms jo įtaka P-selektino išlaisvinimui iš endotelio ląstelių ir atitinkamai sP-selektino koncentracijai yra priešingos tendencijos, negu būtų tuomet, kai 25(OH)-D koncentracija perkopia 30 mg/ml. Beje, verta prisiminti, kad sugrupavus asmenis pagal CRB kategoriją, 25(OH)-D koncentracija ir sP-selektino koncentracija buvo atitinkamai mažesnė ir didesnė asmenims, kurių CRB koncentracija buvo 1 mg/l ar didesnė. Taigi gali būti, kad Vit. D aprūpinimo mažėjimas gali didinti CRB koncentraciją, o šis skatinti P-selektino raišką ląstelėse (endotelio, trombocituose ar abiejų rūšių). Bet tokia prielaida irgi prieštarauja rezultatams, gautiems lyginant sP-selektino koncentraciją tarp 25OH-D tercilių. Taigi, remiantis vien šio tyrimo etapo rezultatais, vienareikšmės išvados apie sP-selektino ir 25(OH)-D koncentracijų sąsajas suformuluoti dar negalima. Šią dilemą padėtų išspręsti izoliuotų trombocitų ir (ar) endotelio ląstelių tyrimai, nustatant P-selektino raiškos intensyvumą ląstelių paviršiuje, t. y. kokia dalis ląstelių yra aktyvios (turi paviršiuje ekspresuotą P-selektino molekulių), ir palyginant su atitinkamo asmens 25(OH)-D koncentracija kraujo serume.

Neaptikome reikšmingų sąsajų tarp 25(OH)-D koncentracijos ir sICAM-1 bei sVCAM-1 koncentracijų. Tai galima paaiškinti tuo, jog beveik visiems mūsų tirtiems vyrams Vit. D atsargos organizme buvo labai mažos, o „kritinė“ 25(OH)-D reikšmė, kurią pasiekus ŠK ligų rizika sumažėja, manoma, yra ties 80 nmol/l (40 ng/ml) [57, 58], t. y. kur kas aukštesnė negu mūsų tiriamųjų vidurkis (47 nmol/l).

Todėl spėjame, kad mūsų tyrimo dalyvių organizme tiek endotelio, tiek kitų ląstelių – sVCAM-1 ir sICAM-1 „šaltinių“ – aktyvacijos lygis buvo panašus (panašiai sutrikęs arba padidėjęs), nes beveik visiems vitamino D šaltuoju sezonu trūko. Vadinas, beveik visų tiriamųjų 25(OH)-D koncentracija nepasiekė „slenkstinės vertės“ – lūžio taško, skiriančio du pogrupius, kurių vienas ar keli objektyvūs rodikliai, tokie kaip sICAM-1 ar sVCAM-1, reikšmingai skiriasi tarpusavyje. Galima manyti, kad trūkstant Vit. D, šiems dviem žymenims kur kas reikšmingesnę nei Vit. D įtaką turėjo kiti rizikos veiksniai.

Iš tiesų, kalbant apie sICAM-1 ir sVCAM-1, pasakytina, kad mes aptikome tam tikrų sąsajų su tradiciniais ŠK ligų rizikos veiksniais. Atkreiptinas dėmesys į tai, kad gautieji silpni arba vidutiniai koreliacijos koeficientai vis dėlto buvo statistiškai reikšmingi. Kiek netikėtas yra kai kurių tendencijų pobūdis. Antai pagal regresijos modelius, didėjant liemens ir klubų apimčių santykiui, logsVCAM-1 skaitinė vertė (taigi ir sVCAM koncentracija) mažėja. Tokie radiniai prieštarauja įprastoms nuostatoms, kad storėjant, ypač per pilvą, kraujagyslių pažeidimo ir ŠK ligų rizika didėja.

Tiesioginė sE-selektino koreliacija su gliukoze bei sP-selektino sąsaja su CRB (koncentracijos kategorija) nestebina, nes įrodyta, kad gliukozės bei CRB didėjimas yra siejamas su endotelio disfunkcijos vystymusi bei didėjančia ŠK ligų rizika [22, 59].

Kiek labiau stebina, kad negavome statistiškai reikšmingų nė vienos AM sąsajų su tokiais pripažintais ŠK ligų rizikos veiksniais kaip KMI, rūkymo būklė ar mitybos ypatumai. Aiškių ryšių tarp kitų parametru, pavyzdžiui, kraujospūdžio, ir AM koncentracijos irgi neaptikome, nes vidutinio AKS sąsajos buvo reikšmingos tik su logsE-selektinu ir tik asmenims, kurie svėria per daug (KMI ≥ 25). Pažymėtina, kad AKS buvo matuojamas tik vieną kartą, nes neturėjome galimybės taisyti 24 val. AKS stebėjimo, kuris vis dažniau naudojamas ir moksliniuose tyrimuose. Taigi negalima atmesti „balto chalato“ efekto kai kuriems pacientams ir todėl trapias sąsajas tarp kraujospūdžio ir kitų parametru derėtų vertinti atsargiai.

Galimas daiktas, kad rezultatai būtų kiek kitokie ir lengviau interpretuojami, jeigu atsižvelgtume į dar vieną rodiklį – paveldimą polinkį sirgti ŠK ligomis. Apklausoje metu tiriamųjų buvo teiraujama, ar jų pirmos arba antros eilės giminės serga ar sirgo ŠK ligomis, jeigu taip – kokiomis. Deja,

tikslius šeimines anamnezės duomenis galėjo pateikti tik kai kurie asmenys, todėl šią informaciją įvertinome kaip nepakankamai patikimą ir nusprendėme jos į statistinę analizę neįtraukti.

Yra atlikta tyrimų, vertinusių AM ir ŠK ligų rizikos veiksnių sąsajas, tačiau gautieji rezultatai gana nevienareikšmiai. Ištyrus normalios kūno masės, kliniškai sveikų, nerūkančių 90 asmenų (tarp jų 42 vyrai), kurių amžius nuo 27 iki 52 metų, nustatyta, kad sICAM-1, sVCAM-1, sE- ir sP-selektinai reikšmingai tiesiogiai koreliavo su MTL-Ch ir CRB koncentracija ir atvirkščiai koreliavo (išskyrus sP-selektiną) su DTL-Ch koncentracija [60]. Be to, tu tiriamųjų, kuriems buvo diagnozuota mišri hiperlipidemija, sICAM-1, sVCAM-1 ir sE-selektino koncentracijos buvo reikšmingai didesnės negu tu, kuriems rasta izoliuota hipertrigliceridemija arba normalūs lipidų rodikliai. Tarp pastarųjų dviejų (grynos hipertrigliceridemijos vs. normalių lipidų rodiklių) grupių minėtų trijų AM koncentracijos reikšmingai nesiskyrė [60]. O štai ištyrus 32 sveikus nerūkančius 25–45 metų amžiaus vyrus, iš kurių pusei nustatyta hipertrigliceridemija, o kitai pusei – normalūs lipidų rodikliai, paaiškėjo, jog sICAM-1 ir sVCAM-1, bet ne sE-selektino, koncentracijos buvo reikšmingai didesnės hipertrigliceridemijos grupėje [61]. Panašus tyrimas buvo atliktas su jaunesniais nei 40 metų nerūkančiais vyrais, tačiau gauti šiek tiek kitokie rezultatai: lyginant hipertrigliceridemijos vyrų (n=15) grupės rodiklius su kontrolinės (n=15), pirmoji pasižymėjo reikšmingai didesne sICAM-1 ir sE-selektino, bet ne sVCAM-1 koncentracija [28]. Apibendrinant galima teigti, kad tam tikros sąsajos tarp sVCAM-1, sICAM-1, sE-selektino ir lipidų rodiklių *in vivo* egzistuoja, tačiau tai aiškiai įrodyti padės tik didelės apimties klinikiniai tyrimai ateityje.

Vienas iš mūsų tyrimo naudotų rodiklių buvo testosterono koncentracija kraujyje. Žinoma, kad testosterono gamybos sumažėjimas yra ED ir ŠK ligų rizikos veiksnys [62]. Kalbant apie testosteroną, galima spėti, kad jo įtaka sP-selektino koncentracijai gali pasižymėti priešingo pobūdžio tendencijomis priklausomai nuo to, ar asmuo yra nutukęs, ar ne. Taigi visai imčiai suformuluoti bendros išvados apie testosterono poveikį AM irgi negalima.

Kaip ir mes, reikšmingą koreliaciją tarp sVCAM-1 ir sICAM-1 nustatė ir kiti tyrėjai [61]. Toks faktas neturėtų stebinti, nes šias molekules sieja tai, kad ne tik endotelio, bet ir kelių kitų

tipų ląstelės geba ekspresuoti abi molekules. Be to, egzistuoja tie patys mediatoriai (pvz., citokinai), kurie gali skatinti tiek ICAM-1, tiek VCAM-1 raišką veikiant tokiam veiksmui kaip oksidacinis stresas.

Verta paminėti, kad nenustatėme beveik jokių reikšmingų 25(OH)-D koreliacinių ryšių su klinikinėje praktikoje dažnai įvertinamais antropometriniais ir laboratoriniais rodikliais. Tiesa, aptikome kai kurių parametrų – liemens apimtį, VAKS ar MTL-Ch ir DTL-Ch santykio skirtumus tarp 25(OH)-D koncentracijos tercilių, tačiau aiškios krypties statistškai reikšmingų tendencijų visoms trimis tercilėms neradome. Tokius rezultatus gana sunku komentuoti, nes nedaug tėra atlikta Vit. D problematiką gvildinančių tyrimų, kurie būtų atlikti tik su panašaus amžiaus „sveikais“ vyrais. Jungtinėje Karalystėje buvo tiriama, kaip papildomas Vit. D vartojimas veikia antropometrinius rodiklius bei 25(OH)-D koncentraciją; bazinių (prieš skiriant Vit. D preparatų) duomenų analize neaptikta reikšmingų sąsajų tarp 110 tyrime dalyvavusių 20–40 metų vyrų 25(OH)-D koncentracijos ir tokių rodiklių kaip jų KMI ir liemens apimtis, nors pagyvenusiems (64 metų ir vyresniems) tyrimo dalyviams vyrams tokių ryšių rasta [63]. Kitas, skerspjūvio tipo, tyrimas nustatė, kad jaunų (vidutinis amžius 24 metų) nenutukusių vyrų ($n=201$) 25(OH)-D koncentracija, atsižvelgus į kofaktorius, reikšmingai koreliavo tik su MTL-Ch ir sistoliniu kraujospūdžiu, bet ne su gliukozės koncentracija ar liemens apimtimi [64]. Patikimos sąsajos tarp 25(OH)-D koncentracijos ir kitų rodiklių buvo įrodytos didelių imčių tyrimuose [65–67], tačiau jų rezultatai nevienareikšmiai, be to, atkreiptinas dėmesys, kad buvo įtraukiami labai įvairaus amžiaus ar kelių rasių pacientai, todėl tokius rezultatus sunku gretinti su mūsų gautaisiais. I. Gailytė ir bendraautorai [56] nustatė reikšmingas teigiamas koreliacijas tarp 25(OH)-D koncentracijos ir KMI. Tiesa, pastarajame tyrime vitamino D trūkumas buvo konstatuojamas, jeigu asmeniui 25(OH)-D koncentracija mažesnė negu 11 ng/ml (t. y. mažiau nei 27,5 nmol/l), ir būtent šios grupės vyrų KMI buvo mažesnis negu visų kitų. O mūsų tyrime Vit. D trūkumas buvo nustatomas, kai 25(OH)-D koncentracija buvo mažesnė nei 30 ng/ml (75 nmol/l). Kitas svarbus skirtumas – I. Gailytės ir bendraautorų tirtieji asmenys buvo normalaus KMI (vidurkis $23,0 \pm 3,8 \text{ kg/m}^2$) šaukstiniai į kariuomenę, o mūsų kontingentas apėmė ir

antsvorio turinčius bei nutukusius asmenis bei platesnės amžiaus grupės ir įvairių profesijų vyrus, parinktus atsitiktinai (angl. *population-based*). Todėl manome, kad mūsų tyrimo rezultatai geriau atspindi jaunų Lietuvos vyrų situaciją.

Keletas pastabų dėl statistinės analizės. Kaip jau minėta, atkreiptinas dėmesys į mažus visai imčiai sudarytų tiesinės regresijos modelių determinacijos koeficientus (visi mažesni už 0,20), todėl tie regresijos modeliai, kuriuose rizikos veiksniai įtraukiami kaip nepriklausomi kintamieji, o AM koncentracija yra priklausomas kintamasis, negali būti laikomi itin tinkamais, nes tiesinis dėsnis nepakankamai gerai aprašo sąsajas tarp tirpiųjų AM ir 25(OH)-D bei kitų rodiklių. Kitas galimas paaiškinimas – nedidelė šio etapo imtis ($n=64$), kuri vertintina kaip nepakankamai reprezentatyvi. Iš kitos pusės, turint mažą stebėjimų skaičių, statistinės analizės rezultatai, pavyzdžiui, koreliacijos koeficientai, dažnai nėra statistiškai reikšmingi, nors absoliutus skaičiai yra ne tokie ir maži. Ši priežastis galėjo lemti ir tai, jog neaptikome reikšmingesnių rodiklių skirtumų, lyginant rodiklius tarp grupių, sudarytų pagal 25(OH)-D koncentraciją, nes į kiekvieną tercilę pateko tik po 21 ar 22 asmenis. Taip pat norėtume atkreipti dėmesį, kad kai kurie normalios kūno masės asmenų duomenų analizės rezultatai iš esmės skyrėsi nuo nutukusių ar antsvorio turinčių asmenų. Tai dar sykį patvirtina, kad, tiriant Vit. D ir kitų rodiklių, pvz., adhezijos molekulių, sąsajas, būtina atsižvelgti į tiriamojo kūno masę. Alternatyva – klinikinį tyrimą planuoti taip, kad būtų tiriami tik normalios kūno masės ar tik nutukę ar antsvorio turintys asmenys.

Tyrimą ketiname tęsti. 2013 m. panašiu metu (vasarį ir kovą, III etapas) numatome ištirti dar 60–70 naujų asmenų, tuomet tikimės gauti vertingesnių išvadų apie Vit. D, AM ir ŠK rizikos veiksmų sąsajas šaltuoju sezonu. Be to, yra pradėtas antrasis tyrimo etapas: tiriami tie patys asmenys, kurie buvo ištirti šaltuoju sezonu, darant prielaidą, kad kartu su padidėjusia 25(OH)-D koncentracija bus aptikti reikšmingi kitų rodiklių pokyčiai.

Be abejojimų, viena iš mūsų tyrimo silpnybių yra ta, kad netyrėme moterų. Bet tuomet tektų atsižvelgti į tokio reprodukcinio amžiaus (20–39 metų) moterų fiziologinius kitimus, nes įrodyta, kad endotelio funkcija ir jo išskiriamų medžiagų kiekis (tikėtina, ir AM raiška) kinta priklausomai nuo ovuliacinio ciklo fazės [68]. Todėl šio

tyrimo rezultatus ekstrapoliuoti visai populiacijai yra sudėtinga, nors literatūroje yra užuominų, kad vitamino D trūkumo (o šiame etape beveik visiems vyrams taip ir buvo) pasekmės endoteliumi iš esmės nesiskiria tarp lyčių [69]. Jeigu tyrimas apimtų ir moteris, joms kraujo mėginius reikėtų imti ankstyvoje folikulinėje fazėje [70]. Tačiau jeigu į tyrimą įtrauktos moters menstruacijų ciklas sutriktų, moteris pastotų arba pradėtų vartoti kontraceptikus, gali kilti problemų vertinant jos tyrimų rezultatus arba lyginant dviejų etapų duomenis, nes jie neabejotinai būtų veikiami papildomų šalutinių veiksmų (hormonų disbalanso etc.), kuriuos įvertinti neatliekant papildomų tyrimų yra ganėtinai keblu. Mūsų tyrimo neabejotina stiprybė yra ta, kad, gilindamiesi į 25(OH)-D ir adhezijos molekulių – ED biožymenų tarpusavio sąsajas, kartu atsižvelgėme į gana daug šalutinių veiksmų – antropometrinių bei gyvensenos ypatumų, kurie žinomi kaip ŠK ligų, visų pirma aterosklerozės, rizikos veiksniai. Taigi šio tyrimo rezultatai vertinigi tuo, kad praplečia požiūrį ne tik į vitamino D vaidmenį ankstyvajai kraujagyslių patologijai, bet ir šio vitamino reikšmę kardiologijoje, turint galvoje tradicinius rizikos veiksmus.

APIBERNDRINIMAS

Šio etapo (momentinio tyrimo) duomenimis, šaltuoju sezonu beveik visiems tirtiems 20–39 metų vyrams trūksta vitamino D. Nustatėme, jog egzistuoja sąsajos tarp tirpiojo E-selektino ir 25-hidroksi-vitamino D koncentracijos kraujo serume, jos stipresnės nenutukusiems vyrams. Reikšmingų tirpiųjų ICAM, VCAM, P-selektino sąsajų su 25-hidroksi-vitamino D koncentracija neaptikta. Tikimės, kad kitų tyrimo etapų duomenys padės aiškiau suprasti dabar aptiktus dėsningumus.

PADĖKA

Reiškiamo nuširdžią padėką VUL Santariškių klinikos Laboratorinės medicinos centro darbuotojams, ypač dr. Daliui Vitkui, dr. Radvilei Malickaitei ir doc. dr. Valerijai Jablonskinei už vertingus praktinius patarimus ir Nijolei Gerčiukaitei, atlikusiai tirpiųjų adhezijos molekulių tyrimus. Nuoširdžiai dėkojame Vilniaus Centro poliklinikos darbuotojams, ypač bendruomenės slaugytojai Teresai Morgunovai, už pagalbą atliekant šį tyri-

ma bei visiems tyrime dalyvavusiems vyrams.

Šis tyrimas yra iš dalies finansuojamas projekto „Aukštos kvalifikacijos specialistų, atitinkančių valstybės ir visuomenės poreikius, biomedicinos srityje rengimo tobulinimas – BIOMEDOKT“ lėšomis. ◆

Gauta: 2012 08 02
Priimta spaudai: 2012 09 27

Summary

THE ASSOCIATIONS BETWEEN 25-HYDROXY-VITAMIN D LEVELS AND BIOMARKERS OF ENDOTHELIAL DYSFUNCTION

Andrius Bleizgys, Virginijus Šapoka

Background. Endothelial dysfunction (ED) occurs in early stages of vascular diseases and could be detected using biomarkers, e.g. soluble adhesion molecules. Interest of vitamin D in cardiology is growing, and there is a need to investigate associations between vitamin D and ED biomarkers.

Patients and methods. Randomly selected healthy men of age 20–39 were examined during February and March in 2012. Data about some nutrition, smoking and physical activity habits were recorded. Some anthropometrical (height, weight, waist and hip circumference, arterial blood pressure) and laboratory measurements (general blood count, lipids, high sensitivity CRP (hsCRP), glucose, testosterone, 25-hydroxy-vitamin D (25(OH)-D), and soluble adhesion mole-

cules – ICAM-1, VCAM-1, E- and P-selectin) were performed.

Results. Of all 64 men, 57.8% had very low vitamin D levels (less than 50 nmol/L) and only 3.1% were vitamin D sufficient. After adjustments, soluble VCAM-1 correlated only with waist-hip ratio ($r = -0.341$, $p = 0.006$), ICAM-1 – with triglycerides ($r = 0.261$, $p = 0.037$), E-selectin – with 25(OH)-D and glucose ($r = 0.345$, $p = 0.004$ and $r = -0.003$, $p = 0.04$, respectively), P-selectin – with hsCRP category (if it was more than 1 mg/l) ($r = 0.311$, $p = 0.012$). A similar pattern remained for VCAM-1 and E-selectin in normal weight men, but not in obese or overweight men. No significant differences of soluble adhesion molecules were found among 25(OH)-D tertiles.

Conclusion. During cold season almost all men of age 20–39 had low vitamin D. There were associations between soluble E-selectin and serum 25(OH)-D, notably for normal weight men. No significant associations of 25(OH)-D with soluble ICAM-1, VCAM-1 or P-selectin were found.

Keywords: calcidiol, calcitriol, endothelial dysfunction, biomarkers, ICAM-1, VCAM-1, E-selectin, P-selectin.

LITERATŪRA

- Higienos instituto prie LR SAM Sveikatos informacijos centras. Prieiga per internetą: <http://www.hi.lt/content/sic.html> [žiūrėta 2012-09-17].
- Bleizgys A, Šapoka V. Vitamino D nepakankamumas – širdies ir kraujagyslių ligų rizikos veiksnys. *Laboratorinė medicina* 2012; 14(1): 40–7.
- Ribeiro F AA, Teixeira M, Ribeiro V, Duarte JA, Oliveira J. Endothelial function and atherosclerosis: circulatory markers with clinical usefulness. *Rev Port Cardiol* 2009; 28(10): 1121–51.
- Butt M, Dwivedi G, Blann A, Khair O, Lip GYH. Endothelial dysfunction: methods of assessment & implications for cardiovascular diseases. *Curr Pharm Des* 2010; 16(31): 3442–54.
- Garalienė V. Svarbiausi endotelio disfunkcijos determinantai. *Medicina (Kaunas)* 2006; 42(5): 362–9.
- van Bussel BC, Schouten F, Henry RM, Schalkwijk CG, de Boer MR, Ferreira I, et al. Endothelial dysfunction and low-grade inflammation are associated with greater arterial stiffness over a 6-year period. *Hypertension* 2011; 58(4): 588–95.
- Freestone B, Krishnamoorthy S, Lip GYH. Assessment of endothelial dysfunction. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2010; 8(4): 557–71.
- Chitalia N, Recio-Mayoral A, Kaski JC, Banerjee D. Vitamin D deficiency and endothelial dysfunction in non-dialysis chronic kidney disease patients. *Atherosclerosis* 2012; 220(1): 265–8.
- Jarasiūnienė D, Šimaitis A. Oksidacinis stresas ir endotelio disfunkcija. *Medicina (Kaunas)* 2003; 39(12): 1151–7.
- Vasan RS. Biomarkers of cardiovascular disease. *Circulation* 2006; 113(19): 2335–62.
- Atkinson AJ, Colburn WA, DeGruttola VG, DeMets DL, Downing GJ, Hoth DF, et al. Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* 2001; 69(3): 89–95.
- Hellemons ME, Kerschbaum J, Bakker SJ, Neuwirt H, Mayer B, Mayer G, et al. Validity of biomarkers predicting onset or progression of nephropathy in patients with Type 2 diabetes: a systematic review. *Diabet Med* 2012; 29(5): 567–77.
- Lekakis J, Abraham P, Balbarini A, Blann A, Boulanger CM, Cockcroft J, et al. Methods for evaluating endothelial function: a position statement from the European Society of Cardiology Working Group on Peripheral Circulation. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2011; 18(6): 775–89.
- Järvisalo MJ, Juonala M, Raitakari OT. Assessment of inflammatory markers and endothelial function. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2006; 9(5): 547–52.
- Scott IA. Evaluating cardiovascular risk assessment for asymptomatic people. *Br Med J* 2009; 338.
- Golias C, Batistatou A, Bablekos G, Charalabopoulos A, Peschos D, Mitsopoulos P, et al. Physiology and pathophysiology of selectins, integrins, and IgSF cell adhesion molecules focusing on inflammation. A paradigm model on infectious endocarditis. *Cell Commun Adhes* 2011; 18(3): 19–32.
- Lawson C, Wolf S. ICAM-1 signaling in endothelial cells. *Pharmacol Rep* 2009; 61(1): 22–32.
- Ley K. The role of selectins in inflammation and disease. *Trends Mol Med* 2003; 9(6): 263–8.
- Abe Y, El-Masri B, Kimball KT, Pownall H, Reilly CF, Osmundsen K, et al. Soluble cell adhesion molecules in hypertriglyceridemia and potential significance on monocyte adhesion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18(5): 723–31.
- Huffman KM, Pieper CF, Kraus VB, Kraus WE, Fillenbaum GG, Cohen HJ. Relations of a marker of endothelial activation (s-VCAM) to function and mortality in community-dwelling older adults. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2011; 66(12): 1369–75.
- Sung BH, Kim SH, Yeo MG, Kim J-K, Song WK. Human soluble E-selectin immunoadhesin inhibits leukemic monocyte adhesion to endothelial cells. *Cell Biochem Funct* 2007; 25(5): 585–9.
- Esper R, Vilariño J, Machado R, Paragano A. Endothelial dysfunction in normal and abnormal glucose metabolism. *Adv Cardiol* 2008; 45: 17–43.
- Tamler R. Diabetes, obesity, and erectile dysfunction. *Gend Med* 2009; 6: 4–16.
- Taddei S, Nami R, Bruno R, Quatrini I, Nuti R. Hypertension, left ventricular

- hypertrophy and chronic kidney disease. *Heart Fail Rev* 2011; 16(6): 615–20.
25. Seals DR, Jablonski KL, Donato AJ. Aging and vascular endothelial function in humans. *Clin Sci (Lond)* 2011; 120(9): 357–75.
 26. Eisenhardt SU, Thiele JR, Bannasch H, Stark GB, Peter K. C-reactive protein: How conformational changes influence inflammatory properties. *Cell Cycle* 2009; 8(23): 3885–92.
 27. Grad E, Pachino RM, Danenberg HD. Endothelial C-reactive protein increases platelet adhesion under flow conditions. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011; 301(3): 730–6.
 28. Lundman P, Eriksson MJ, Silveira A, Hansson L-O, Pernow J, Ericsson C-Gö, et al. Relation of hypertriglyceridemia to plasma concentrations of biochemical markers of inflammation and endothelial activation (C-reactive protein, interleukin-6, soluble adhesion molecules, von Willebrand factor, and endothelin-1). *Am J Cardiol* 2003; 91(9): 1128–31.
 29. Sandoo A, van Zanten JJCSV, Metsios GS, Douglas C, Kitas GD. The endothelium and its role in regulating vascular tone. *Open Cardiovasc Med* 2010; 4: 302–12.
 30. Brewer LC, Michos ED, Reis JP. Vitamin D in atherosclerosis, vascular disease, and endothelial function. *Curr Drug Targets* 2011; 12(1): 54–60.
 31. Howe HS, Kong KO, Thong BYH, Law WG, Chia FLA, Lian TY, et al. Urine sVCAM-1 and sICAM-1 levels are elevated in lupus nephritis. *Int J Rheum Dis* 2012; 15(1): 13–6.
 32. Wang F, Xing T, Wang N, Liu L. Clinical significance of plasma CD146 and P-selectin in patients with type 2 diabetic nephropathy. *Cytokine* 2012; 57(1): 127–9.
 33. Muldowney S, Kiely M. Vitamin D and cardiometabolic health: a review of the evidence. *Nutr Res Rev* 2011; 24(1): 1–20.
 34. Laucevičius A, Nemickas R, Petrulionienė Ž. Klinikinės kardiologijos pagrindai: mokomoji priemonė. Vaistų žinios 2008, Vilnius. 154.
 35. Genc H, Dogru T, Tapan S, Tasci I, Bozoglu E, Gok M, et al. Soluble CD40 ligand, soluble P-selectin and von Willebrand factor levels in subjects with prediabetes: The impact of metabolic syndrome. *Clin Biochem* 2012; 45(1–2): 92–5.
 36. Balčiūnas M, Kardiovaskulinių komplikacijų sąsajos su endotelio pažeidimo žymenimis po aortos vainikinių jungčių suformavimo operacijų: daktaro disertacija, 2009, VU: Vilnius.
 37. Müller D, Kleinewietfeld M, Kvakana H. Vitamin D review. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2011; 12(2): 125–8.
 38. Ngo DT, Sverdlov AL, McNeil JJ, Horowitz JD. Does Vitamin D modulate asymmetric dimethylarginine and C-reactive protein concentrations? *Am J Med* 2010; 123(4): 335–41.
 39. Predmore BL, Lefer DJ, Gojon G. Hydrogen sulfide in biochemistry and medicine. *Antioxid Redox Signal* 2012; 17(1): 119–40.
 40. Jain S, Manna P, Micinski D, Lieblong B, Kahlon G, Morehead L, et al. In African American Type 2 diabetic patients, is vitamin D deficiency associated with lower blood levels of H2S and cAMP, and elevated oxidative stress? *Antioxid Redox Signal* 2012; [Epub ahead of print].
 41. Muscogiuri G, Sorice GP, Ajjan R, Mezza T, Pilz S, Prioletta A, et al. Can vitamin D deficiency cause diabetes and cardiovascular diseases? Present evidence and future perspectives. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2012; 22(2): 81–7.
 42. Jablonski KL, Chonchol M, Pierce GL, Walker AE, Seals DR. 25-Hydroxyvitamin D deficiency is associated with inflammation-linked vascular endothelial dysfunction in middle-aged and older adults. *Hypertension* 2011; 57(1): 63–9.
 43. Tarcin O, Yavuz DG, Ozben B, Telli A, Ogunc AV, Yuksel M, et al. Effect of Vitamin D deficiency and replacement on endothelial function in asymptomatic subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94(10): 4023–30.
 44. Danoiu S, Danoiu M, Danculescu-Miulescu R, Margina D. Evaluation of serum intercellular adhesion molecule 1 in patient with metabolic syndrome and vitamin D deficiency. In: Sumbayev VV, et al, eds. *Proceedings of the World Medical Conference*. 2010. 174–7.
 45. Harald D, Stefan P, Hubert S, Wilfried R, Ursula S, Britta W, et al. Independent association of low serum 25-hydroxyvitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D levels with all-cause and cardiovascular mortality. 2008; 168(12): 1340–9.
 46. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP, et al. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96(7): 1911–30.
 47. Brannon P. Key questions in vitamin D research. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 2012; 72(Suppl 243): 154–62.
 48. Diffey BL. Is casual exposure to summer sunlight effective at maintaining adequate vitamin D status? *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2010; 26(4): 172–6.
 49. Webb AR, Kift R, Durkin MT, O'Brien SJ, Vail A, Berry JL, et al. The role of sunlight exposure in determining the vitamin D status of the U.K. white adult population. *Br J Dermatol* 2010; 163(5): 1050–5.
 50. Laktasic-Zerjavic N, Korsic M, Crncevic-Orlic Z, Kovac Z, Polasek O, Soldo-Juresa D. Vitamin D status, dependence on age, and seasonal variations in the concentration of vitamin D in Croatian postmenopausal women initially screened for osteoporosis. *Clin Rheumatol* 2010; 29(8): 861–7.
 51. Juzeniene A, Ma LW, Kwitniewski M, Polev GA, Lagunova Z, Dahlback A, et al. The seasonality of pandemic and non-pandemic influenzas: the roles of solar radiation and vitamin D. *Int J Infect Dis* 2010; 14(12): 1099–105.
 52. Karhapää P, Pihlajamäki J, Pörsti I, Kastarinen M, Mustonen J, Niemelä O, et al. Diverse associations of 25-hydroxyvitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D with dyslipidaemias. *J Intern Med* 2010; 268(6): 604–10.
 53. Wilhelm-Leen ER, Hall YN, deBoer IH, Chertow GM. Vitamin D deficiency and frailty in older Americans. *J Intern Med* 2010; 268(2): 171–80.
 54. A guide for population-based approaches to increasing levels of physical activity. PSO, 2007. Prieiga per internetą: <http://www.who.int/dietphysicalactivity/PA-promotionguideline-2007.pdf>
 55. Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, Anderson JL, Cannon RO, Criqui M, et al. Markers of inflammation and cardiovascular disease. *Circulation* 2003; 107(3): 499–511.
 56. Gailytė I, Lašaitė L, Preikša R, Puzinas P, Kazanavičius G. Jaunų sveikų vyrų vitamino D pokyčiai ir sąsajos su kūno svoriu bei sandara. *Lietuvos endokrinologija* 2011; 19(4): 75–80.
 57. Perez-Lopez FR, Chedraui P, Fernandez-Alonso AM. Vitamin D and aging: Beyond calcium and bone metabolism. *Maturitas* 2011; 69(1): 27–36.
 58. Krishnan AV, Feldman D. Mechanisms of the anti-cancer and anti-inflammatory actions of vitamin D. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2011; 51(1): 311–36.
 59. Swardfager W, Herrmann N, Cornish S, Mazereeuw G, Marzolini S, Sham L, et al. Exercise intervention and inflammatory markers in coronary artery disease: A meta-analysis. *Am Heart J* 2012; 163(4): 666–76.
 60. Calan M, Calan O, Gonen MS, Bilgir F, Kebapçilar L, Kulac E, et al. Examination of adhesion molecules, homocysteine and hs-CRP in patients with polygenic hypercholesterolemia and isolated hypertriglyceridemia. *Internal medicine* 2011; 50(15): 1529–35.
 61. Lupattelli G, Lombardini R, Schillaci G, Ciuffetti G, Marchesi S, Siepi D, et al. Flow-mediated vasoactivity and circulating adhesion molecules in hypertriglyceridemia: Association with small, dense LDL cholesterol particles. *Am Heart J* 2000; 140(3): 521–6.
 62. Guay AT, Traish A. Testosterone deficiency and risk factors in the metabolic syndrome: implications for erectile dysfunction. *Urol Clin North Am* 2011; 38(2): 175–83.

-
63. Kirsty Forsythe L, Livingstone MBE, Barnes MS, Horigan G, McSorley EM, Bonham MP, et al. Effect of adiposity on vitamin D status and the 25-hydroxycholecalciferol response to supplementation in healthy young and older Irish adults. *Br J Nutr* 2012; 107(01): 126–34.
64. Gannagé-Yared M-H, Chedid R, Khalife S, Azzi E, Zoghbi F, Halaby G. Vitamin D in relation to metabolic risk factors, insulin sensitivity and adiponectin in a young Middle-Eastern population. *Eur J Endocrinol* 2009; 160(6): 965–71.
65. Scragg RK, Camargo CA, Simpson RU. Relation of serum 25-hydroxyvitamin D to heart rate and cardiac work (from the National Health and Nutrition Examination Surveys). *Am J Cardiol* 2010; 105(1): 122–8.
66. Thuesen B, Husemoen L, Fenger M, Jakobsen J, Schwarz P, Toft U, et al. Determinants of vitamin D status in a general population of Danish adults. *Bone* 2012; 50(3): 605–10.
67. Sabanayagam C, Shankar A, Somasundaram S. Serum vitamin D level and prehypertension among subjects free of hypertension. *Kidney Blood Press Res* 2012; 35(2): 106–13.
68. Torrens C. Loitering in the shadows: the cardiovascular implications of vitamin D during development. *J Physiol* 2011; 589(19): 4637.
69. Ertek S, Akgü E, Cicero AF, Kütük U, Demirtas S, Cehreli S, et al. 25-Hydroxy vitamin D levels and endothelial vasodilator function in normotensive women. *Arch Med Sci* 2012; 8(1): 47–52.
70. Carrillo A, Flynn M, Pinkston C, Markofski M, Jiang Y, Donkin S, et al. Vitamin D supplementation during exercise training does not alter inflammatory biomarkers in overweight and obese subjects. *Eur J Appl Physiol* 2012; 112(8): 3045–52.
-